

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

THIAGO CAON

**Padronização do modelo de difusão *ex vivo* da câmara de Franz
para estudos de permeabilidade e permeação de fármacos e
adjuvantes farmacêuticos, através das mucosas bucal e esofágica
e da pele de suínos**

FLORIANÓPOLIS,

2009

Thiago Caon

Padronização do modelo de difusão *ex vivo* da câmara de Franz para estudos de permeabilidade e permeação de fármacos e adjuvantes farmacêuticos, através das mucosas bucal e esofágica e da pele de suínos

**UFSC
2009**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**Padronização do modelo de difusão *ex vivo* da câmara de Franz
para estudos de permeabilidade e permeação de fármacos e
adjuvantes farmacêuticos, através das mucosas bucal e esofágica
e da pele de suínos**

Thiago Caon

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia
Orientadora: Profa. Dra. Cláudia Maria Oliveira Simões

**Florianópolis
2009**

Thiago Caon

Padronização do modelo de difusão *ex vivo* da câmara de Franz para estudos de permeabilidade e permeação de fármacos e adjuvantes farmacêuticos, através das mucosas bucal e esofágica e da pele de suínos

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dr. Cláudia Maria Oliveira Simões
orientadora/presidente

Prof. Dr. Flavio Henrique Reginatto

Prof. Dr. Gustavo Amadeu Micke

Prof. Dr. Helder Ferreira Teixeira

Florianópolis, 05 de março de 2009.

DEDICATÓRIA

Ao meus pais Rubens e Ana Mobila,
exemplos de dedicação, esforço, persistência
e superação.

AGRADECIMENTOS

À Deus pela proteção e por me dar forças para que pudesse lutar em prol da concretização dos meus objetivos.

À Prof.^a Cláudia Maria Oliveira Simões pela orientação, quer seja pelas críticas ou sugestões, pelas oportunidades de viabilizar este e outros trabalhos de pesquisa e por estimular uma formação multidisciplinar de seus recursos humanos, mostrando sua real vocação de educadora.

Ao Prof. Gustavo Micke e a doutoranda Ana Carolina Costa pelo companheirismo, pelas sugestões e esclarecimentos que enriqueceram este trabalho, pela agradável recepção no laboratório e pela contribuição com as análises de eletroforese capilar.

Ao Prof. Flávio Reginatto pela compreensão nos momentos difíceis, pelo auxílio no desenvolvimento dos métodos cromatográficos, por se dispor a ser relator desta dissertação e pelas orientações durante a realização do estágio de docência.

À Prof.^a Leticia Köester da UFRGS pelas sugestões, bem como flexibilidade e rapidez no fornecimento de informações da área e de materiais.

Aos Prof. Marcos Segatto e Simone Cardoso por disponibilizarem os equipamentos necessários para as análises termoanalíticas no Laboratório de Controle de Qualidade da UFSC.

À Cláudia Figueiredo e ao Victor Antunes pela realização da avaliação histológica.

Ao Gilson e a Eliete Schmitt pelo fornecimento dos materiais biológicos.

Ao Prof. Marcone de Oliveira da UFJF pelo tratamento dos dados do delineamento fatorial.

Aos Prof. Rejane Scaff, Ericson Gonçalves e Ângela Campos pelo apoio nos momentos iniciais.

À Prof.^a Célia Barardi pelas sugestões durante os seminários do laboratório.

À amiga Débora Luckemeyer pela demonstração sincera de amizade e apoio incondicional em todas as etapas deste trabalho.

À aluna de iniciação científica Érica Nunes pelo auxílio na execução dos experimentos.

Aos amigos Izabella Thais da Silva, Saulo Smith, Carine Dal Pizzol, Sâmia Shutz, Monika Tagliari, Patrícia Stocco, Jadel Kratz, Marcelo Blatitslav pelo companheirismo nos momentos difíceis e nas viagens até o matadouro.

Aos demais colegas do Laboratório de Virologia Aplicada Adriana Correa, Vanessa Moresco, Cristian Kleemann, Francielly Dutra, Marina Teixeira, Jessica Bertol, Aline Schlindwein, Ariadne Cruz, Francielle de Sousa, Caroline Borges, Deise Kolling, Carla Andrighetti-Fröhner, Beatriz Kremer, Márcia Gomes pelos momentos de diversão, de trabalho em equipe e pela amizade.

Aos colegas do LABEC Melina Heller, Marcel Piovezan, Michelle Barcellos, Rafael Gomes que me acolheram de forma calorosa, sem medir esforços para que pudesse me adaptar ao laboratório.

Aos colegas do Laboratório de Farmacognosia e de Química Farmacêutica Andressa Gazola, Karen Lang, Geison Costa, Silvana Zucolotto, Vanessa Machado, Cláudia Terrazzas, Virginia Kappel, Solange Dias, Cintia Lhullier e Simone de Oliveira pelo companheirismo e apoio na execução das tarefas nestes laboratórios.

Aos meus colegas de mestrado Silvia Lanza, Patrícia Bräunig, Guilherme Toledo, Aline Sereia e Tiago Moretti pelos novos aprendizados e discussões do trabalho.

Aos amigos do curso de Administração Ezequiel Medeiros, João Vieira, Paula Ramos, Maurício Paladini, Rafael Maioral, Rafael Umann, Thomas Gorniak, Pedro Santos, Ana Zanette, Ana Fontes, Patrícia Martins, Izadora Leite, Eros Filho, Guilherme Benthien, Lucas Teixeira, Samir Fiates, José Campolina, Roque Bezerra pelos momentos de descontração, companheirismo e compreensão.

Ao meu irmão Emanuel Caon pelo apoio nestes últimos anos.

Aos meus primos Rafael Simoni, Kaline Caon e Karine Simoni que, desde os tempos do cursinho, foram conselheiros de decisões importantes.

Aos colegas e amigos de perto e de longe Vanessa Muller, Juliana Chaves, Regina Maniçoba, Felipe Zanandrea, Renan Machado, Fabíola Fronza, Rodrigo Alexandre, Andressa Zanandrea, Taciane Caon, Roberta Casarin, Aline Piaseski, Luana Debastiani, Daniele de Paula, Gislaine Kuminek, Helen Stulzer, Luciano Tormen, Eduardo Chaves, Rômulo Machado, Luis Reis, Carlos da Silva, Sabrina Gonçalves, Pablo Pelizza, Márcio Wagner, Juliana Vargas, Carla Tumelero, Marisa Silva, Andréia Seganfredo, Roberto Simoni, Keli Marafon, Ariana Marafon, Sinara Backes, Fabíola Provensi, Bárbara Giordano, Ronaldo Dervanoski, Letícia Pacheco, Thais Sincero, Carolina Mussi, Carine Blatt, Daniela Arend, Louise Chiaradia, Elaine Daminelli, Robson Oliboni, Éder Boeira, Bruno Valente, Rafael Nicolay, Natália Fazolo, Sandro Fantin, Alexandre Beló, Marta Suzana, Natália Caon, Caroline Caon, Denise Pacheco, Kelly Caon, Kátia Caon, Carla Cremonez, Álvaro Celmer, Raceli Sandrin, Fábio Murakami, Charise Bertol, Paulo de Oliveira, Camila Zanluca, Letícia Mazzarino, Daniele Scholl, Gisele Pasetti, Cássia Caon, Gisele Plácido, Cleysom Pértile, Romualdo Begnini, Vanessa Cardoso, Thays Tomazi, Maycon Bastos, Lia Loli, Juliana Bidone, Cassandra Aresi, Fernanda Alberton, Bruno Borba, Farlei Fronza pelo apoio, preocupação, pelas palavras de ânimo e de conforto.

Aos membros da banca pelas correções e sugestões.

A todos que fizeram parte deste trabalho e que enriqueceram mais uma etapa da minha vida.

“O valor de praticar com rigor, por algum tempo, uma ciência rigorosa não está propriamente em seus resultados: pois eles sempre serão uma gota ínfima, ante o mar das coisas dignas de saber. Mas isso produz um aumento de energia, de capacidade dedutiva, de tenacidade; aprende-se a alcançar um final de modo pertinente. Neste sentido é valioso, em vista de tudo o que se fará depois, ter sido um homem de ciência.”

Nietzsche (1878)

RESUMO

A mucosa bucal funciona como um sítio atrativo para a liberação sistêmica de fármacos, que incluem peptídeos e proteínas, em função da sua permeabilidade considerável e por evitar os efeitos hepáticos e intestinais de primeira passagem. A pele representa outra via alternativa, podendo também ser direcionada para efeitos locais ou sistêmicos, com a vantagem de conveniência na administração/aplicação, além de também evitar o metabolismo de primeira passagem. Para a avaliação do potencial destas vias como sítio de liberação de fármacos e para a estimativa de efeitos tóxicos de compostos utilizados no desenvolvimento de formulações, o modelo da câmara de Franz foi selecionado para este propósito. A mucosa esofágica suína tem mostrado ser um substituto útil e prático da mucosa bucal suína nos estudos de permeabilidade *ex vivo* por oferecer uma maior área de superfície e facilidade no preparo do tecido. Além disto, estes tecidos demonstraram características histológicas similares. Assim, parâmetros de permeabilidade tais como fluxo, tempo de latência e coeficiente de permeabilidade da carbamazepina (CBZ) e do acetonido de triancinolona (AT) foram estimados nestas mucosas, para fins de comparação. Além disto, o efeito do congelamento (-80°C) sobre a permeabilidade *ex vivo* destes fármacos nas mucosas bucal e esofágica suínas também foi avaliado. Para os estudos de permeação *ex vivo*, através da pele de orelha de porco, selecionou-se o metil, etil, propil e butilparabeno, tendo em vista os questionamentos recentes sobre a segurança dos mesmos, decorrente das suas absorções sistêmicas. O efeito das interações destes adjuvantes farmacêuticos na permeação cutânea foi avaliado através de delineamento fatorial. As amostras testadas foram veiculadas em soluções e, como meio de dissolução da fase receptora, soluções tampões em presença de solubilizante, geralmente o etanol (estabelecimento da condição *sink*) foram utilizadas. Métodos analíticos, previamente validados, tais como cromatografia líquida de alta eficiência, espectrofotometria na região do ultravioleta e eletroforese capilar foram selecionados para a quantificação dos fármacos e adjuvantes. Os resultados indicaram que as mucosas esofágicas suínas poderiam substituir as bucais nos estudos de permeabilidade *ex vivo* da CBZ, tendo em vista a semelhança estatística ($p > 0,05$; SNK) entre os parâmetros de permeabilidade calculados a partir das cinéticas de permeação da CBZ. Já para o AT, os resultados desta comparação foram estatisticamente diferentes ($p < 0,05$; SNK) e, neste caso, a mucosa esofágica suína não seria recomendada como substituto da mucosa bucal suína. Mesmo que o congelamento não tenha alterado os parâmetros de permeabilidade para a CBZ, observou-se maior retenção deste fármaco em tecidos congelados, provavelmente devido à formação de vacúolos, fato observado durante a avaliação histológica destes tecidos. Para o AT, não foi observada diferença estatística significativa ($p > 0,05$; SNK) entre os parâmetros de permeabilidade dos tecidos frescos e congelados. Assim sendo, os tecidos congelados poderiam ser utilizados nas situações em que a avaliação da retenção não é desejada. A ordem de permeação dos parabenos (BP=PP<EP<MP), através da pele de orelha de porco, foi contrária a ordem de lipofilicidade dos mesmos (BP>PP>EP>MP), notando-se maior retenção dos parabenos na epiderme do que na derme, provavelmente pelas diferenças no conteúdo lipídico destas camadas. No delineamento fatorial, efeitos estatisticamente significantes foram observados apenas para as combinações MP e EP, bem como para MP e PP, com redução nos fluxos de permeação e, assim sendo, estas associações seriam recomendadas até a definição de protocolos de segurança mais confiáveis, tendo em vista que efeitos nocivos destes adjuvantes seriam observados quando das suas absorções sistêmicas, conforme literatura.

Palavras-chave: sistema de liberação transbucal, permeação em pele, carbamazepina, acetonido de triancinolona, parabenos, câmara de difusão de Franz.

ABSTRACT

The buccal mucosa serves as an attractive site for the systemic delivery of drugs, including peptides and proteins, because of its considerable permeability and the avoidance of intestinal and hepatic first-pass effects. The skin represent another alternative, can be directed to local or systemic effects, with the advantage of administration convenience, and also it avoid the first-pass metabolism. To assess the potential of these routes as a drugs delivery site and to estimate the toxic effects of compounds used in the formulations development, the model of Franz diffusion cell was selected for this purpose. The porcine esophageal mucosa has been shown be a useful and practical substitute for porcine buccal mucosa *ex vivo* permeability studies in that it offers a larger surface area and it is much easier to prepare. Further, these tissues demonstrated similar histological characteristics. Thus, permeability parameters such as flux, lag time and permeability coefficient of carbamazepine (CBZ) and triamcinolone acetonide (AT) were estimated in these mucosae, for comparison purposes. In addition, the freezing effect (-80°C) on the *ex vivo* permeability of these drugs in the porcine buccal and esophageal mucosae was also evaluated. To evaluate the *ex vivo* permeation through pig ear skin were selected methyl- (EP), ethyl- (EP), propyl- (PP) and butyl- (BP) paraben due the recent questions about safety, resulting from systemic absorption of these parabens. The interactions effect of pharmaceutical adjuvants in skin permeation was assessed by factorial design. The tested samples were incorporated in solutions and as dissolution mean of the receptor phase were used buffer solutions in the solubilising presence, usually ethanol (establishment of *sink* condition). Analytical methods, previously validated, such as high performance liquid chromatography, UV/Vis spectrophotometry and capillary electrophoresis were selected to the drugs and adjuvants quantification. The results indicated that the esophageal could replace the buccal mucosa in CBZ permeability studies, considering the statistical similarity ($p > 0.05$, SNK) between the calculated permeability parameters from CBZ diffusion kinetics. For the AT, results of this comparison were statistically different ($p < 0.05$, SNK) and in this case the swine esophageal mucosa would not be recommended as a substitute for porcine buccal mucosa. Although freezing has not changed the CBZ permeability parameters, there was greater drug retention in frozen tissue probably due to the formation of vacuoles, fact shown during the histological evaluation of these tissues. For the AT, there was no significant statistically difference ($p > 0.05$, SNK) between the permeability parameters of fresh and frozen tissues. Therefore, the frozen tissue could be used when retention evaluation is not required. The parabens permeation order (BP = PP < EP < MP) through the pig ear skin was contrary to the lipophilicity order of these (BP > PP > EP > MP), presenting higher parabens retention in epidermis than dermis, probably due lipid content differences of these layers. In the factorial design, significant statistically effects were shown only for MP and EP as well as MP and PP combinations with reduction in permeation fluxes. In this way, these associations would be recommended until definition of security protocols more reliable, by consider that harmful adverse effects of these adjuvants would be shown when of their systemic absorption, according literature.

Keywords: transbuccal drug delivery, skin permeation, carbamazepine, triamcinolone acetonide, parabens, Franz diffusion cell.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura da mucosa bucal.	3
Figura 2: Estrutura da pele e seus apêndices	11
Figura 3: Rotas de penetração de moléculas através do estrato córneo	14
Figura 4: Esquema da câmara de difusão de Franz.....	18
Figura 5: Estrutura química da carbamazepina.....	20
Figura 6: Estrutura química do acetono de triancinolona.....	22
Figura 7: Estrutura química dos ésteres do ácido p-hidroxibenzóico, onde R = metilparabeno (O-CH ₃), etilparabeno (O-C ₂ H ₅), propilparabeno (O-C ₃ H ₇), butilparabeno (O-C ₄ H ₉), heptilparabeno (O-C ₇ H ₁₅), ocitilparabeno (O-C ₈ H ₁₇).....	23
Figura 8: Esquema do equipamento de eletroforese capilar.	27
Figura 9: 1) Disposição das câmaras de Franz no equipamento; 2) Seccionamento da região de interesse (neste caso, mucosa bucal suína); 3) Disposição da mucosa na câmara de Franz; 4) Câmaras de Franz pós-montagem, destinadas a aplicação do fármaco em análise (as duas primeiras).	32
Figura 10: Dissecção da pele de orelha suína (à esquerda) e tecido pronto para os experimentos, após descarte da hipoderme (à direita).....	36
Figura 11: Microscopia óptica das secções transversais das mucosas bucal e esofágica suínas (frescas e congeladas) (ampliação, 40X).....	44
Figura 12: Cromatogramas referentes à quantidade de carbamazepina permeada, através das mucosas suínas bucal (A) e esofágica (B), ambas frescas. Cromatogramas referentes à quantidade de carbamazepina permeada, através das mucosas suínas bucal (A) e esofágica (B), ambas frescas. Os cromatogramas foram sobrepostos, ordenando-os de forma crescente em relação ao tempo.	46
Figura 13: Cromatogramas referentes à quantidade de carbamazepina permeada, através das mucosas suínas bucal (A) e esofágica (B), ambas congeladas. Os cromatogramas foram sobrepostos, ordenando-os de forma crescente em relação ao tempo.	47
Figura 14: Cinética de difusão da carbamazepina, através das mucosas suínas bucal e esofágica, frescas e congeladas.....	48
Figura 15: Quantidades retidas (µg de carbamazepina/g de mucosa) nas mucosas suínas bucal e esofágica, frescas e congeladas, através de duas metodologias de quantificação (N=4). Diferenças foram consideradas significativas entre os diferentes tratamentos quando p<0,05 (ANOVA; SNK). Letras iguais indicam que não há diferença estatística significativa entre as médias.....	51
Figura 16: Balanço da massa final da carbamazepina, após sua quantificação por CLAE (A) ou espectrofotometria na região do UV (B). A quantidade total inicial da CBZ adicionada no compartimento doador foi de 2000 µg (1mg/mL).....	53

Figura 17: Fluxograma das principais etapas experimentais referente à avaliação da permeabilidade ex vivo do AT, através das mucosas bucais e esofágicas, visando à otimização das condições experimentais.	55
Figura 18: Avaliação da permeabilidade do acetonido de triancinolona, através das mucosas suínas bucal e esofágica, frescas e congeladas. Compartimento doador: 0,1% AT (A) ou 1% AT (B); 0,1% SDS; 5% DMSO. Compartimento receptor: tampão saliva. (N=3)	56
Figura 19: Cinéticas de difusão do acetonido de triancinolona (1% p/V), através das mucosas suínas bucal (A,B,C,D) e esofágica (E,F,G,H), ambas congeladas (N=1). As letras (A,B,C,D,E,F,G,H) representam as diferentes condições experimentais, conforme consta no Quadro 5.	62
Figura 20: Cinéticas de difusão do acetonido de triancinolona, através das mucosas suínas bucal e esofágica, frescas e congeladas. Condições experimentais: compartimento doador: 0,1% fármaco; 0,1% SDS; 50% EtOH. Compartimento receptor: tampão saliva: etanol (50:50) (N=4).	64
Figura 21: Eletroferogramas referentes à quantidade de metil e etilparabeno permeada na pele de orelha suína. Os eletroferogramas foram sobrepostos, ordenando-os de forma crescente em relação aos tempos de permeação.	68
Figura 22: Eletroferogramas referentes à quantidade de propil e butilparabeno permeada na pele de orelha suína. Os eletroferogramas foram sobrepostos, ordenando-os de forma crescente em relação aos tempos de permeação.	69
Figura 23: Perfis de permeação do metil, etil, propil e butilparabeno (0,1% p/V), através da pele de orelha suína. Cada ponto representa a média \pm desvio-padrão. Os parabenos foram testados isoladamente, no entanto, foram agrupados para facilitar a análise comparativa (N=4).	70
Figura 24: Avaliação da quantidade percentual de metil, etil, propil e butilparabeno retida (por grama de tecido) na derme (barra cinza) e epiderme (barra preta) da pele de orelha suína (N=4).	75
Figura 25: Balanço da massa final (valores médios \pm desvio-padrão). A quantidade total inicial dos parabenos adicionados no compartimento doador foi de 2000 μ g (1mg/mL).	76
Figura 26: Diagrama esquemático do provável mecanismo de formação do ácido p-hidroxibenzóico e do etilparabeno a partir do metilparabeno, em estudos com pele de porcos (<i>minipigs Yucatan</i>), em presença de etanol.	78
Figura 27: Eletroferogramas referentes às quantidades de etil - EP (A) e propilparabeno - PP (B) permeada, após 6 h, através da orelha de porco, onde se notam traços resultantes de provável metabolização dos parabenos. PI = padrão interno.	79

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Características físico-químicas de alguns parabenos.....	24
Quadro 2: Condições cromatográficas empregadas nas análises do acetonido de triancinolona.	39
Quadro 3: Condições cromatográficas empregadas nas análises da carbamazepina.....	40
Quadro 4: Condições eletroforéticas empregadas nas análises dos parabenos.	41
Quadro 5: Resumo do delineamento experimental (composição das soluções dos compartimentos superior e inferior) e dos principais resultados obtidos para os parâmetros de permeabilidade: fluxo (J), tempo de latência (T_L) e coeficiente de permeabilidade.	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Resultados obtidos durante a avaliação da permeabilidade da carbamazepina 0,1% (p/V), através de mucosas suínas bucal e esofágica (frescas e congeladas), após quantificação por CLAE e espectrofotometria na região do UV (N=4).	50
Tabela 2: Resultados obtidos durante a avaliação da permeabilidade do Acetonido de Triancinolona 0,1% (p/V), através de mucosas suínas bucal e esofágica (frescas e congeladas) (N=3).	58
Tabela 3: Resultados obtidos durante a avaliação da permeabilidade do Acetonido de Triancinolona 1% (p/V) através de mucosas suínas bucal e esofágica (frescas e congeladas) (N=3).	58
Tabela 4: Resultados obtidos durante a avaliação da permeabilidade do acetonido de triancinolona 0,1% (p/V), através de mucosas suínas bucal e esofágica (frescas e congeladas) (N=4).	65
Tabela 5: Resultados obtidos, durante a avaliação da permeabilidade dos parabenos 0,1% (p/V), através da pele de orelha suína, após quantificação por eletroforese capilar (N=4).	71
Tabela 6: Parâmetros da permeação dos parabenos através da pele de orelha de porco (obtidos com a equação mostrada no item 4.3.2) (N=4).	73
Tabela 7: Delineamento fatorial 2 ³ e respostas obtidas [valores de fluxo=J (µg/cm ²)] nos estudos de permeação do MP, EP, PP e BP, através da pele de orelha suína.	83
Tabela 8: Tratamento estatístico dos resultados do delineamento fatorial 2 ³ para estudos de permeação do MP, EP, PP e BP, através da pele de orelha suína.	85

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA
AGRADECIMENTOS
RESUMO
ABSTRACT
LISTA DE FIGURAS
LISTA DE QUADROS
LISTA DE TABELAS

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1	MUCOSA BUCAL	3
2.1.1	ASPECTOS ANATÔMICOS, HISTOLÓGICOS E FISIOLÓGICOS	3
2.1.2	PERMEABILIDADE DA MUCOSA BUCAL	4
2.2	MUCOSA ESOFÁGICA	6
2.2.1	ASPECTOS ANATÔMICOS, HISTOLÓGICOS E FISIOLÓGICOS	6
2.2.2	PERMEABILIDADE DA MUCOSA ESOFÁGICA	6
2.3	SELEÇÃO DO TIPO DE MUCOSA PARA AVALIAÇÃO EXPERIMENTAL DA PERMEABILIDADE	7
2.4	MODELOS PARA AVALIAÇÃO DA PERMEABILIDADE DE FÁRMACOS, ATRAVÉS DE MUCOSAS	8
2.5	VIABILIDADE E INTEGRIDADE DAS MUCOSAS	9
2.6	PELE	10
2.6.1	ASPECTOS ANATÔMICOS, HISTOLÓGICOS E FISIOLÓGICOS	10
2.6.2	ADMINISTRAÇÃO CUTÂNEA DE FÁRMACOS	12
2.6.3	TRANSPORTE DE MOLÉCULAS ATRAVÉS DA PELE	13
2.6.4	MODELOS PARA AVALIAÇÃO DA PERMEABILIDADE CUTÂNEA DE FÁRMACOS	16
2.7	MODELO DE DIFUSÃO DA CÂMARA DE FRANZ	18
2.8	SISTEMA DE CLASSIFICAÇÃO BIOFARMACÊUTICA	19
2.8.1	CARBAMAZEPINA	20
2.8.2	ACETONIDO DE TRIANCINOLONA	22
2.9	PARABENOS	23
2.10	MÉTODOS DE QUANTIFICAÇÃO	25
2.10.1	ELETROFORESE CAPILAR	26
3	OBJETIVOS	29
3.1	GERAL	29
3.2	ESPECÍFICOS	29
4	MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1	AMOSTRAS	30
4.2	AVALIAÇÃO <i>EX VIVO</i> DA PERMEABILIDADE DE FÁRMACOS, ATRAVÉS DAS MUCOSAS SUÍNAS BUCAL E ESOFÁGICA	30
4.2.1	OBTENÇÃO DAS MUCOSAS BUCAL E ESOFÁGICA	30
4.2.2	EXPERIMENTOS DE PERMEABILIDADE	31

4.2.3. AVALIAÇÃO DA RETENÇÃO DE FÁRMACOS NAS MUCOSAS SUÍNAS BUCAL E ESOFÁGICA	33
4.2.4 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE TECIDUAL E EFEITO DO CONGELAMENTO.....	34
4.3 AVALIAÇÃO <i>EX VIVO</i> DA PERMEAÇÃO DOS PARABENOS, ATRAVÉS DA PELE DE ORELHA SUÍNA	35
4.3.1 OBTENÇÃO DA PELE DE ORELHA SUÍNA.....	35
4.3.2 EXPERIMENTOS DE PERMEAÇÃO CUTÂNEA.....	36
4.3.3 AVALIAÇÃO DA RETENÇÃO CUTÂNEA DOS PARABENOS.....	38
4.4 MÉTODOS DE QUANTIFICAÇÃO	38
4.4.1 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA	38
4.4.2 ELETROFORESE CAPILAR	40
4.4.3. ESPECTROFOTOMETRIA NA REGIÃO DO ULTRAVIOLETA.....	42
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	42
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
5.1 AVALIAÇÃO <i>EX VIVO</i> DA PERMEABILIDADE DA CARBAMAZEPINA E DO ACETONIDO DE TRIANCINOLONA, ATRAVÉS DAS MUCOSAS BUCAL E ESOFÁGICA.....	43
5.1.1 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA.....	43
5.1.2 AVALIAÇÃO DA PERMEABILIDADE DA CARBAMAZEPINA.....	44
5.1.3 AVALIAÇÃO DA PERMEABILIDADE DO ACETONIDO DE TRIANCINOLONA.....	54
5.2 AVALIAÇÃO <i>EX VIVO</i> DA PERMEAÇÃO DOS PARABENOS, ATRAVÉS DA PELE DE ORELHA SUÍNA	67
5.2.1 PERMEAÇÃO CUTÂNEA DOS PARABENOS ISOLADOS.....	67
5.2.2 PERMEAÇÃO CUTÂNEA DE DIFERENTES COMBINAÇÕES DOS PARABENOS	80
6 CONCLUSÕES.....	87
REFERÊNCIAS.....	89
APÊNDICE A – FABRICAÇÃO DO EQUIPAMENTO UTILIZADO NESTA DISSERTAÇÃO.....	98
APÊNDICE B - CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA TESTADA DE ACETONIDO DE TRIANCINOLONA (AT).....	101
APÊNDICE C - VALIDAÇÃO DAS METODOLOGIAS ANALÍTICAS CLAE E EC UTILIZADAS NESTA DISSERTAÇÃO.....	107
APÊNDICE D – ASPECTOS BÁSICOS DO DELINEAMENTO FATORIAL.....	121

1 INTRODUÇÃO

Dificuldades como a baixa biodisponibilidade oral, inconveniência durante a administração intravenosa, metabolismo hepático de primeira passagem, bem como a possibilidade de tratar patologias locais levaram a exploração de rotas alternativas para a liberação de fármacos, cada qual com suas particularidades e vantagens frente a estes problemas. Adicionalmente, várias estratégias têm sido implementadas para promover maior biodisponibilidade dos fármacos, que incluem a administração suplementar de inibidores enzimáticos, uso de promotores de absorção, novas formulações estratégicas, e modificações químicas reversíveis (WANG; PEARLMAN, 1999).

Dentre as vias transmucosas, a mucosa bucal destaca-se pela excelente acessibilidade, grande extensão de músculo liso, relativa imobilidade. Além disto, o acesso direto para a circulação sistêmica evita o metabolismo hepático de primeira passagem dos fármacos, permitindo um aumento da biodisponibilidade. Esta via apresenta baixa atividade enzimática; é apropriada para fármacos e adjuvantes farmacêuticos que causam danos ou irritam mucosas; permite uma fácil retirada do fármaco; permite a utilização de promotores de absorção e inibidores enzimáticos ou modificações no pH da formulação (ALUR; JOHNSTON; MITRA, 2001). Desta forma, vários sistemas de liberação, uni ou multidirecionais, podem ser elaborados permitindo uma ação local ou sistêmica, conforme desejado. Em terapias locais, pode-se tratar gengivites, candidíase oral, lesões orais (como herpes), entre outras. Na via sistêmica, este espectro de ação pode ser ampliado, com as vantagens acima citadas (SMART, 2005).

A pele representa outra via atrativa, podendo também ser direcionada para patologias locais (administração tópica) ou sistêmicas (administração transdérmica), com a vantagem de conveniência na aplicação/administração (PRAUSNITZ; MITRAGOTRI; LANGER, 2004). Entretanto, a penetração de muitos fármacos através da pele é dificultada em função das propriedades de barreira, exercidas principalmente pelo estrato córneo (EL MAGHRABY; BARRY; WILLIAMS, 2008). Desta forma, diversos mecanismos químicos e físicos, tais como alterações nos componentes das formulações ou dos sistemas de liberação, podem ser combinados para garantir maior permeação cutânea dos fármacos (THONG; ZHAI; MAIBACH, 2007). Paralelamente a estes estudos, deve-se avaliar também a permeação dos adjuvantes farmacêuticos, bem como o efeito sinérgico dos mesmos, através da pele, visando à segurança de medicamentos tópicos ou cosméticos.

Os estudos de novas vias de administração de fármacos “conhecidos”, com o objetivo de melhorar a eficácia dos mesmos (quer seja por redução da dose, pelo aumento da absorção ou, ainda, pela liberação do fármaco diretamente no sítio alvo), têm ampliado o interesse dos pesquisadores e da indústria farmacêutica, através da possibilidade de

requisição de novas patentes e ganhos em competitividade, já que as pesquisas de fármacos inovadores envolvem recursos financeiros vultuosos, sem garantia de retorno.

Considerando-se o explicitado acima, o Laboratório de Virologia Aplicada da UFSC iniciou uma nova linha de pesquisa baseada na utilização de modelos *ex vivo* para avaliação da permeabilidade e permeação de fármacos e adjuvantes farmacêuticos, através de vias de administração alternativas. Neste âmbito, esta dissertação objetivou a padronização de do modelo de difusão *ex vivo* da câmara de Franz, para estudos de permeabilidade e permeação de fármacos, adjuvantes e preparações farmacêuticas.

Para fins de padronização da terminologia utilizada neste trabalho, serão empregados os seguintes termos, de acordo com Rieger (1993):

- 1) *Penetração*: passagem do(s) componente(s) ativo(s) somente através do estrato córneo;
- 2) *Permeação*: passagem do(s) componente(s) ativo(s) através da epiderme, atingindo a epiderme viável ou a derme;
- 3) *Absorção*: passagem do(s) componente(s) ativo(s) para a corrente sanguínea.
- 4) *Permeabilidade*: passagem do(s) componente(s) ativo(s) através das mucosas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 MUCOSA BUCAL

2.1.1 ASPECTOS ANATÔMICOS, HISTOLÓGICOS E FISIOLÓGICOS

A região bucal é classificada em três partes: mastigatória, de revestimento e mucosa especializada. A primeira compreende a gengiva e o palato, sendo caracterizada por um epitélio estratificado, escamoso, queratinizado e fracamente permeável. A segunda inclui o revestimento das bochechas (mucosa bucal) e lábios, consistindo de um epitélio estratificado, escamoso e não queratinizado; esta porção exibe maior permeabilidade que a superfície queratinizada e, desta forma, representa uma opção interessante para a liberação de fármacos (CONSUELO et al., 2005b). A terceira é a mucosa bucal, constituída por diferentes camadas de células, que podem ser genericamente agrupadas em epitélio, membrana basal e tecido conectivo. Primeiramente, recobrimdo a cavidade oral, existe uma camada de muco, rica em glicoproteínas insolúveis em água, de aspecto geleificante (comportamento viscoelástico). O epitélio bucal exerce a função de proteção e é não queratinizado, representando uma barreira de permeabilidade, tendo em vista sua grande concentração de lipídeos, o que protege o tecido contra perda de fluidos e entrada de agentes ambientais potencialmente nocivos, tais como antígenos, carcinógenos, toxinas microbianas, etc. O tecido conectivo confere propriedades mecânicas à mucosa bucal, e a lâmina própria é seu principal componente, rica em vasos sanguíneos e capilares, que se associam com a veia jugular interna para, então, garantir o efeito sistêmico (SANDERS, 1990; SALAMAT-MILLER; CHITTCHANG; JOHNSTON, 2005) (Figura 1).

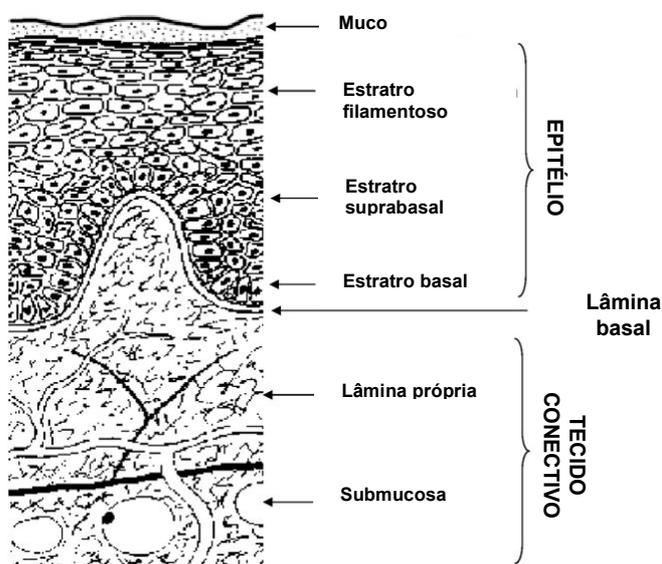


Figura 1: Estrutura da mucosa bucal.
Fonte: SUDHAKAR; KUOTSU; BANDYOPADHYAY(2006).

Existem três glândulas salivares principais (parótida, submaxilar, sublingual), que secretam saliva no interior da cavidade oral. As secreções produzidas por estas glândulas apresentam diferenças quanto à sua consistência. Enquanto que glândulas parótidas e submaxilares produzem secreção com aspecto “aguado”, as glândulas sublinguais produzem secreção mais viscosa, contendo mucina e fraca atividade enzimática.

A saliva tem grande importância para a lubrificação das estruturas orais, contribui para a formação do bolo alimentar, previne a desmineralização dos dentes, garante a digestão dos carboidratos (através da atividade das amilases), regula a flora microbiana oral, além de contribuir para a manutenção do pH da cavidade oral e para a efetivação de leves reparos nos tecidos (SLOMIANY et al., 1996). A saliva tem ação tamponante, apresentando pH próximo da neutralidade, podendo sofrer variações quando a secreção salivar é estimulada ou quando na presença de bactérias formadoras de cáries (SMART, 2005). Um indivíduo normal produz, aproximadamente, 1L de saliva/dia, com uma taxa de fluxo média de 0,5 mL/min, podendo chegar a 7 mL/min, quando ocorrer forte estimulação do sistema parassimpático (GHANDI; ROBINSON, 1994).

2.1.2 PERMEABILIDADE DA MUCOSA BUCAL

Os fármacos administrados através da cavidade oral são absorvidos pelas veias reticulada e jugular e, então, drenados para a circulação sistêmica, evitando o metabolismo hepático de primeira passagem. As barreiras superficiais da mucosa bucal (epitélio, muco) representam a defesa primária, impedindo a entrada de substâncias do exterior. (KUROSAKI; KIMURA, 2000; VEUILLEZ, 2001). Existem duas possíveis rotas principais, para o transporte de fármacos, através do epitélio estratificado escamoso da mucosa bucal: a transcelular (ou intracelular, atravessando a membrana celular e entrando na célula) e a paracelular (ou intercelular, passando entre as células), sendo que ambas as rotas representam processos passivos de difusão (JUNGINGER; HOOGSTRAATE; VERHOEF, 1999).

Processos diferenciados de permeabilidade são relatados para moléculas de diferentes tamanhos moleculares. Segundo Hao e Heng (2003), moléculas maiores atravessariam o epitélio estratificado através do espaço intercelular (transporte paracelular) e esta barreira de penetração seria resultante de modificações na substância intercelular (líquido intersticial) das camadas superficiais. Contudo, a taxa de penetração varia conforme as propriedades físico-químicas de cada molécula e do tipo de tecido. Segundo Song e colaboradores (2004), as moléculas pequenas e lipofílicas apresentam maiores taxas de penetração no epitélio estratificado do que moléculas hidrofílicas. Assim sendo, foi proposto

que moléculas lipofílicas atravessam a membrana celular, sendo transportadas via transcelular, enquanto que moléculas hidrofílicas seguem pelo espaço intercelular, sendo transportadas pela via paracelular.

Outros tipos de transporte, tais como difusão mediada por carreadores, transporte ativo, endocitose e pinocitose, podem estar envolvidos no transporte de fármacos através da mucosa bucal. Por exemplo, glicose, ácidos monocarboxílicos, ácidos salicílicos e ácidos nicotínicos utilizam o mecanismo de difusão mediado por carreadores para penetrarem através do epitélio bucal (SALAMAT-MILLER; CHITTCHANG; JOHNSTON, 2005).

O pH pode ter um efeito pronunciado na carga da molécula, na relação natureza hidrofílica/lipofílica do fármaco e na taxa de absorção do fármaco (SONG et al., 2004). Os ácidos e bases fracas estão sujeitos a uma ionização dependente do pH. Assume-se que espécies ionizadas penetram fracamente através da mucosa bucal, quando comparadas com espécies não-ionizadas. O aumento da quantidade de espécies não-ionizadas é acompanhado de um aumento da permeabilidade do fármaco, através da barreira epitelial, que pode ser obtido por alterações no pH do sistema de liberação do mesmo (DENEER et al., 2002; MASHRU et al., 2005).

A mucosa bucal tem sido utilizada como alvo potencial para a liberação controlada de fármacos macromoleculares hidrofílicos, tais como peptídeos, oligonucleotídeos e polissacarídeos. No entanto, o alto peso molecular destes fármacos confere-lhes baixa permeabilidade e baixa biodisponibilidade, e a utilização de promotores é considerada uma opção viável para aumentar a permeabilidade dos mesmos. A baixa biodisponibilidade, em função da ação de enzimas salivares que degradam composto(s) ativo(s), pode ser evitada através da utilização de inibidores destas enzimas (LANGOTH; BERNKOP-SCHNURCH; KURKA, 2005).

Os promotores de absorção, utilizados para facilitar a passagem de fármacos pela barreira da mucosa bucal, agem por uma série de mecanismos diferenciados, que incluem aumento da fluidez da membrana celular, interação com os lipídeos inter e intracelulares, alterações nas proteínas celulares e/ou alterações na superfície da mucina (SENEL; HINCAL, 2001). É desejado que tais promotores exibam baixa ou nenhuma toxicidade. A associação entre diferentes promotores pode aumentar a absorção dos fármacos, por mecanismos diferenciados, além de possibilitar redução da toxicidade dos primeiros, particularmente quando ocorre redução da concentração individual de cada promotor em função destas associações (SHOJACI, 1998).

Conforme mencionado anteriormente, a degradação enzimática representa uma barreira para a penetração dos fármacos através do epitélio bucal. A saliva não contém proteases, mas apresenta níveis moderados de esterases, carboidrases e fosfatases (ROBINSON; YANG, 2001). Além disto, várias enzimas proteolíticas são também

encontradas no epitélio bucal (VEUILLEZ; KALIA; JACQUES, 2001). Walker et al. (2002) relataram que endopeptidases e carboxipeptidases não se encontram presentes na superfície da mucosa bucal, mas as aminopeptidases representam a maior barreira enzimática para fármacos peptídicos liberados na mucosa bucal. Polímeros mucoadesivos, associados à agentes inibidores enzimáticos, têm sido utilizados para contornar esta barreira enzimática nos sistemas de liberação de proteínas e peptídeos (SALAMAT-MILLER; CHITTCHANG; JOHNSTON, 2005).

2.2 MUCOSA ESOFÁGICA

2.2.1 ASPECTOS ANATÔMICOS, HISTOLÓGICOS E FISIOLÓGICOS

A mucosa esofágica, similarmente à mucosa bucal, é constituída por uma camada de epitélio escamoso estratificado, sustentada por fibras de tecido conectivo (com poucas células e grande quantidade de matriz). Estas mucosas são diferenciadas pela presença de uma camada de fibras musculares, dispostas longitudinalmente, na mucosa esofágica (SQUIER; KREMER, 2001).

O esôfago apresenta dois tipos principais de glândulas secretoras, adaptadas as suas funções fisiológicas. No terço superior, os ductos das glândulas submucosas atravessam a membrana e aparecem como “buracos” no epitélio. O número e a distribuição destas glândulas variam entre amostras e entre espécies, estando presentes em humanos, porcos e cachorros. Água, mucinas, bicarbonato, fatores de crescimento epidermais e prostaglandinas são secretados por estas glândulas (LONG; ORLANDO, 1999). Outro tipo de glândulas secretoras situa-se na parte inferior do esôfago e apresenta constituição similar à das glândulas das junções gastroesofágicas. Elas produzem maiores taxas de muco, visando proteger a mucosa esofágica nas situações de refluxo gástrico, uma vez que ele pode induzir a transformação do epitélio normal (escamoso estratificado) em epitélio colunar (SPECHLER; GOYAL, 1996).

2.2.2 PERMEABILIDADE DA MUCOSA ESOFÁGICA

Neste tópico, a abordagem textual não será direcionada para a administração de fármacos via mucosa esofágica, mas para as evidências, em termos de permeabilidade, que tornam esta mucosa um modelo experimental que pode substituir a mucosa bucal nos estudos *ex vivo* de permeabilidade de fármacos. A importância desta substituição será melhor compreendida no item 2.3.

Similarmente à mucosa bucal, as propriedades de barreira da mucosa esofágica também se situam nas camadas superficiais (epitélio), considerando-se experimentos que demonstraram o aumento da permeabilidade quando as camadas superficiais foram removidas por *stripping* (SQUIER; KREMER, 2001). Mais especificamente, Consuelo et al. (2005a) analisaram o conteúdo lipídico desta camada, observando um teor lipídico entre 12 e 13% da massa total de epitélio dessecado, com abundância de fosfolídeos, seguido de colesterol e glicosilceramidas. Estes lipídeos intercelulares, particularmente as ceramidas, representam uma importante barreira de permeabilidade, tendo em vista que a extração dos mesmos resultou em aumento da permeabilidade.

Os tipos de transporte de moléculas, através da mucosa esofágica, são semelhantes aos da mucosa bucal, bem como a existência de um transporte diferencial para moléculas de alto peso molecular. Fatores interferentes destas taxas de transporte incluem a natureza físico-química da molécula, tipos de tecido e veículo, pH, entre outros (SQUIER; KREMER, 2001).

2.3 SELEÇÃO DO TIPO DE MUCOSA PARA AVALIAÇÃO EXPERIMENTAL DA PERMEABILIDADE

A seleção da espécie animal apropriada para a realização de experimentos *ex vivo* é fundamental para a aplicabilidade dos resultados obtidos a partir desses experimentos. Neste sentido, a mucosa bucal suína tem sido utilizada, em função da sua similaridade com a mucosa bucal humana (HOOGSTRAATE et al., 1996). Alguns parâmetros, tais como permeabilidade, composição da barreira lipídica, histologia e organização ultra-estrutural, são similares para ambas as mucosas bucais. A exigência de mucosa bucal não queratinizada, semelhante à humana, representa a principal limitação para a utilização de outros modelos animais de menor complexidade (LANGOTH; BERNKOP-SCHNURCH; KURKA, 2005).

Tendo em vista que a mucosa bucal se comunica com o tecido muscular subjacente, existe uma certa dificuldade no processo de separação destas camadas para a realização dos experimentos. Assim, diversas propostas foram apresentadas para tentar resolver este problema, com propósito experimental. Uma delas seria a utilização do epitélio para os estudos de permeabilidade *ex vivo* que, após tratamento em solução salina a 60°C (1 min), pode ser separado do tecido conectivo. A justificativa para utilização do epitélio em detrimento da mucosa (epitélio + tecido conectivo), seria de que as principais propriedades de barreira estariam situadas nesta camada (CONSUELO et al., 2005a). Outra proposta seria a utilização da mucosa esofágica suína que, como citado anteriormente, apresenta como vantagem uma maior área de superfície, tipicamente intacta e, como o tecido bucal,

consiste de epitélio estratificado, escamoso e não queratinizado, suportado por uma camada de tecido conjuntivo (SQUIER; KREMER, 2001). A composição lipídica dos epitélios bucal e esofágico é similar quali e quantitativamente, já que a alta proporção de glicosilceramidas e a baixa quantidade de ceramidas caracterizam a natureza de um epitélio não queratinizado em geral (CONSUELO et al., 2005a). No entanto, para que a mucosa esofágica suína possa ser utilizada nos estudos de permeabilidade de fármacos, ela requer não apenas equivalência histológica com a mucosa bucal, mas também deve apresentar parâmetros equivalentes de permeabilidade. Um estudo que comparou a permeabilidade do citrato de fentanil nas mucosas suínas bucal e esofágica encontrou uma correlação positiva entre ambas. Porém, tal estudo teve como limitação o fato de ter utilizado apenas um fármaco para avaliar as diferenças de permeabilidade (CONSUELO et al., 2005b).

Assim sendo, é necessário avaliar outras moléculas, com propriedades físico-químicas diversas, visto a influência direta destes parâmetros na permeabilidade, para então, propor a mucosa esofágica como um modelo substituto da mucosa bucal.

2.4 MODELOS PARA AVALIAÇÃO DA PERMEABILIDADE DE FÁRMACOS, ATRAVÉS DE MUCOSAS

A permeabilidade de fármacos através da mucosa bucal pode ser avaliada através de técnicas *in vivo*, *in vitro* e *ex vivo*.

Poucos estudos foram realizados *in vivo* por duas razões principais. Uma delas diz respeito à dificuldade de administração do fármaco na cavidade bucal dos animais. A outra limitação relaciona-se com a necessidade de mucosas não queratinizadas (similares à mucosa humana), encontrada em poucos representantes animais (apenas em coelhos e porcos) (SALAMAT-MILLER; CHITTCHANG; JOHNSTON, 2005; NICOLAZZO; FININ, 2008).

Culturas *in vitro* de células bucais têm sido úteis para estudos de permeabilidade de fármacos. No entanto, esta metodologia requer controle rigoroso da diferenciação celular, além de monitoramento da sua composição lipídica (LEIPOLD; QUADROS, 1993). Como exemplo, pode-se citar a linhagem celular TR146 (células de carcinoma bucal humano) para avaliação do potencial da quitosana em promover a absorção de peptídeos e proteínas (PORTERO; REMUÑÁN-LÓPEZ; NIELSEN, 2002).

Assim sendo, as técnicas *ex vivo* são as mais utilizadas, em função da simplicidade de suas condições experimentais (FRANTZ, 1990). O modelo de maior aplicabilidade é aquele no qual uma mucosa seccionada é montada em um aparato de difusão. Contudo, este ensaio *ex vivo* requer a manutenção da integridade e da viabilidade das mucosas utilizadas (SALAMAT-MILLER; CHITTCHANG; JOHNSTON, 2005).

2.5 VIABILIDADE E INTEGRIDADE DAS MUCOSAS

A preservação dos tecidos dissecados é uma questão relevante, que pode afetar os resultados a serem obtidos. Não existem protocolos padronizados para garantir a viabilidade e a integridade dos tecidos dissecados. O método mais adequado para a avaliação da viabilidade tecidual é o próprio experimento de permeabilidade. Se a permeabilidade do fármaco não variar, durante todo o período do experimento, em função de diferentes condições experimentais, tais como pH e temperatura, então o tecido pode ser considerado viável (SUDHAKAR; KUOTSU; BANDYOPADHYAY, 2006). Entretanto, pode ocorrer morte tecidual durante o experimento e, desta forma, o estado de fluxo constante será diferente daquele observado em tecidos viáveis. A avaliação dos aspectos morfológicos celulares, através de análises histológicas, e o monitoramento dos níveis enzimáticos são considerados ferramentas bastante úteis (NICOLAZZO; REED; FINNIN, 2003).

Outro método proposto para a avaliação da viabilidade celular é aquele com azul de tripano. Após o experimento, o meio do compartimento superior da câmara de difusão é removido e o tecido incubado com pequena quantidade deste corante, por um curto período de tempo. Após, realiza-se a avaliação microscópica, que indicará o índice de células viáveis (não coradas) em relação às não viáveis (coradas de azul) (LANGOTH; BERNKOP-SCHNURCH; KURKA, 2005).

O ensaio colorimétrico com o sal de tetrazólio MTT também pode ser utilizado para quantificar a sobrevivência e a proliferação celulares. O MTT é convertido nas células viáveis em cristais de formazana, por enzimas presentes em mitocôndrias ativas, e a quantidade de formazana gerada é diretamente proporcional ao número de células viáveis (MOSMANN, 1983). Contudo, uma limitação deste ensaio reside no fato de que as enzimas conversoras do MTT são resistentes ao congelamento. Assim, podem ocorrer alterações morfológicas celulares, sem que ocorram alterações na atividade desta enzima, conduzindo a uma falsa viabilidade tecidual. Por isto, tal técnica deve ser evitada ao se trabalhar com tecidos congelados (NICOLAZZO; REED; FINNIN, 2003).

A possibilidade de congelamento das mucosas, para posterior utilização experimental, ainda gera discussão. Consuelo et al. (2005b) não observaram diferenças estatísticas significativas na permeabilidade do citrato de fentanil em mucosas bucais suínas congeladas (-20°C) e não congeladas. Nicolazzo et al. (2003) compararam a permeabilidade de dois fármacos de diferentes características físico-químicas: a cafeína (hidrofílica) e o estradiol (lipofílico), através do epitélio bucal suíno fresco e congelado (-20°C/1 mês), e os resultados demonstraram fluxos similares entre os epitélios. No entanto, foram detectados sinais de morte celular nos tecidos congelados, através da avaliação histológica e também

foi visualizado um processo de vacuolização celular, devido à formação de cristais de gelo. Van Eyk, Van der Bijl (2006) utilizaram três compostos (17 β -estradiol, arecolina e vasopressina) para comparar a permeabilidade da mucosa bucal suína fresca e congelada (-85°C/8 meses), e detectaram alterações na permeabilidade dos mesmos, através de modificações dos seus valores de fluxo, nas duas condições.

Em linhas gerais, baseando no exposto acima, pode-se afirmar que é preferível utilizar tecidos frescos até que protocolos padronizados de congelamento sejam estabelecidos, levando-se em consideração não apenas a natureza química do fármaco a ser testado, como também o tempo de armazenagem, a atividade enzimática do tecido, entre outros fatores. Na realidade, o procedimento ideal é avaliar preliminarmente as duas condições para cada material a ser testado e, dependendo destes resultados, direcionar os estudos com o tecido fresco ou congelado.

2.6 PELE

2.6.1 ASPECTOS ANATÔMICOS, HISTÓLOGICOS E FISIOLÓGICOS

A pele, maior órgão do corpo, apresenta diferentes tipos celulares na sua estrutura, além de células transitórias dos sistemas imune e circulatório, atuando como barreira física (contra choques, pressão, radiação ultravioleta), química (limita a passagem de substâncias exógenas, conservação da pele e substância endógenas) e microbiológica. Substâncias que penetram o estrato córneo estão sujeitas ao metabolismo na epiderme viável, que é o maior sítio de metabolismo da pele. Embora estas propriedades de barreira da pele forneçam proteção ao homem, isto representa um fator limitante, quando da administração de fármacos por esta via objetivando-se um efeito sistêmico (HARDING, 2004). Adicionalmente, a pele contribui para o controle da temperatura corporal (termorregulação); apresenta funções endócrinas, como por exemplo, síntese da vitamina D e síntese periférica de pró-hormônios (como a conversão da testosterona em diidrotestosterona, mais ativa) (MENON, 2002); funções sensoriais (dor, tato, percepção de temperatura) e impede a perda de água.

A pele é composta por duas camadas principais (Figura 2). A derme, a camada mais profunda, é composta por proteínas fibrosas (colágeno e elastina) e um gel interfibrilar de glicosaminoglicanas, sais e água. Além disto, é extensivamente vascularizada, com unidades pilosebáceas e glândulas. A epiderme é formada por várias camadas de células, que incluem o estrato germinativo (camada basal), estrato espinhoso (camada espinhosa), estrato granuloso (camada granular) e estrato córneo. Cada camada é definida pela

posição, morfologia e estado de diferenciação dos queratinócitos. As células tornam-se queratinizadas à medida que migram para a superfície. Considerando-se que a epiderme não apresenta vasos sanguíneos, os nutrientes devem se difundir da derme para a epiderme para garantir a viabilidade da mesma (EL MAGHRABY; BARRY; WILLIAMS, 2008).

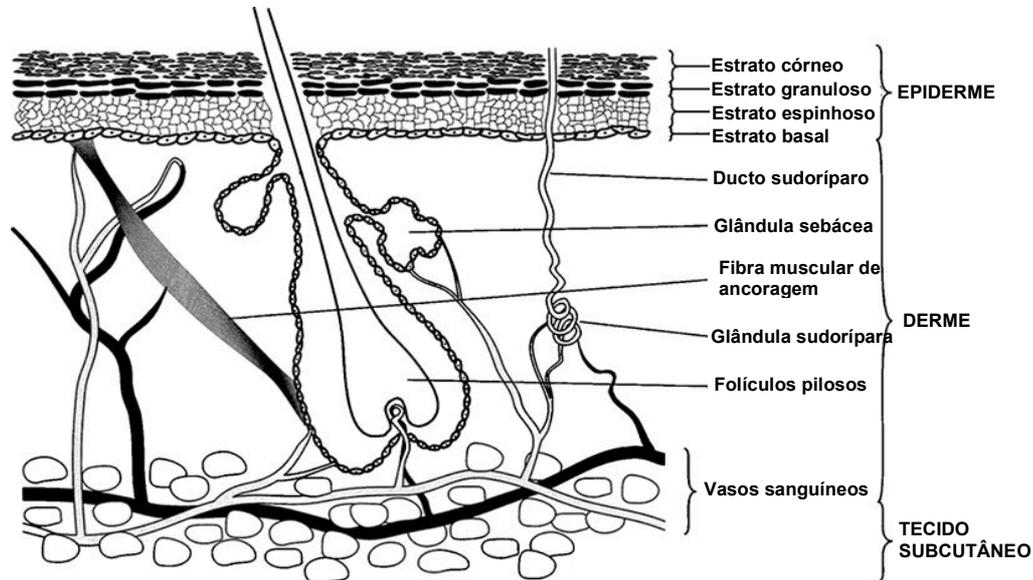


Figura 2: Estrutura da pele e seus apêndices. Fonte: EL MAGHRABY; BARRY; WILLIAMS (2008).

A camada basal é formada por células jovens, colunares, com intensa atividade mitótica, sendo responsável pela renovação das células da epiderme. A camada espinhosa é formada por células poligonais e projeções citoplasmáticas, que garantem o ancoramento das células umas às outras, conferindo resistência ao atrito. As células da camada granulosa são poligonais, mais achatadas e contêm grânulos de querato-hialina (precursores da queratina do estrato córneo) no seu citoplasma. O estrato córneo, camada mais superficial, é constituído por células mortas, secas, alongadas, denominadas de corneócitos, produto final da diferenciação das células produzidas na epiderme viável (MONTEIRO-RIVIERE, 2006).

O estrato córneo representa a principal barreira física à entrada de substâncias na pele e à perda de água, sendo constituído por dois sistemas heterogêneos, compostos por queratinócitos (também conhecidos como corneócitos, nesta camada), embebidos em uma matriz lipídica intercelular, organizada em bicamadas lamelares. Os lipídeos encontrados no estrato córneo são ácidos graxos, colesterol e esfingolipídeos (tais como as ceramidas). (BERGH et al., 1997). Harada et al. (1992) removeram os lipídeos intercelulares do estrato córneo e observaram um aumento da permeabilidade de compostos lipofílicos. Desta forma, a queratina representaria uma barreira para compostos hidrofílicos, enquanto que, os lipídeos, para as substâncias hidrofóbicas.

A derme é constituída por um conjunto de células residentes (fibroblastos, histiócitos, macrófagos e mastócitos) e migratórias (leucócitos, eosinófilos, plasmócitos), bem como por elementos extracelulares (fibras elásticas, colágenas, reticulares, pré-elásticas e de ancoragem), vasos sanguíneos e linfáticos e nervos. As fibras colágenas conferem capacidade de distensão à pele. A derme é formada, ainda, pelas camadas papilar e reticular (a mais profunda), que apresentam grandes semelhanças estruturais (MONTEIRO-RIVIERE, 2006).

A hipoderme ou tecido celular subcutâneo representa uma transição do tecido dérmico conectivo fibroso para o tecido predominantemente adiposo. Esta estrutura confere proteção contra traumas físicos, além de servir como reserva energética (MONTEIRO-RIVIERE, 2006). Os folículos pilosos e ductos sudoríferos encontrados nesta camada se comunicam com o meio externo através da superfície da pele, constituindo uma rota de passagem de substâncias (via apêndices da pele) (EL MAGHRABY; BARRY; WILLIAMS, 2008).

2.6.2 ADMINISTRAÇÃO CUTÂNEA DE FÁRMACOS

A utilização da pele como via de administração de fármacos é atrativa não apenas pelo seu efeito cutâneo (tratamento local), mas também pela possibilidade de obtenção de efeito sistêmico (terapias transdérmicas) (PRAUSNITZ; MITRAGOTRI; LANGER, 2004). Além disto, a rota de administração transdérmica tem como vantagens a limitada atividade metabólica, quando comparada ao fígado, bem como a possibilidade de se alcançar um perfil contínuo de liberação. A barreira de permeação exercida pelas diferentes camadas da pele representa a principal limitação desta rota de administração (BOUWSTRA et al., 2003). No entanto, diferentes estratégias podem ser utilizadas para reforçar a permeação destes fármacos, que incluem a utilização de promotores químicos, métodos físicos e novos sistemas de liberação (MOSER et al., 2001a).

Geralmente, em preparações dermatológicas, não é desejável que o fármaco alcance a circulação sistêmica, mas que se concentre nas camadas superficiais, possibilitando um efeito local (como acontece com antibióticos, antifúngicos, corticosteróides, retinóides, agentes anti-inflamatórios, anestésicos locais, etc.). É desejável também que os adjuvantes farmacêuticos não penetrem através das camadas da pele, evitando-se interferência com diferentes sistemas orgânicos e garantindo a segurança na utilização destas preparações (BARRY, 2002).

Como o processo de permeação cutânea envolve diferentes etapas que incluem, primeiramente, a liberação do fármaco do veículo, seguida da sua penetração através das barreiras da pele e, por fim, a ativação da resposta farmacológica, todas estas etapas

devem ser otimizadas para garantir a eficácia terapêutica. Adicionalmente, deve-se considerar aspectos relativos à natureza físico-química do fármaco, o tipo de veículo utilizado, às condições da pele, às interações pele/fármaco e pele/veículo (ANSEL; POPOVICH; ALLEN, 2000), entre outros.

Com a finalidade de aumentar a permeação cutânea, objetivando maiores efeitos locais ou sistêmicos, diferentes estratégias podem ser utilizadas para facilitar a penetração de fármacos no estrato córneo ou maximizar o efeito transdérmico. Promotores físico-químicos de penetração [ultrassom, promotores químicos, iontoforese (emprego de corrente elétrica) e eletroporação] têm sido utilizados para reforçar o transporte de fármacos através desta barreira (THONG; ZHAI; MAIBACH, 2007). Tais promotores facilitam o transporte de fármacos através de um ou mais mecanismos: (a) aumento da solubilidade do fármaco (promotores químicos); (b) aumento do coeficiente de difusão (promotores químicos, ultrassom, eletroporação); (c) disponibilidade de forças condutoras adicionais (ultrassom, iontoforese, eletroporação). Embora estes promotores tenham sido utilizados individualmente para melhorar o transporte de fármacos, a combinação dos mesmos tem sido bastante efetiva quando comparada aos efeitos isolados (MITRAGOTRI, 2000). Outros mecanismos de promoção da absorção incluem: (d) extração dos componentes lipídicos, tornando a camada córnea mais permeável; (e) promoção da partição; (f) aumento da fluidez dos lipídeos do estrato córneo e (g) aumento da atividade termodinâmica dos veículos (THONG; ZHAI; MAIBACH, 2007).

O promotor ideal de penetração deve apresentar uma série de características: ser farmacologicamente inerte, atóxico, não irritante e não alergênico; apresentar ação imediata e efeito adequado e previsível; quando da sua remoção, a pele deve recuperar imediata e totalmente sua capacidade normal de barreira; não ocasionar perda de fluidos corporais, eletrólitos ou outros materiais endógenos; apresentar compatibilidade com todos os fármacos e adjuvantes da preparação em questão; admitir variações nas formas farmacêuticas; e, na medida do possível, ser inodoro, insípido, incolor e economicamente viável (BARRY, 2005). No entanto, nenhum material isoladamente apresenta todas estas propriedades desejáveis, o que reforça a necessidade de pesquisas para avaliação da sua segurança.

2.6.3 TRANSPORTE DE MOLÉCULAS ATRAVÉS DA PELE

Com relação aos fenômenos de transporte, fármacos e outras moléculas podem penetrar no estrato córneo através de três rotas: via transcelular, intercelular e pelos apêndices.

A penetração através destes últimos, sob condições normais, não é muito significativa, tendo em vista a baixa predominância dos mesmos na pele (EL MAGHRABY; BARRY; WILLIAMS, 2008). Otberg et al. (2004) mostraram que o número de folículos, o diâmetro de abertura e o volume folicular são fatores que interferem na liberação de fármacos nestes apêndices. Sob condições estacionárias, esta rota normalmente é ignorada para fluxo molecular. No entanto, moléculas muito grandes e partículas de dimensões coloidais podem ter a rota folicular como alvo.

Na via transcelular, as moléculas atravessam as membranas das células e encontram um meio hidrofílico no interior das mesmas. Na rota intercelular, as moléculas interagem com a matriz lipídica intercelular, sem penetrar pelas células (BARRY, 2002) (Figura 3).

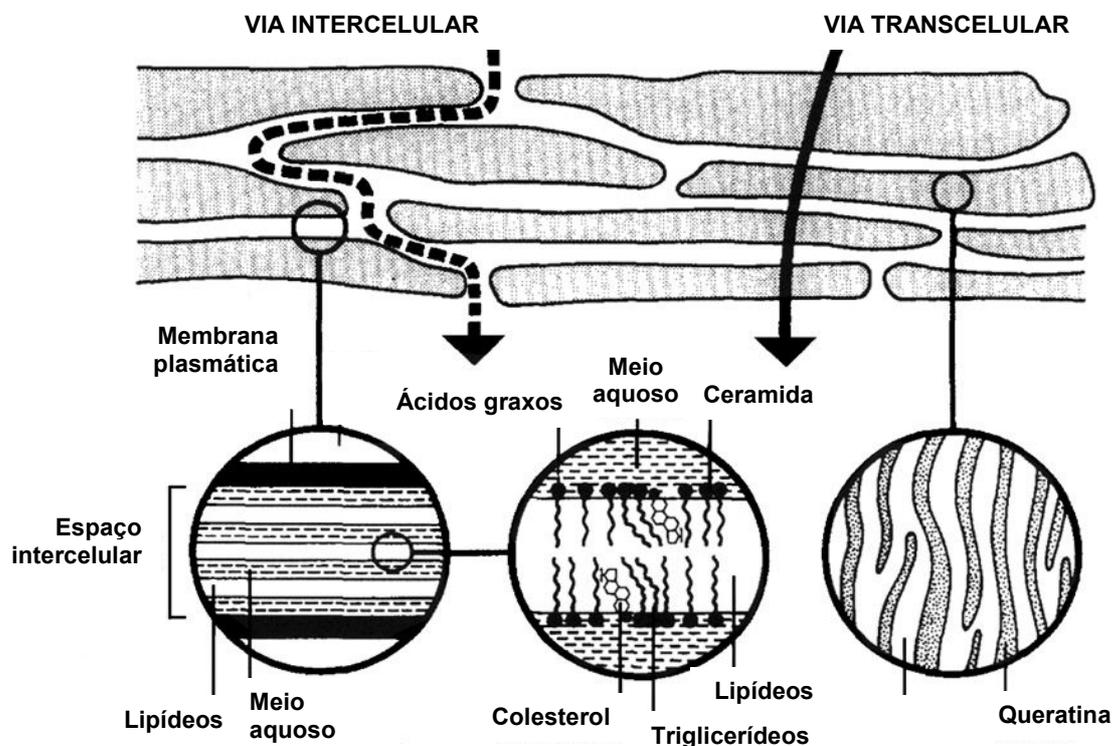


Figura 3: Rotas de penetração de moléculas através do estrato córneo. Fonte: EL MAGHRABY; BARRY; WILLIAMS (2008).

O estrato córneo apresenta características físico-químicas diferenciadas, permitindo a passagem tanto de moléculas hidrofílicas (em menor grau) quanto lipofílicas, mas apenas moléculas de baixo peso molecular, ou seja, abaixo de 600 Da. A matriz de queratina apresenta caráter polar, transferindo substâncias polares, enquanto que as demais estruturas lipídicas seriam responsáveis pelo transporte de moléculas de caráter hidrofóbico (PRISTA; BAHIA; VILAR, 1992).

Segundo Welling (1997), as moléculas hidrofóbicas atravessariam as membranas com maior velocidade que as hidrofílicas, em função da constituição lipídica da maioria das

membranas. No entanto, esta afirmação deve ser avaliada com cautela, pois as características de cada fármaco podem influenciar a taxa de penetração, tais como os coeficientes de partição e de difusão, tamanho e forma das moléculas (BARRY, 2002).

Adicionalmente, foi sugerido que as ligações de hidrogênio do soluto com a pele representariam o fator determinante da difusividade do soluto no estrato córneo, contrariamente ao “dogma” de que a lipofilicidade é quem determina o transporte de fármacos através da epiderme (ROBERTS; PUGH; HADGRAFT, 1996).

Akomeah; Martin; Brown (2007) explicaram que a grande variabilidade dos coeficientes de permeabilidade observada para solutos polares poderia ser explicada pelas diferenças de interação com os sítios ligantes da pele, ocorrendo interação entre estas moléculas e os grupos polares dos lipídeos intercelulares da pele.

Em relação aos fenômenos de transporte, as moléculas são transferidas do meio externo para o estrato córneo através de difusão passiva, sem gasto energético (ocorre espontaneamente). Não há ocorrência de transporte ativo e nem de outra modalidade de transporte mediada por carreadores/proteínas transportadoras nesta camada, devido à sua constituição (AKOMEAH et al, 2004). Embora a concentração diferencial seja usualmente considerada a força motriz da difusão, o gradiente de potencial químico e o de atividade termodinâmica são realmente os parâmetros fundamentais (BARRY, 2002).

Nas situações em que o fluxo do soluto é proporcional ao seu gradiente de concentração, pode-se explicar a permeação do fármaco através das Leis de Fick. A primeira Lei de Fick indica que a taxa de transferência do soluto difundida por unidade de uma secção de tecido é proporcional ao seu gradiente de concentração, conforme a equação (1):

$$J = dm/dt = -D dC/dx$$

(equação 1)

Onde:

O fluxo (J) do fármaco, expresso em termos de massa (dm) transportada em determinado tempo (dt), através de um plano por unidade de área (DdC/dx), fornece o gradiente de concentração (D), que é o coeficiente de difusão expresso em unidades de área por unidade de tempo. O sinal negativo indica que o fluxo está na direção da redução do gradiente de concentração (BARRY, 2002).

No entanto, a primeira Lei de Fick também descreve o processo de difusão sob condições de estado estacionário, ou seja, quando o gradiente de concentração (dC/dx) não varia com o tempo. Esta situação é aplicável apenas para membranas artificiais homogêneas, não sendo observável em membranas biológicas heterogêneas, tal como o estrato córneo. Na determinação experimental da quantidade de fármaco permeada em

função do tempo, observa-se que esta relação não é totalmente linear, como se esperaria na abordagem do estado estacionário. Na realidade, observa-se, nos tempos iniciais, uma pequena curvatura, onde não há constância do fluxo em relação ao tempo. Este tempo necessário para que a passagem de um fármaco, através de uma membrana, atinja o equilíbrio é definido como *lag time* ou tempo de latência, obtido através da extrapolação da linha do estado estacionário até o eixo do tempo. Desta forma, o processo de difusão em membranas biológicas pode ser melhor explicado pela segunda Lei de Fick (equação 2), que expressa a velocidade de alteração da concentração do fármaco em função do tempo e da área, ou seja, duas variáveis importantes na determinação do coeficiente de difusão (NETZ; ORTEGA, 2002).

$$(dm/dt) = - DC_0K / h \quad (\text{equação 2})$$

Onde:

C_0 é a concentração constante do fármaco na solução doadora,
 K é o coeficiente de partição do soluto entre o veículo e a membrana,
 h é a espessura da membrana.

2.6.4 MODELOS PARA AVALIAÇÃO DA PERMEAÇÃO CUTÂNEA DE FÁRMACOS

O desenvolvimento de formulações dermatológicas e transdérmicas exige estimativas prévias da taxa e da extensão de penetração do(s) composto(s) e adjuvante(s), através da pele. Modelos *in vivo* e *ex vivo* podem ser utilizados com este propósito (MUHAMMAD; RIVIERE, 2006).

Dentre os métodos *in vivo* utilizados nos estudos de permeação, a microdiálise e *tape stripping* tem maior relevância, considerando-se sua aplicabilidade nos estudos de bioequivalência e biodisponibilidade tópicas. Na microdiálise, sondas são inseridas na derme e perfundidas com solução tampão, que permite a troca de substâncias com o meio extracelular, através de um sistema passivo de difusão, e simula o fluxo sanguíneo neste local. A principal vantagem deste método é a capacidade de monitoramento contínuo da concentração extracelular de fármacos, em diferentes compartimentos corporais. Em experimentos com humanos, vários sítios de amostragem podem ser criados e utilizados para determinar a penetração do fármaco na pele, o efeito de diferentes veículos, o metabolismo cutâneo, bem como o impacto de perturbações nesta barreira. Esta técnica é pouco invasiva e provoca pequeno trauma, geralmente reversível, quando da inserção da cânula, que pode ser evitado por tratamento prévio da área experimental com anestésico local (HERKENNE et al., 2008).

O método do *tape stripping* envolve a remoção sequencial de camadas microscópicas (de 0,5 a 1 mm) do estrato córneo. Esta técnica não é invasiva (apenas

células mortas dispostas na matriz lipídica são removidas) e pode ser utilizada para determinar o perfil de concentração de um fármaco, em função da profundidade da pele (MUHAMMAD; RIVIERE, 2006).

A validade do *tape stripping* é questionada por alguns pesquisadores, em função de suas limitações. A principal delas reside na incapacidade de quantificação do fármaco em camadas subjacentes ao estrato córneo. A área de contato do fármaco ou adjuvante com o estrato córneo deve ser limpa para a remoção do excesso do mesmo, sem redirecionamento para o interior da barreira, o que poderia comprometer os resultados. Por isto, deve-se adotar procedimentos padronizados de limpeza para evitar a remoção do estrato córneo (aumentando as chances de reprodutibilidade). Além disto, a quantidade de estrato córneo removido por *tape stripping* depende de parâmetros, tais como tipo de adesivo utilizado, pressão aplicada e força de remoção, assim como diferenças na estrutura do estrato córneo inter-indivíduos e intersazonais (BASHIR et al., 2001). O veículo utilizado também pode ter efeito significativo na coesão dos corneócitos e na adesão dos mesmos na fita adesiva, o que exige complementação com outras técnicas, tais como as espectroscópicas para a determinação da quantidade de corneócitos nas fitas (JACOBI et al., 2005).

Considerando-se as dificuldades éticas e econômicas associadas à realização de ensaios clínicos, diferentes modelos animais têm sido desenvolvidos com o intuito de estimar a permeação cutânea em humanos. Embora a estrutura básica da pele humana seja similar a de muitos mamíferos, diferenças intra e inter-espécies são observáveis, tanto relativas à espessura da epiderme e da derme, quanto aos apêndices (MONTEIRO-RIVIERE, 1991).

Dentre os modelos animais, a pele de porco tem sido amplamente utilizada em função da sua similaridade estrutural e funcional com a pele humana, aliada à praticidade de obtenção deste material em abatedouros. Características comuns entre as peles humana e suína incluem a distribuição esparsa dos pêlos, pigmentação e vascularização, bem como composição lipídica e propriedades biofísicas do estrato córneo (MUHAMMAD; RIVIERE, 2006). Diversos estudos demonstraram que a permeação de fármacos é bastante similar entre ambas (CHANG et al., 1994; SCHMOOK et al., 2001; HERKENNE et al., 2006).

Embora os modelos *in vivo* apresentem vantagens relativas aos estudos de biodisponibilidade, algumas limitações (citadas anteriormente) e desvantagens (utilização de grande número de animais vivos, diferenças de permeabilidade entre as espécies; questão ética) têm impulsionado o desenvolvimento de metodologias *ex vivo*, cujos resultados sejam correlacionáveis com dados obtidos *in vivo* (MONTEIRO-RIVIERE, 1991).

Desta forma, a utilização das câmaras de difusão também representa uma alternativa interessante para estudos de permeação cutânea de fármacos e adjuvantes, pois permite a avaliação do metabolismo da pele, quando houver manutenção da viabilidade da mesma.

Além disso, não há interferência metabólica de enzimas de outros locais do corpo, em função do isolamento do tecido (BRONAUGH, 2006). Adicionalmente, pode-se calcular os valores de fluxos e os coeficientes de partição e de difusão dos fármacos e adjuvantes, além de se poder melhor controlar as variáveis experimentais (BARRY, 2002).

2.7 MODELO DE DIFUSÃO DA CÂMARA DE FRANZ

O modelo de difusão da câmara de Franz (Figura 4), também chamado de modelo estático, representa uma opção de ampla aplicabilidade para estudos de permeabilidade e permeação *ex vivo* (FRANTZ, 1990). Após o preparo do tecido (seccionamento da porção de interesse), este é colocado entre dois compartimentos, denominados de compartimento doador (ou superior) e receptor (ou inferior). O epitélio da mucosa ou o estrato córneo da pele encontra-se voltado para o compartimento doador, enquanto que o tecido conectivo (na mucosa) ou derme (na pele) para o receptor. O compartimento receptor é preenchido com uma solução, geralmente tamponante, evitando-se a formação de bolhas, já que as mesmas alteram a área de difusão. No compartimento superior é colocada uma solução do fármaco ou qualquer outro material-teste. Os experimentos são realizados geralmente a 37° C (temperatura corporal), e sob agitação constante e controlada. Alíquotas da solução receptora são coletadas, em diferentes tempos, e efetua-se a quantificação do fármaco ou adjuvante farmacêutico. As metodologias para quantificação mais utilizadas são técnicas espectrofotométricas e cromatográficas. Após a quantificação, os parâmetros de permeabilidade são calculados (SHOJAEI; BERNER; XIAOLING, 1998; MASHRU et al., 2005; MOHAMMADI-SAMANI; BAHRI-NAJAFI; YOUSEFI, 2005).

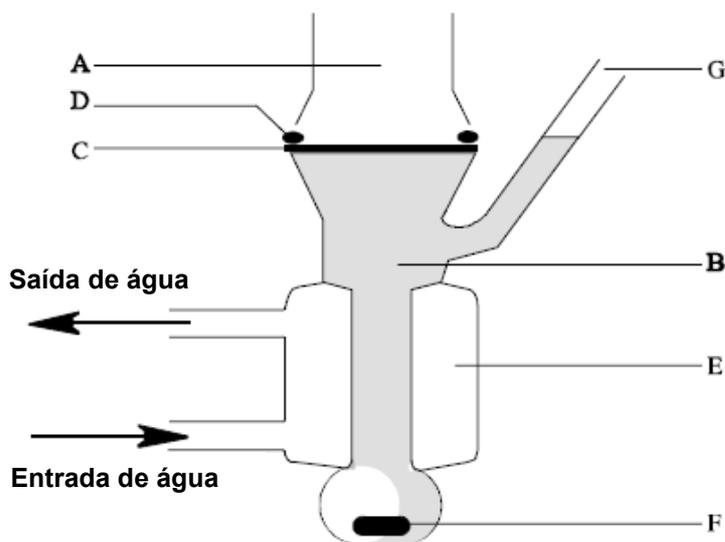


Figura 4: Esquema da câmara de difusão de Franz.
 A = compartimento doador
 B = compartimento receptor
 C = tecido
 D = suporte esmerilhado
 E = compartimento para circulação da água com controle da temperatura (37°C)
 F = barra magnética
 G = cânula de amostragem
 Fonte: Hanso Research (2007)

A câmara de Franz apresenta algumas vantagens e desvantagens em relação a outros modelos disponíveis no mercado. A formação de bolhas de ar, no compartimento receptor, durante a retirada da amostra representa uma destas desvantagens (CLOWES; SCOTT; HEULINGS, 1994). Outra desvantagem é a necessidade de agitação constante, a fim de garantir uma solução receptora homogênea (FRANTZ, 1990). Uma vantagem importante da parede dupla do compartimento inferior por onde circula água a 37°C é o controle da temperatura da solução receptora (TOJO, 1987). No entanto, estas dificuldades podem ser superadas, tal como aconteceu quando da fabricação do equipamento que foi utilizado nesta dissertação (Apêndice A).

2.8 SISTEMA DE CLASSIFICAÇÃO BIOFARMACÊUTICA

O Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB), proposto por Gordon Amidon e colaboradores (1995), assume que tanto a solubilidade quanto a permeabilidade são parâmetros-chave que controlam a absorção intestinal dos fármacos. Esta classificação propõe a subdivisão dos fármacos em quatro categorias:

- Classe I: fármacos de alta solubilidade e alta permeabilidade.

Considerando que fármacos desta classe são rapidamente absorvidos, o fator limitante da absorção é a dissolução do fármaco a partir da forma farmacêutica ou o esvaziamento gástrico.

- Classe II: fármacos de baixa solubilidade e alta permeabilidade.

Neste caso, a dissolução é o fator limitante à absorção do fármaco no organismo. Assim, a escolha adequada do meio e do método de dissolução *in vitro* propiciará maior correlação com dados *in vivo*.

- Classe III: fármacos de alta solubilidade e baixa permeabilidade.

O perfil de dissolução pode até ser bem definido, mas a absorção *in vivo* é dependente da permeabilidade do fármaco nas membranas, e a probabilidade de correlação *in vitro* - *in vivo* é baixa. Em outras palavras, mesmo que a dissolução seja rápida, as variações encontradas serão devido ao trânsito intestinal, conteúdo luminal e permeabilidade da membrana, e não a fatores relacionados à formulação.

- Classe IV: fármacos de baixa solubilidade e baixa permeabilidade.

Fármacos desta classe apresentam sérios problemas para administração oral.

A apresentação desta SCB não teve como objetivo a extrapolação destes dados para explicar a permeabilidade nas mucosas bucal e esofágica, mas reunir critérios racionais para a escolha dos fármacos a serem testados nestas mucosas. Para a realização dos estudos de permeabilidade, objeto desta dissertação, através das mucosas suínas bucal e

esofágica, a escolha de um fármaco da classe II parece ser interessante, devido à possibilidade de maior correlação dos dados *in vitro* & *in vivo*. Considerando que os fármacos da classe IV apresentam problemas quando administrados pela via oral convencional, o estudo de rotas alternativas para administração dos mesmos também parece ser interessante. Desta forma, selecionou-se a carbamazepina (classe II) e o acetono de triancinolona (classe IV) para a padronização do modelo de difusão *ex vivo* da câmara de Franz para estudos de permeabilidade e permeação de fármacos, adjuvantes e preparações farmacêuticas, a serem realizados futuramente no Laboratório de Virologia da UFSC.

2.8.1 CARBAMAZEPINA

A fórmula estrutural da carbamazepina (CBZ) é $C_{15}H_{12}N_2O$ (Figura 5) e seu peso molecular é de 236,3 g/mol. Apresenta-se como um pó cristalino branco amarelado, com ponto de fusão entre 189°C a 193°C, praticamente insolúvel em água e éter, levemente solúvel em etanol e acetona, solúvel em clorofórmio e propilenoglicol (MOFFAT; OSSELTON; WINDDOP, 2004).

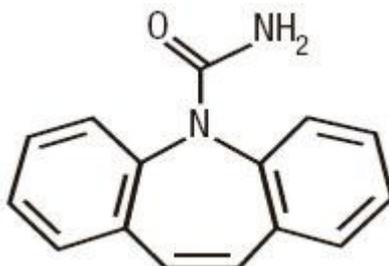


Figura 5: Estrutura química da carbamazepina.

A CBZ apresenta, pelo menos, quatro formas polimórficas (I, II, III e IV) e uma forma diidrato. O polimorfismo reflete a existência de diferentes estruturas cristalinas que, embora quimicamente semelhantes, podem diferir nas suas propriedades físico-químicas, tais como diferentes pontos de fusão, reatividade química, taxas de dissolução e de biodisponibilidade (RUSTICHELLI et al., 2000). A CBZ anidra tem solubilidade cerca de 2X maior que a forma diidrato. Contudo, a forma anidra isolada, em contato com a água, converte-se na forma diidrato (NAIR; GONEN; HOAG, 2002). Segundo Giannola et al. (2005), nas formulações sólidas convencionais, os polimorfos da CBZ coexistem, implicando em maior flutuação na sua absorção. Assim sendo, o reconhecimento da existência de diferentes polimorfos e a evidência de comportamentos físico-químicos diferenciados reforçam a importância da identificação da amostra a ser estudada previamente à realização dos experimentos.

Com relação à utilização terapêutica, a CBZ é o fármaco de primeira escolha para o tratamento da neuralgia do trigêmeo e profilaxia das crises epiléticas, agindo pré e pós-sinápticamente, diminuindo a condutância dos canais de sódio/potássio e suprimindo a atividade espontânea periférica ectópica das fibras Ad e C. Existem diversas restrições para sua utilização, particularmente quando associada a fármacos que sofrem metabolização hepática, através do citocromo P450, além de ser contra-indicada para pacientes diabéticos e pacientes idosos (RANG; DALE; RITTER, 2001). Os efeitos adversos mais comuns são sedação excessiva e ataxia, mas há relatos de um efeito adverso raro, porém sério, a anemia aplásica irreversível. Há necessidade de monitoramento regular das funções hematológicas e hepáticas (ROWBOTHAM, 2005).

Conforme mencionado anteriormente, segundo o SCB, a CBZ pertence à classe II, que inclui compostos que apresentam alta permeabilidade e baixa solubilidade em água. Assim, a biodisponibilidade de compostos desta classe é limitada pela solubilidade (NAIR; GONEN; HOAG, 2002) e, neste caso particular, é bastante irregular e lenta. Além disso, durante terapia crônica, observa-se redução do tempo de meia-vida da CBZ, devido ao metabolismo auto-induzido (o próprio fármaco induz sua biotransformação) (USP 30, 2007).

Estas limitações relativas à solubilidade, picos plasmáticos irregulares, metabolismo auto-induzido, bem como problemas de biodisponibilidade, estimularam a pesquisa de novas estratégias terapêuticas. Neste sentido, Wolf et al. (1992) desenvolveram formulações de liberação sustentada com a idéia de reduzir o número de doses, bem como o nível sérico de flutuações, visando à melhor eficácia terapêutica e redução da toxicidade. Koester et al. (2004) desenvolveram um complexo de carbamazepina e β -ciclodextrina, em matriz de hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) e demonstraram que esta estratégia, não apenas aumentou a solubilidade aquosa da CBZ (em aproximadamente 7X), como também permitiu um maior controle da sua liberação. A dissolução *in vitro* revelou que comprimidos com matriz de HPMC possibilitaram um maior controle do perfil de liberação, quando comparado à liberação da formulação de referência.

Outra possibilidade, frente a tais limitações, é o estudo de vias alternativas para administração deste fármaco. A mucosa bucal representa uma opção interessante, pois além de se poder modular a absorção da CBZ (mediante utilização de promotores de permeabilidade), poder-se-ia evitar o metabolismo de primeira passagem (reduzindo interações medicamentosas). A princípio, estas vantagens resultariam em maior biodisponibilidade e na redução da dose, diminuindo riscos de intoxicação (devido ao seu baixo índice terapêutico).

Neste sentido, Ikinci et al. (2000) prepararam comprimidos mucoadesivos de liberação controlada de CBZ, utilizando o glicodeoxicolato como promotor de permeabilidade. Os resultados não foram interessantes, já que não foram obtidos níveis

plasmáticos satisfatórios de CBZ, tanto na presença quanto na ausência do promotor.

Contrariamente a estes estudos, Giannola et al. (2005) demonstraram a capacidade da CBZ de atravessar a mucosa bucal humana, através de experimentos *ex vivo* conduzidos em câmaras de difusão de Franz, e de penetrar o epitélio oral humano, através de experimentos *in vitro*, com linhagens celulares TR146 e sistema de difusão celular, através de insertos. Além disto, eles desenvolveram três diferentes formulações de comprimidos (com microesferas e matrizes revestidas e mistura física dos componentes através da compressão) e os resultados demonstraram diferenças nos perfis de liberação da CBZ, entre estas formulações, os autores concluíram, então, que a administração da CBZ, através da mucosa suína bucal é uma estratégia viável. Todos os resultados foram expressos em função de parâmetros de permeabilidade, particularmente valores de fluxo e coeficientes de permeabilidade.

Estes resultados promissores, aliados aos raros estudos utilizando a mucosa bucal para administração de formulações contendo CBZ, revelam oportunidades para novos estudos, bem como servem de estímulo para a realização de ensaios *in vivo* (inicialmente em animais), complementando as informações sobre biodisponibilidade e perfil de liberação de tais formulações.

2.8.2 ACETONIDO DE TRIANCINOLONA

A fórmula estrutural do acetonido de triancinolona (AT) é $C_{24}H_{31}FO_6$ (Figura 6) e seu peso molecular é de 434,5 g/mol. Apresenta-se como um pó cristalino branco, com ponto de fusão entre 292°C a 294°C, ligeiramente solúvel em água, pouco solúvel em etanol e metanol, exibindo maior solubilidade em acetona e clorofórmio (MOFFAT; OSSELTON; WINDDOP, 2004).

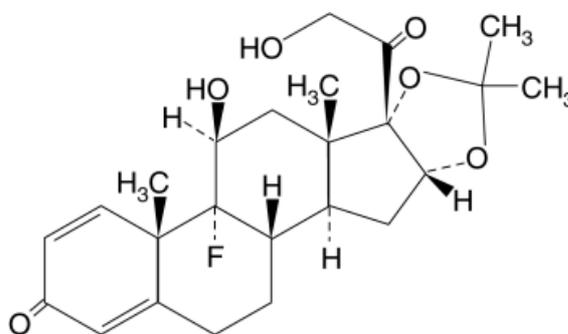


Figura 6: Estrutura química do acetonido de triancinolona.

Tendo em vista a baixa solubilidade deste fármaco em água (17,5 µg/mL a 28°C), diferentes sistemas de cosolventes podem ser utilizados para reforçar sua solubilidade, sem interferir na sua estabilidade. A decomposição do AT em etanol-água apresenta-se

cineticamente como uma reação de pseudo primeira-ordem, dependente do pH e da força iônica do meio. A taxa de decomposição diminui com o aumento da força iônica em pHs superiores a 7. Assim sendo, agentes tamponantes podem ser adicionados nas formulações contendo AT para reforçar sua estabilidade (UNGPHAIBOON et al., 2005).

Com relação à utilização terapêutica, o AT é efetivo no alívio de sinais e sintomas de muitas condições inflamatórias orais, particularmente a estomatite aftosa (NIZOLAZZO; REED; FINNIN, 2005) e o líquen plano (VINCENT, 1991).

Desta forma, a aplicabilidade terapêutica do AT em doenças da mucosa bucal tem estimulado estudos de permeabilidade deste fármaco, através da mesma (ADDY, 1980; SHIN; BUM; CHOI, 2000; SHIN; KIM, 2000;; UNGPHAIBOON; MAITANI, 2001; NICOLAZZO; REED; FINNIN, 2005). A maior parte destes estudos teve como objetivo evidenciar um efeito local, considerando a baixa absorção sistêmica do fármaco, reduzindo as chances de interação com outros sistemas e o aparecimento de efeitos adversos.

Os resultados destes e de outros estudos envolvendo matrizes poliméricas com potencial efeito adesivo contribuíram para a elaboração do primeiro medicamento bio/mucoadesivo - o Aftach®, disponível no mercado europeu. Os comprimidos de Aftach® são indicados para o tratamento da estomatite aftosa, sendo representados por discos constituídos por dupla camada: uma camada adesiva branca contendo a substância ativa e outra camada colorida como suporte, para promover a adesão. Considerando sua capacidade de fixação na área afetada, o Aftach® demonstrou, quando comparado com preparações convencionais, um grande poder de adesão e maior eficácia terapêutica (AFTACH, 2003).

2.9 PARABENOS

Os parabenos representam uma série homóloga de antimicrobianos comumente utilizados como conservantes em alimentos, cosméticos e medicamentos. São derivados da esterificação do ácido *p*-hidroxibenzoico, na posição C4. Esta esterificação inclui os grupos metil, etil, propil, butil, heptil e octil (Figura 7) (LAKERAM et al., 2007).

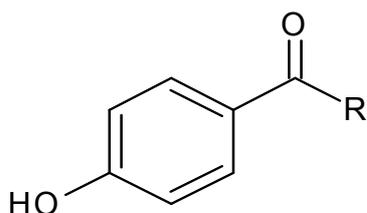


Figura 7: Estrutura química dos ésteres do ácido *p*-hidroxibenzoico, onde R = metilparabeno (O-CH₃), etilparabeno (O-C₂H₅), propilparabeno (O-C₃H₇), butilparabeno (O-C₄H₉), heptilparabeno (O-C₇H₁₅), ocitilparabeno (O-C₈H₁₇).

A utilização de conservantes é requerida em muitas formulações farmacêuticas e produtos cosméticos, objetivando prevenir o crescimento de microorganismos (EL HUSSEIN

et al., 2007). Dados sobre a composição dos produtos dermocosméticos revelaram que a extensão da utilização dos parabenos, isolados ou em combinação, ultrapassa 13.200 produtos (SONI et al., 2002). Eles apresentam efeito inibitório, tanto sobre o transporte de membrana microbiano quanto sobre as funções mitocondriais (EL HUSSEIN et al., 2007), que aumenta com o aumento do grupo alquil (PEDERSEN et al., 2007).

Formulações semi-sólidas a serem aplicadas na pele podem apresentar diversos outros adjuvantes, além dos parabenos, tais como surfactantes, solubilizantes, estabilizantes e agentes reológicos. Nestas formulações, geralmente deseja-se alta permeação do fármaco e ausência de penetração transdérmica dos adjuvantes, considerando-se que a permeação destes últimos pode ser potencialmente nociva. Diversos adjuvantes de formulações cosméticas e farmacêuticas são considerados seguros em função da sua baixa permeação na pele, devido ao alto peso molecular e/ou ao caráter hidrofóbico destas substâncias. Contrariamente, outros são altamente permeados através da pele, como é o caso dos parabenos, pois devido ao seu baixo peso molecular e elevada lipofilicidade (Quadro 1), eles são capazes de penetrar e permear facilmente pela pele. Além disto, foi demonstrado recentemente que a limitada atividade metabólica destas moléculas na pele permite que as mesmas alcancem a circulação sistêmica (NICOLI et al, 2008).

Quadro 1: Características físico-químicas de alguns parabenos.

	Peso molecular (g/mol)	log $K_{oct/a}$ *	Solubilidade em água (mg/mL)
Metilparabeno (MP)	152,15	1,93	2,13 ± 0,12
Etilparabeno (EP)	166,18	2,27	1,16 ± 0,21
Propilparabeno (PP)	180,20	2,81	0,37 ± 0,03
Butilparabeno (BP)	194,23	3,57	0,158 ± 0,014

* Coeficiente de partição octanol:água. Fonte: NICOLI et al. (2008)

Esta absorção sistêmica talvez explique os resultados obtidos por Darbre et al. (2004), que conseguiram quantificar ésteres intactos (MP, EP, PP, BP) em tecidos de câncer de mama, estimulando discussões internacionais. Embora a presença destas substâncias não tenha um papel funcional nos processos desta patologia, estes achados estimularam revisões sobre a segurança da utilização dos parabenos, em diferentes produtos. Além disto, eles foram confirmados por Ye et al. (2006), que quantificaram ésteres de parabenos também na urina humana. O fato de que os parabenos encontrados poderiam ser originados de aplicações tópicas de produtos cosméticos foi, ainda, comprovado por Janjua et al.

(2007), que demonstraram que os parabenos alcançam o sistema sanguíneo, através de uma única aplicação cosmética tópica.

Adicionalmente, estudos realizados, tanto em culturas celulares quanto em modelos animais, demonstraram a capacidade dos parabenos de modificar importantes funções fisiológicas. Por exemplo, no sistema endócrino, eles agiram como agonistas dos receptores de estrógeno, antagonistas dos receptores de andrógeno ou como inibidores das enzimas sulfotransferases. Além disto, eles poderiam modificar funções mitocondriais e lisossomais, causando danos ao DNA e potencializando os danos induzidos pelos raios ultravioleta tipo B, através da produção de espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico (DARBRE; HARVEY, 2008).

Neste sentido, deve-se intensificar os estudos relativos aos riscos decorrentes da utilização de produtos que contenham parabenos, particularmente cosméticos, tendo em vista o longo período de exposição, bem como a frequência de utilização dos mesmos. El Hussein et al. (2007) sugeriram a utilização de modelos *ex vivo* de penetração e permeação cutânea para realizar tais estudos, por questões éticas e por serem bastante viáveis, vantagens essas de extrema importância para a avaliação da segurança de adjuvantes. Além disto, o modelo da câmara de Franz permite uma quantificação precisa dos componentes testados, além de ser de baixo custo e apresentar reprodutibilidade.

A redução da penetração/permeação dos parabenos através da pele representa uma alternativa interessante a ser avaliada e diferentes estratégias podem ser utilizadas: aplicação de uma barreira externa na superfície da pele; aplicação de ceramidas ou seus análogos para reforçar a barreira do estrato córneo; utilização de retardadores de permeação, que promovem maior ordenamento dos lipídeos tornando o estrato córneo mais impermeável, entre outros. Contudo, tal redução deve ocorrer sem interferir na penetração/permeação cutânea do(s) composto(s) ativo(s) (NICOLI et al, 2008).

Outro ponto a ser explorado refere-se à possibilidade de interação dos parabenos entre si, bem como dos parabenos individuais com outros componentes da formulação. O entendimento destas associações é interessante, visto que, em muitas formulações, os parabenos são combinados para potencializar o efeito antimicrobiano (MEYER et al., 2007), e, na literatura consultada, não foram encontrados estudos avaliando a influência de diferentes combinações dos parabenos na permeação *ex vivo* através da pele.

2.10 MÉTODOS DE QUANTIFICAÇÃO

Anteriormente aos estudos de permeabilidade e permeação através de mucosas e da pele, é necessário o desenvolvimento de um método analítico para a quantificação da substância(s) ativa(s) ou de qualquer outro material-teste. O esforço despendido na escolha

e validação do método analítico dependerá, tanto das questões a serem respondidas neste estudo, bem como do propósito dos dados gerados. Para avaliações rotineiras, métodos rápidos de triagem, como espectrofotometria na região do UV, podem ser utilizados. Contudo, se uma elucidação detalhada do fenômeno de transporte é requerida, ou se os dados serão utilizados em processos de solicitação de registro de um produto, métodos sensíveis e validados devem ser utilizados.

Métodos cromatográficos, tal como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), são bastante utilizados para a separação e quantificação de compostos ativos e metabólitos em fluidos biológicos (HASSAN et al., 2008; LIANG et al., 2008; RHIM et al., 2008; ZIELONKA; HARDY; KALYANARAMAN, 2009). No entanto, nos últimos anos, a eletroforese capilar (EC) está se consagrando como uma técnica analítica de grande utilidade (PIZARRO et al., 2002; JAWORSKA; SZULINSKA; WILK, 2005). Devido ao fato da CLAE ser uma metodologia bastante conhecida, esta revisão bibliográfica abordará somente a EC, que é menos difundida em análises de rotina.

2.10.1 ELETROFORESE CAPILAR

O rápido avanço da eletroforese capilar (técnica baseada na migração diferencial de compostos iônicos ou ionizáveis, quando submetidos a um campo elétrico), na indústria farmacêutica, decorre principalmente da variedade de modos de separação que pode ser efetuada em uma única coluna capilar e da diversidade de compostos passíveis de análise em cada modo (TAVARES, 1997). Os equipamentos de EC e CLAE convencionais apresentam custos equivalentes, mas o custo operacional é significativamente menor na EC, principalmente devido ao baixo consumo de solventes e ao baixo custo das colunas capilares (PERRETT, 2003).

O sistema básico da EC (Figura 8) consiste de uma fonte de alta tensão, capilares (geralmente de sílica fundida), eletrodos (geralmente de platina) e um detector apropriado (UV/Vis é o mais utilizado, no entanto, exige que o analito apresente grupos cromóforos). A fonte de alta tensão é utilizada para estabelecer um campo elétrico no capilar, que é conectada, através dos eletrodos, a dois reservatórios contendo o eletrólito de corrida. Os capilares de sílica fundida são preenchidos com uma solução tampão, funcionando como um canal de migração. Estes tubos, além de possibilitarem uma dissipação eficiente do calor (gerado pela passagem da corrente elétrica) suportam campos elétricos elevados, que garantem maior eficiência na separação, em tempos de análise relativamente curtos. Por fim, as extremidades dos capilares são imersas nos reservatórios da solução tampão para completar o contato elétrico e eles são mantidos à temperatura constante, para minimizar efeitos térmicos (TAVARES, 1997).

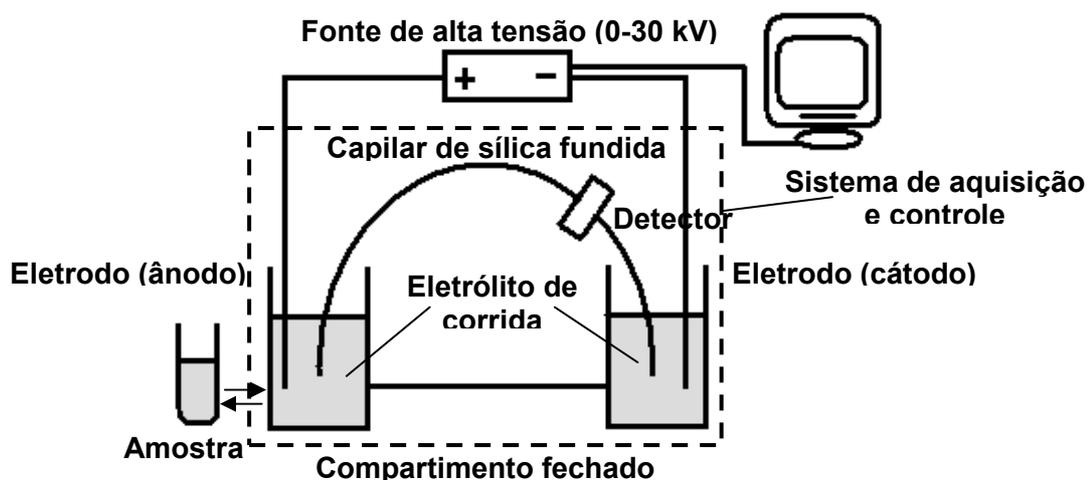


Figura 8: Esquema do equipamento de eletroforese capilar.
Fonte: Elaborado com base no esquema de Tavares (1997).

Na EC, é comum a presença do fluxo eletrosmótico, que pode contribuir para a separação, ou pode ser completamente indesejável. Em capilares de sílica fundida, o contato com soluções de $\text{pH} > 2$ promove desprotonação dos grupamentos silanol (SiOH) da superfície dos mesmos, conferindo carga negativa à parede. Para contrabalancear as cargas negativas da parede do capilar, os grupos silanoato (SiO^-) atraem cátions do eletrólito, formando uma camada (fixa) destinada a estabilizar as cargas negativas da parede do capilar que, por atração eletrostática, permanece imobilizada. Devido ao excesso de cargas negativas, uma segunda camada de cátions (móvel) é formada, dando origem ao modelo da dupla camada elétrica. A aplicação do campo elétrico ao longo do capilar causa a movimentação dos cátions hidratados da camada móvel em direção ao eletrodo de carga oposta, no caso, o negativo. Durante a migração, os íons transportam moléculas do solvente, induzindo um fluxo da solução, conhecido como fluxo eletrosmótico. Como consequência, tal fluxo permite uma separação muito eficiente, em comparação às técnicas que empregam pressão para bombeamento dos fluidos, cujo perfil de velocidade radial é parabólico (sendo mais frequente o alargamento dos picos nestes casos) (SILVA et al., 2007).

A Eletroforese Capilar em Zona (ECZ) é um dos modos de separação eletroforética mais utilizado, provavelmente em razão da sua facilidade de implementação e otimização das condições experimentais. Neste caso, o tubo capilar é preenchido com um eletrólito, geralmente com características tamponantes. A separação ocorre como resultado de duas estratégias: maximização das diferenças entre as mobilidades efetivas dos solutos e minimização das causas de alargamento das zonas (TAVARES, 1997).

A análise de fármacos em fluidos biológicos, como nos experimentos *ex vivo* de permeabilidade/permeação de fármacos e adjuvantes, através das mucosas e pele, requer a

obtenção de baixos limites de detecção e quantificação. Considerando que a EC, em comparação à CLAE, apresenta como principal desvantagem uma menor sensibilidade, diversas estratégias podem ser desenvolvidas para contornar este problema: pré-concentração da amostra; precipitação protéica; extração líquido-líquido; pré-tratamento com extração em fase sólida; e otimização das técnicas de injeção (ALTRIA, 1999). O procedimento de pré-concentração pode aumentar a sensibilidade da técnica em até 100X, tornando-a útil quando limites de detecção bastante baixos são necessários (MANETTO et al., 2000). A menor precisão de injeção da amostra na EC, comparativamente à CLAE, ressalta a importância da utilização de um padrão interno, como forma de eliminar esta variação (ALTRIA, 1999).

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Padronizar, no Laboratório de Virologia Aplicada da USFC, o modelo de difusão *ex vivo* da câmara de Franz para estudos de permeabilidade e permeação de fármacos e adjuvantes farmacêuticos, através das mucosas bucal e esofágica, e da pele de suínos.

3.2 ESPECÍFICOS

- Obter as mucosas bucal e esofágica e a pele da orelha de porcos, em condições tais que a integridade dos tecidos seja mantida durante os experimentos.
- Padronizar a câmara de difusão de Franz como modelo para os estudos de permeabilidade e permeação de fármacos e adjuvantes farmacêuticos, considerando variáveis, tais como dimensões da câmara, temperatura, agitação, área de difusão e espessura do tecido.
- Selecionar os métodos analíticos apropriados para a quantificação das amostras, validando-os de acordo com literaturas oficiais.
- Avaliar a permeabilidade *ex vivo* de fármacos de baixa e alta permeabilidade (AT e CBZ), nas mucosas bucal e esofágica, candidatos a administração através da mucosa bucal.
- Para a carbamazepina, comparar os resultados dos estudos de permeabilidade *ex vivo*, variando-se os métodos analíticos.
- Avaliar o efeito da adição de promotores químicos na permeabilidade do acetono de triancinolona, através das mucosas suínas bucal e esofágica, visando melhorar a absorção da mesma.
- Avaliar a permeação cutânea dos parabenos isolados e em associação, através da pele de orelha de porco.
- Verificar a influência dos coeficientes de partição (K) e de difusão (D) na permeação dos parabenos, através de modelos matemáticos previamente descritos.
- Calcular os parâmetros de permeabilidade e permeação (fluxo, coeficiente de permeabilidade e tempo de latência) para fins de comparação com dados da literatura.
- Correlacionar os valores de permeabilidade encontrados para as mucosas bucal e esofágica.
- Avaliar a viabilidade tecidual das mucosas bucal e esofágica, através de técnicas histológicas.
- Verificar o efeito do congelamento na viabilidade tecidual das mucosas bucal e esofágica, correlacionando-o com os experimentos de permeabilidade.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 AMOSTRAS

As matérias-primas empregadas nos experimentos *ex vivo* apresentavam grau de pureza farmacêutico. As caracterizações da carbamazepina e do acetonido de triancinolona foram efetuadas para a garantia da qualidade destes fármacos, considerando a presença de formas polimórficas para os mesmos.

Os testes de identificação da CBZ, obtida da indústria farmacêutica Henrifarma, foram realizados por Regina Kelmann, no Laboratório de Controle de Qualidade da UFSC, conforme descrito nas Farmacopéias Americana (2005) e Brasileira (2001). Os resultados indicaram que a CBZ em análise estava de acordo com os parâmetros estabelecidos pelos compêndios oficiais pesquisados, e a forma polimórfica encontrada foi a forma β , preconizada pela Farmacopéia Americana.

Para a caracterização do AT, obtida da indústria Aspen Farmacêutica S.A. (lote 2007A0400), também foram considerados compêndios oficiais e os resultados desta caracterização podem ser visualizados no Apêndice B desta dissertação.

Os parabenos MP, EP, PP e BP, obtidos da indústria farmacêutica Farma Service Bioextract, foram anteriormente caracterizados no Laboratório de Eletroforese Capilar (LABEC) da UFSC.

4.2 AVALIAÇÃO *EX VIVO* DA PERMEABILIDADE DE FÁRMACOS, ATRAVÉS DAS MUCOSAS SUÍNAS BUCAL E ESOFÁGICA

4.2.1 OBTENÇÃO DAS MUCOSAS BUCAL E ESOFÁGICA

As mucosas foram obtidas em um matadouro local, situado na cidade de Antônio Carlos (SC), tendo sido armazenadas em tampão Krebs¹, a 4°C, até o seu processamento, que ocorreu, no máximo, em até 6h após a morte dos animais. Após o processamento, ou seja, a delimitação das secções de interesse, com o auxílio de materiais cortante (pinça e tesoura anatômica, bisturi), adaptou-se a mucosa (bucal ou esofágica) na câmara de Franz, na interface entre o compartimento doador e receptor (SHOJAEI; BERNER; XIAOLING, 1998).

¹Solução tampão de Krebs: NaCl (20mM); KCl (4,7mM); KH₂PO₄ (1,2mM); NaHCO₃ (25mM); CaCl₂ (2,5mM); MgCl₂ (1mM); glicose (5,5mM), pH 7,4.

Um aspecto importante considerado foi a necessidade de manter a uniformidade da espessura dos cortes (aproximadamente 1 mm), pois o não cumprimento deste requisito poderia resultar em alterações na permeabilidade, com resultados controversos e de difícil comparação.

4.2.2 EXPERIMENTOS DE PERMEABILIDADE

Para a realização dos experimentos, foi elaborado o esquema de um equipamento, com base em literatura da área, que foi fabricado pela empresa DIST. Informações complementares podem ser obtidas no Apêndice A, ao final desta dissertação. Variáveis importantes para a realização dos experimentos, tais como dimensões da câmara de Franz, volume da solução tampão nos compartimentos, pH, volumes e intervalos de tempo de retirada das alíquotas e espessura das mucosas foram definidas com base em revisão bibliográfica (dados não mostrados).

As dimensões da câmara de difusão determinaram o volume da solução a ser utilizada no compartimento receptor. As características físico-químicas do fármaco, bem como a necessidade de reprodução do ambiente bucal foram os critérios de escolha do pH das soluções receptora e doadora. Os intervalos de tempo de retirada das alíquotas do compartimento receptor representam a variável de maior aleatoriedade, pois foram selecionados aqueles que melhor se adaptavam às condições experimentais e aos objetivos do estudo. No entanto, o tempo total do experimento considerou aspectos da viabilidade tecidual.

Foram utilizadas mucosas bucal e esofágica suínas, frescas e congeladas, adaptadas em câmaras de Franz, com área de difusão de 1,77 cm². A composição da solução tampão do compartimento inferior (receptor) considerou características de solubilidade para manutenção das condições *sink*. Os volumes totais dos compartimentos doador e receptor foram de 2 e 10 mL, respectivamente.

As condições específicas dos experimentos para a avaliação da permeabilidade dos dois fármacos em estudo (AT e CBZ), através das mucosas [concentração de fármaco, composição das soluções do compartimento superior (solução doadora) e inferior (solução receptora), incluindo o uso de promotores químicos de permeabilidade (tipo e concentração)] foram testadas, com base na literatura da área. O raciocínio lógico empregado para tal está explicitado no item Resultados e Discussão.

Os experimentos iniciaram-se com a alocação das câmaras de Franz no banho termostático, com agitação multiponto (Dist), para estabilização da temperatura (37°C) (Figura 9; 1). Na sequência, a solução receptora foi adicionada, juntamente

com as barras magnéticas (destinadas a simular os movimentos bucais e manter a solução com concentração uniforme do fármaco). Após delimitação da região de interesse (Figura 9; 2), as mucosas bucal ou esofágica foram dispostas na parte superior da célula receptora (Figura 9; 3), com o epitélio voltado para o compartimento doador da câmara e o tecido conectivo voltado para o compartimento receptor. Com auxílio de pipeta automática, 2 mL das soluções dos fármacos em estudo foram depositados sobre as mucosas, e o sistema foi coberto com papel alumínio para evitar evaporação. A agitação foi acionada, e seis a sete alíquotas de 400 μL da solução receptora foram retiradas pela cânula de amostragem, em intervalos regulares de 1h. Adicionou-se quantidade equivalente da solução, no compartimento receptor, após a retirada das alíquotas, que foram imediatamente armazenadas a -20°C , até o momento da quantificação.

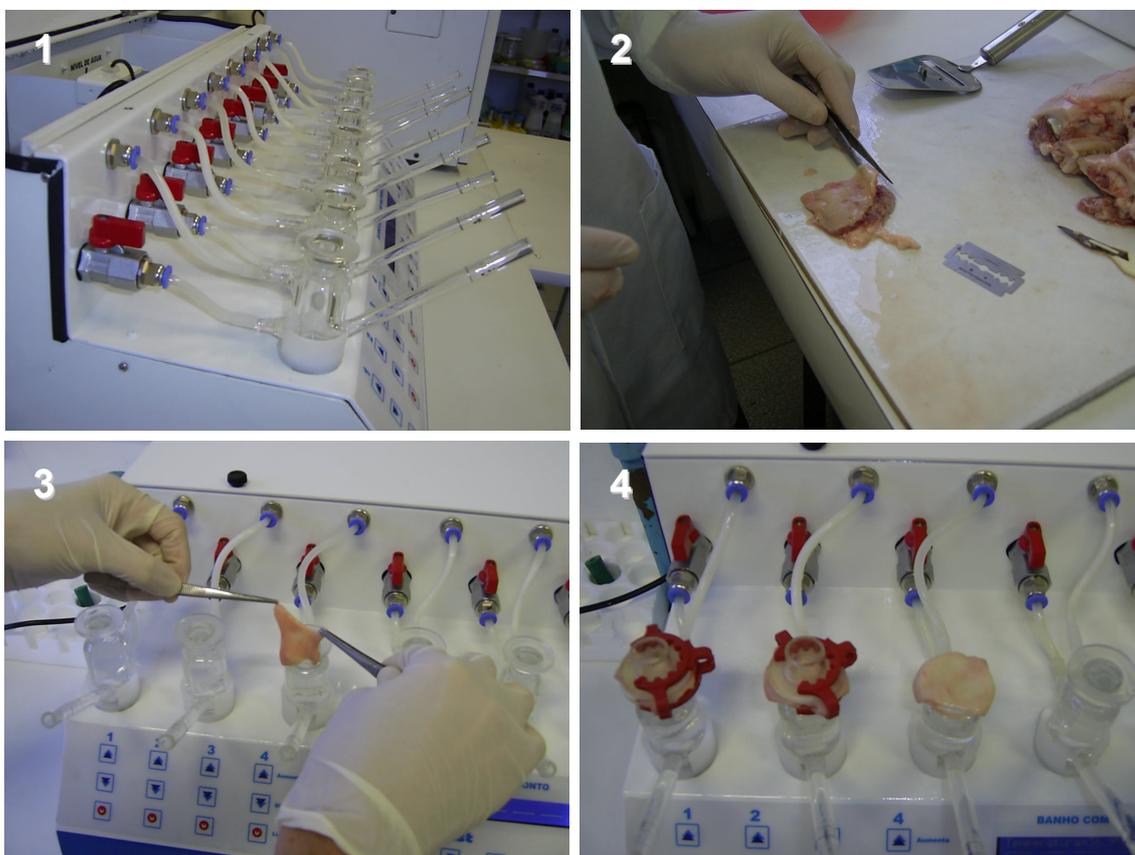


Figura 9: 1) Disposição das câmaras de Franz no equipamento; 2) Seccionamento da região de interesse (neste caso, mucosa bucal suína); 3) Disposição da mucosa na câmara de Franz; 4) Câmaras de Franz pós-montagem, destinadas a aplicação do fármaco em análise (as duas primeiras).

A análise final da permeabilidade dos fármacos, através das mucosas bucal e esofágica (frescas x congeladas), incluiu o cálculo dos coeficientes de permeabilidade, dos fluxos constantes e dos tempos de latência, bem como a representação gráfica (plotagem) das quantidades permeadas dos fármacos ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) em função do tempo

(h). Os coeficientes de permeabilidade (P) foram calculados pela equação abaixo (CHEN; HUI-NAN; XIAO-LING, 2002):

$$P = \frac{dQ / dt}{A \times C_d}$$

(equação 3)

Onde:

A = superfície da área de difusão

dQ/dt = quantidade de fármaco que permeou por unidade de tempo

C_d = concentração do fármaco no compartimento superior

O estado de fluxo constante (J) foi obtido através do produto entre o coeficiente de permeabilidade e a concentração inicial do fármaco no compartimento doador; ou ainda, pelo coeficiente angular da reta que relaciona a quantidade permeada (µg/cm²) em função do tempo (h) (MASHRU et al., 2005).

O tempo de latência (T_L), que é definido como o tempo necessário para que a passagem de uma substância, através de uma membrana, atinja o equilíbrio, foi calculado a partir da extrapolação da linha do estado estacionário (BARRY, 2002).

4.2.3. AVALIAÇÃO DA RETENÇÃO DE FÁRMACOS NAS MUCOSAS SUÍNAS BUCAL E ESOFÁGICA

Considerando a existência de dois estudos de avaliação da retenção do AT em mucosas bucais de *hamsters* (UNGPHAIBOON; MAITANI, 2001) e suínas (NICOLAZZO; REED; FINNIN, 2005), inclusive com utilização de promotores (NICOLAZZO; REED; FINNIN, 2005), optou-se por não avaliar a retenção deste fármaco nas mucosas suínas bucal e esofágica utilizadas neste estudo.

Para a CBZ, definiu-se que a avaliação da retenção era imprescindível, tendo em vista os poucos estudos existentes de permeabilidade em mucosas deste fármaco (IKINCI et al., 2000; GIANNOLA et al., 2005), o papel promissor desta via de administração como alternativa para a via oral convencional, e a importância de se obter uma baixa retenção para otimização do efeito sistêmico. A análise da retenção da CBZ nas mucosas suínas bucal e esofágica foi realizada após a finalização dos estudos de permeabilidade.

Anteriormente à retirada das mucosas, a solução doadora de CBZ foi homogeneizada, com auxílio de pipeta, transferindo-se 200 µL desta solução para tubos tipo Eppendorf®, para análise posterior da quantidade retida e balanço da massa final.

Na sequência, as mucosas foram retiradas do equipamento e lavadas com solução tampão saliva²:etanol (80:20) para remover o excesso de fármaco na superfície das mucosas. Com auxílio de bisturi e pinça anatômica, delimitou-se a região central, equivalente à área permeada. Estas mucosas foram recortadas/picoteadas e os fragmentos foram pesados em tubos de 15 mL.

Após as pesagens, adicionou-se 5 mL de metanol (líquido extrator) em cada tubo. Estes materiais foram submetidos à agitação (Vortex®) e sonicados (Branson®), durante 10 min (cada um dos processos) para o rompimento das células e aumento da eficiência de extração. Os restos celulares, proteínas e outros interferentes foram removidos através de filtração (Millipore®; 0,45 µm), e as amostras permaneceram armazenadas a -20°C, até o momento da quantificação. As taxas de recuperação das quantidades de CBZ adicionadas a secções de tecido (mucosas bucal ou esofágica), em três níveis de concentração e mantidas em intervalo de tempo equivalente a duração total do experimento, foram satisfatórias (entre 97,2 e 103,4%), tornando este método de extração viável para a avaliação da retenção do fármaco nestes tecidos.

4.2.4 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE TECIDUAL E EFEITO DO CONGELAMENTO

O método utilizado para a avaliação da viabilidade tecidual foi o próprio experimento de permeabilidade (SUDHAKAR; KUOTSU; BANDYOPADHYAY, 2006). Conforme descrito anteriormente, se não variar a permeabilidade do fármaco, durante o período do estudo, em função de condições experimentais, o tecido poderá ser considerado viável. Para tal, após os experimentos, foram realizadas análises histológicas, conforme descrito abaixo.

Para avaliação do efeito do congelamento (-80°C) na viabilidade tecidual, também utilizou-se o próprio experimento de permeabilidade e análises histológicas foram realizadas conforme descrito abaixo. O descongelamento foi realizado à temperatura ambiente (25°C), com adição da solução tampão de Krebs.

4.2.4.1 PREPARAÇÕES HISTOLÓGICAS

Após os cortes e separação da secção de interesse, os tecidos foram imediatamente colocados em 10% de tampão formalina (fixador), com a finalidade de impedir a solubilização das proteínas teciduais. As amostras foram, então, desidratadas com concentrações crescentes de etanol, de forma a evitar uma retração

²Solução tampão saliva: Constituição tampão saliva: 2,38 g de Na₂HPO₄; 0,19 g de KH₂PO₄ e 8,00 g NaCl por litro de água ultra-pura ajustado com ácido fosfórico para pH 6,75.

pronunciada do tecido, ocasionando lesões estruturais celulares de caráter irreversível. A impregnação do tecido com meio de inclusão foi impossível de realizar nesse estágio, pois substâncias semelhantes à parafina usadas para a inclusão não se solubilizam no etanol. O tecido foi, portanto, imerso em xilol, no qual etanol e parafina são solúveis. Visando eliminar o xilol contido no tecido e ocupar os espaços vazios deixados pela água e lipídeos, utilizou-se a parafina, que foi fundida (56 a 60°C) para possibilitar sua impregnação no tecido. A solidificação da parafina foi realizada em temperatura ambiente. Este processo serviu também para preparar o tecido para os cortes, fornecendo-lhe a consistência adequada para que pudesse ser cortado. Os cortes foram feitos com auxílio de micrótomo (Lupe®) e apresentaram espessura variando entre 4 e 5 µm. Considerando a baixa diferenciação óptica entre os tecidos considerados neste estudo, foi fundamental a utilização de corantes. Para tal, utilizou-se a combinação eosina-hematoxilina (EH). Antes da coloração propriamente dita, foi necessário remover a parafina. O corte, já aderido à lâmina de vidro, foi banhado no xilol para dissolver a parafina. Considerando que estes corantes eram solúveis em água, foi necessário remover o xilol do tecido e substituí-lo por água (hidratação). Nas células coradas com HE, os ácidos nucléicos foram corados pela hematoxilina, dando ao núcleo coloração azul-púrpura. A eosina é atraída pelas proteínas citoplasmáticas, corando-as de rosa a vermelho. Depois da coloração, foi feita uma desidratação final, objetivando aumentar a sobrevida do preparado histológico. Finalmente, o corte foi banhado novamente com xilol e uma gota de Bálsamo de Canadá foi utilizada para a montagem da lamínula sobre a lâmina. As amostras de todos os tecidos frescos e congelados foram fixadas da mesma maneira e analisadas por microscopia óptica (Olympus BX40, 40X).

4.3 AVALIAÇÃO *EX VIVO* DA PERMEAÇÃO DOS PARABENOS, ATRAVÉS DA PELE DE ORELHA SUÍNA

4.3.1 OBTENÇÃO DA PELE DE ORELHA SUÍNA

As condições de transporte das orelhas suínas foram as mesmas utilizadas no transporte das mucosas (item 4.2.1). Inicialmente, as orelhas foram lavadas com água destilada, os pêlos foram cortados com tesoura, e selecionou-se as partes íntegras, livres de lesões ou manchas. Com auxílio de pinça anatômica, bisturi e tesoura, procedeu-se à dissecação extraindo conjuntamente derme e epiderme, e descartando a hipoderme (tecidos subcutâneos e gordurosos subjacente à derme) (Figura 10).



Figura 10: Dissecção da pele de orelha suína (à esquerda) e tecido pronto para os experimentos, após descarte da hipoderme (à direita).

Após fragmentação, as amostras dissecadas de pele foram acondicionadas em papel alumínio e armazenadas a -80°C , imersas em solução tampão de Krebs, até o momento da utilização. O período de armazenamento variou entre um e dois meses.

O descongelamento foi realizado à temperatura ambiente (25°C), com adição da solução tampão de Krebs.

4.3.2 EXPERIMENTOS DE PERMEAÇÃO CUTÂNEA

As câmaras de Franz foram alocadas no banho termostatizado (37°C) com agitação multiponto (Dist). O compartimento receptor foi preenchido com tampão PBS: etanol (10 mL). A proporção de etanol foi de 20% (V/V) nos experimentos com os parabenos isolados, e de 50% (V/V) nos experimentos de interação dos parabenos. Optou-se por utilizar tais concentrações de etanol, considerando-se o estudo de Sznitowska (1996), no qual o efeito promotor do etanol na permeação cutânea foi otimizado quando se utilizou 25 e 50% de etanol. Além disto, segundo recomendação do FDA (U.S. FDA/CDER, 1997), misturas hidroalcolicas podem ser utilizadas como meio receptor em estudos de permeação *ex vivo*, quando a amostra for muito pouco solúvel em água.

O tecido foi disposto na câmara de Franz, evitando-se a formação de bolhas de ar, com a epiderme voltada para o compartimento doador e a derme para o compartimento receptor. Os parabenos (metil, etil, propil e butilparabeno) foram solubilizados na mesma mistura utilizada no compartimento receptor.

Para a definição das concentrações dos parabenos a serem testadas, levou-se em consideração que quando os mesmos fossem associados, a concentração total

máxima não poderia exceder o limite de 0,4%, conforme estabelecido pela Resolução nº 79, de 28 de agosto de 2000 (BRASIL, 2000). Desta forma, os quatro parabenos testados isoladamente foram preparados na concentração de 0,1% (p/V) de forma que, quando combinados, este limite fosse respeitado. As diferentes soluções das combinações dos parabenos foram preparadas de acordo com delineamento fatorial 2^3 , com triplicata no ponto central para a estimativa do erro experimental (BARROS NETO; SCARMINIO e BRUNS, 2003). Manteve-se constante o nível (concentração) de um dos parabenos e os demais foram alternados, representando os três fatores do delineamento. Dois níveis de concentração (mínimo \rightarrow 0 e máximo \rightarrow 1000 $\mu\text{g/mL}$) foram considerados nos experimentos para a avaliação da interação entre os mesmos, e um nível central adicional (500 $\mu\text{g/mL}$) foi utilizado para a estimativa do erro experimental.

Após a disposição do tecido na câmara de Franz, o sistema de agitação foi acionado e 2 mL das soluções do(s) parabeno(s) foram depositadas sobre a superfície da epiderme, com auxílio de pipeta automática. O sistema foi coberto com papel alumínio para evitar a evaporação. A agitação foi acionada e alíquotas de 400 μL da solução receptora foram retiradas pela cânula de amostragem (com reposição da solução) e imediatamente armazenadas a -20°C , até o momento de quantificação por EC, em condições pré-estabelecidas. As alíquotas foram retiradas em intervalos regulares de 1h nos experimentos com os parabenos isolados (duração total de 6 h) e de 1,5h nos experimentos com os parabenos associados entre si (duração total de 7,5h).

A análise final da permeação cutânea dos parabenos incluiu os cálculos dos tempos de latência (L_T), dos fluxos constantes (J) e dos coeficientes de permeabilidade (P), através de equações, fundamentadas nas Leis de Fick, e a plotagem gráfica das quantidades permeadas dos parabenos ($\mu\text{g/cm}^2$) em função do tempo. As massas das amostras acumuladas no compartimento receptor, em cada intervalo de tempo, foram calculadas considerando-se o volume total da câmara, as concentrações dos parabenos nas alíquotas retiradas, bem como a área efetiva de permeação (AKOMEAH; MARTIN; BROWN, 2007).

O perfil de permeação, bem como a influência dos coeficientes de difusão e de partição na permeação podem ser melhor compreendidos com a utilização de modelos matemáticos para representá-los, incluindo diferentes variáveis independentes. Com este propósito, utilizou-se o modelo equacional de Moser et al. (2001b) para o cálculo destes parâmetros.

$$Q(t) = (KH)C_v \left[\frac{D}{H^2} t - \frac{1}{6} - \frac{2}{\pi^2} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{(-1)^n}{n^2} \exp\left(-n^2 \pi^2 \frac{D}{H^2} t\right) \right] \quad (\text{equação 4})$$

Onde: Q = quantidade acumulada da amostra por unidade de área em determinado tempo
 C_v = concentração da amostra no compartimento superior
 K = coeficiente de partição
 D = coeficiente de difusão
 H = espessura da membrana

4.3.3 AVALIAÇÃO DA RETENÇÃO CUTÂNEA DOS PARABENOS

A análise da retenção cutânea dos parabenos foi realizada após o término dos estudos de permeação cutânea.

Anteriormente à retirada da pele, as soluções doadoras contendo os parabenos foram homogeneizadas, com auxílio de pipeta e transferiu-se 200 µL destas soluções para tubos tipo Eppendorf®, para análise posterior da quantidade retida e balanço da massa final. Neste caso específico, a quantificação por EC foi realizada após diluição 1:200 das soluções doadoras.

Na sequência, as amostras de pele foram retiradas do equipamento e lavadas com solução tampão PBS:etanol para remover o excesso dos parabenos na superfície da epiderme. Com auxílio de bisturi e pinça anatômica, separou-se a epiderme da derme. Apenas a região central, equivalente à área de permeação, foi delimitada, recortada e picoteada. Os fragmentos de derme e epiderme gerados foram pesados em tubos de 15 mL.

Os procedimentos utilizados para a extração dos parabenos da pele foram equivalentes àqueles da extração da CBZ em mucosas (ver item 4.2.3).

Para evitar interferências na mobilidade efetiva dos analitos em questão, bem como assimetria dos picos, durante as análises por EC, optou-se por evaporar o metanol (60°C) e ressuspender os analitos no mesmo meio do compartimento receptor, utilizado nos experimentos de permeação.

4.4 MÉTODOS DE QUANTIFICAÇÃO

4.4.1 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

A quantificação da CBZ e do AT foi realizada em cromatógrafo líquido de alta pressão (Shimadzu), equipado com detector UV (Shimadzu SPD-10A), coluna de empacotamento de fase reversa, injetor manual e duas bombas isocráticas (Shimadzu

LC-10AD). Todos os solventes utilizados apresentavam alto grau de pureza (reagente grau HPLC).

Após pesquisa na literatura (dados não mostrados), algumas condições analíticas para quantificação do AT foram selecionadas e testadas. Para escolha da fase móvel mais efetiva, foram considerados os resultados obtidos relativos ao tempo de retenção, simetria e largura da base dos sinais cromatográficos. Além disto, o detector e a fase móvel utilizados mostraram-se adequados e permitiram a quantificação dos componentes das amostras. Outros parâmetros avaliados durante o desenvolvimento do método incluíram o comprimento de onda e a velocidade de fluxo.

Ajustados os parâmetros operacionais, as condições cromatográficas foram então definidas para a quantificação do AT (Quadro 2).

Quadro 2: Condições cromatográficas empregadas nas análises do acetonido de triancinolona.

Característica	Descrição
Fase estacionária	C18 Phenomenex (300 mm x 4 mm; 5µm)
Fase móvel	Acetonitrila: H ₂ O (55:45 v/v)
Volume de injeção	20 µL
Fluxo da fase móvel	1,0 mL/minuto
Detecção	UV (254 nm)
Temperatura de análise	25°C ± 1

Com relação à CBZ, durante a etapa de revisão da literatura para a escolha do método mais adequado para sua quantificação por CLAE, selecionaram-se estudos nos quais a mesma era facilmente separada de matrizes complexas e com tempo de análise relativamente curto (inferior a 10 min). O primeiro critério possibilitou melhor seletividade analítica, tendo em vista os diferentes interferentes das matrizes biológicas, enquanto que o segundo critério garantiu, tanto redução de custos (em função do menor consumo de reagentes), bem como otimização na utilização do equipamento (maior número de análises em menor tempo).

Desta forma, selecionou-se o método desenvolvido por Kelmann et al. (2007), que além de preencher os requisitos acima mencionados, utilizava reagentes simples (metanol e água), procedimentos mínimos de preparação da amostra, bem como equipamento semelhante ao existente no laboratório. Embora o fármaco estivesse disposto em uma matriz diferente, análises preliminares (dados não mostrados) revelaram perfis cromatográficos semelhantes aos do estudo de Kelmann et al. (2007), sem diferenças nos tempos de retenção e em outros parâmetros de conformidade (largura do pico, ausência de cauda, etc.), tornando o método adequado para os estudos aqui propostos. As condições cromatográficas foram então definidas para a quantificação da CBZ (Quadro 3).

Quadro 3: Condições cromatográficas empregadas nas análises da carbamazepina

Característica	Descrição
Fase estacionária	C18 Kromasil® (150 mm x 4.6 mm; 5µm)
Fase móvel	Metanol: H ₂ O (70:30 v/v)
Volume de injeção	20 µL
Fluxo da fase móvel	0,7 mL/minuto
Detecção	UV (286 nm)
Temperatura de análise	25°C ± 1

Melhores resultados quantitativos são obtidos através da calibração com um padrão interno, adicionando-se uma quantidade conhecida de uma substância de referência não interferente à amostra. Com este propósito, para a quantificação do AT, utilizou-se prednisolona, e para a quantificação da CBZ, o alprazolam.

Geralmente, o pré-tratamento de amostras biológicas é requerido em análises cromatográficas de fármacos, objetivando reduzir a presença de interferentes, o que aumenta a sensibilidade e a seletividade analítica. Neste trabalho, a estratégia utilizada foi a filtração prévia das amostras, utilizando microfiltros de 0,45 µm (Millipore). Do volume de amostra total, metade foi filtrada. Em tubos tipo Eppendorf®, adicionaram-se 50 µL dos filtrados e 50 µL do padrão interno a 40 µg/mL (prednisolona ou alprazolam). Após agitação, estas amostras foram injetadas no cromatógrafo.

Nos métodos de quantificação da CBZ e do AT, efetuou-se a validação conforme critérios estabelecidos por órgãos oficiais e os resultados indicaram que os parâmetros de desempenho analítico tais como especificidade, linearidade, sensibilidade, precisão e exatidão foram satisfatórios, permitindo a utilização destes métodos nos estudos de permeabilidade de fármacos (Apêndice C).

4.4.2 ELETROFORESE CAPILAR

A quantificação dos parabenos foi conduzida em sistema de eletroforese capilar HP^{3D}-CE (Hewlett-Packard®, Agilent Technologies), equipado com detector de arranjo de fotodiodos e injetor automático. O software HP Chemstation versão 08.03 (Agilent Technologies) foi utilizado para controle do sistema, aquisição e tratamento dos dados. As separações foram realizadas em capilar de sílica fundida com 48,5 cm de comprimento (40 cm de comprimento efetivo) e 50 µm de diâmetro interno (Agilent®).

Capilares novos foram condicionados com uma solução de NaOH 1 M, durante 1 h. A ativação diária, previamente às análises, consistiu de lavagens com uma solução de NaOH 0,1 M (30 min) e eletrólito (15 min). Ao término da sequência de análises, os capilares foram pós-condicionados com lavagens de água ultra-pura (10 min).

Durante o desenvolvimento do método de análise (Eletroforese Capilar em Zona), foram feitos ensaios preliminares variando parâmetros eletroforéticos, tais como pH e concentração do eletrólito, voltagem e injeção da amostra. A sensibilidade foi o principal critério utilizado para a escolha das melhores condições analíticas (Quadro 4).

Quadro 4: Condições eletroforéticas empregadas nas análises dos parabenos.

Característica	Descrição
Capilar de sílica fundida	$L_{\text{tot}} = 48,5 \text{ cm}$; $L_{\text{det}} = 40 \text{ cm}$
Eletrólito	30 mmol.L^{-1} tetraborato de sódio (TBS)
Tensão aplicada	30 kV (polaridade positiva)
Injeção hidrodinâmica	50 mBar (durante 10 s)
Comprimento de onda	$\lambda = 297 \text{ nm}$ (UV-Vis)
Pré-condicionamento	NaOH 0,1 M (30 min), eletrólito (15 min)
Pós-condicionamento	H ₂ O (10 min)
Temperatura	$25^{\circ}\text{C} \pm 1$

O ácido 3,5-dinitrobenzóico foi utilizado como padrão interno, em função da não interação do mesmo com as amostras e características estruturais similares àquelas dos analitos.

Tendo em vista a composição diversificada das matrizes biológicas, obtidas nos experimentos, evidenciou-se a necessidade de separação dos analitos de interesse dos demais compostos presentes na amostra. Com este propósito, adicionou-se acetonitrila às amostras, objetivando precipitar proteínas e peptídeos interferentes e evitando a aderência dos mesmos nas paredes internas dos capilares, o que diminuiria sua vida útil.

Em tubos do tipo Eppendorf®, adicionou-se 150 μL da amostra e 90 μL da solução do ácido-3,5-dinitrobenzóico em acetonitrila (20 $\mu\text{g/mL}$). Esta mistura foi centrifugada a 2000 $\times g$, durante 10 min, e 200 μL do sobrenadante foram então transferidos para os frascos de análise.

Após ajustes operacionais, iniciou-se o processo de validação dos parabenos, considerando os mesmos parâmetros de desempenho analítico. Os resultados demonstraram que o método foi específico (sem interferência da matriz biológica),

exato, preciso, linear e sensível, permitindo sua utilização em estudos de permeação *ex vivo* através da pele de orelha de porco (Apêndice C).

4.4.3. ESPECTROFOTOMETRIA NA REGIÃO DO ULTRAVIOLETA

A determinação da quantidade de carbamazepina retida nas mucosas e permeada foi também avaliada por espectrofotometria na região do ultravioleta (PerkinElmer®, Lambda 25 UV/VIS), com medidas de absorbância a 286 nm. Estes resultados foram comparados com aqueles obtidos por CLAE.

Para avaliar a especificidade do método bioanalítico e reduzir o efeito de interferentes na quantificação da CBZ, utilizaram-se amostras de matriz biológica na qual nenhum analito foi adicionado - amostra branco.

Diferentes curvas de calibração foram previamente geradas para o cálculo da concentração de fármaco nas amostras resultantes dos ensaios *ex vivo*. Outros detalhes e os resultados da curva de calibração da CBZ são apresentados no Apêndice C.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os experimentos foram realizados com, no mínimo, três repetições independentes, com exceção dos experimentos oriundos do delineamento fatorial. A comparação entre os diferentes valores de fluxo, de tempo de latência e os coeficientes de permeabilidade obtidos foi realizada por análise de variância (ANOVA), incluindo testes de comparações múltiplas (SNK). Diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 AVALIAÇÃO *EX VIVO* DA PERMEABILIDADE DA CARBAMAZEPINA E DO ACETONIDO DE TRIANCINOLONA, ATRAVÉS DAS MUCOSAS BUCAL E ESOFÁGICA

5.1.1 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA

A análise das lâminas histológicas, em microscopia óptica, revelou similaridade entre as mucosas bucal e esofágica, fresca e congeladas (Fig. 11). A estrutura mais externa compreende o epitélio estratificado escamoso não-queratinizado, sustentado por uma camada de tecido conectivo, que contém a microcirculação (lâmina própria). A lâmina basal separa o epitélio da lâmina própria. Um aspecto de diferenciação entre estas mucosas é a presença de uma camada de células musculares lisas, dispostas longitudinalmente, na mucosa esofágica - a mucosa muscular. Outro ponto de diferenciação relacionou-se com a espessura do epitélio, mais delgada no esôfago. Além disto, as papilas esofágicas são menores e mais regulares em relação ao epitélio bucal. Pequenas glândulas foram encontradas no tecido bucal, similarmente ao esôfago. Estas glândulas abrem-se no lúmen e parte transversal da mucosa. Ambas mucosas são separadas do músculo ao nível de submucosa. No tecido bucal, esta junção confere grande dificuldade de separação, contrariamente ao tecido esofágico.

O esôfago suíno apresentou comprimento médio de 25 cm, mas apenas a porção central foi considerada para os estudos de permeabilidade e a avaliação histológica.

Observaram-se pequenas alterações morfológicas no tecido congelado em função das condições de armazenagem. Estas alterações incluíram a formação de vacúolos, provavelmente associados à formação extracelular de cristais de gelo durante o processo de congelamento, e descamação das camadas mais superficiais.

A avaliação histológica destes tecidos, durante todo o tempo experimental, é importante, pois é possível verificar a influência dos solventes, componentes da formulação e dos compostos ativos na integridade celular, bem como interferências nas propriedades de barreira destas mucosas. Mesmo que esta abordagem não tenha sido utilizada nesta dissertação, em trabalhos futuros do laboratório, estes aspectos serão considerados.

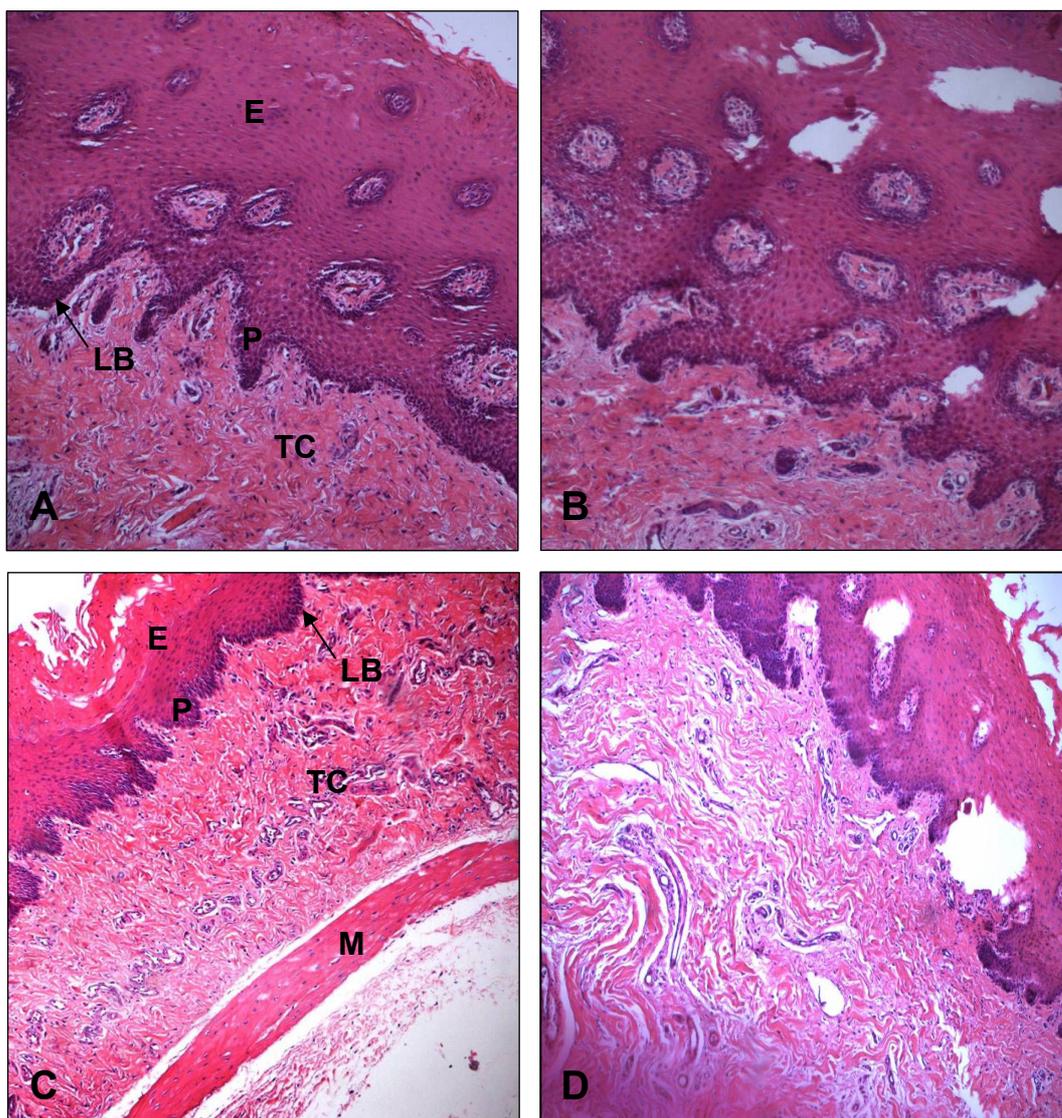


Figura 11: Microscopia óptica das secções transversais das mucosas bucal e esofágica suínas (frescas e congeladas) (ampliação, 40X). A) Mucosa bucal fresca; B) Mucosa bucal congelada; C) Mucosa esofágica fresca; D) Mucosa esofágica congelada. E = epitélio escamoso estratificado; LB = lâmina basal; TC = tecido conectivo; P = papilas; M = mucosa muscular (aparece somente no esôfago).

5.1.2 AVALIAÇÃO DA PERMEABILIDADE DA CARBAMAZEPINA

Tendo em vista as limitações relativas à solubilidade, picos plasmáticos irregulares, metabolismo auto-induzido e problemas de biodisponibilidade, a pesquisa por rotas alternativas para a administração da CBZ é crescente. Conforme comentado anteriormente, a mucosa bucal é uma opção interessante, considerando a possibilidade de modular a absorção da CBZ, mediante utilização de promotores.

Contrariamente ao AT, para a CBZ, a absorção sistêmica é desejada e todo o direcionamento das estratégias, na elaboração da formulação, deve ser para a observação deste efeito. Teoricamente, a administração da CBZ pela mucosa bucal evitaria, tanto o metabolismo hepático de primeira passagem, como melhoraria a biodisponibilidade. Desta forma, poder-se-ia reduzir a dose terapêutica, diminuindo a probabilidade de aparecimento de efeitos adversos.

Na prática, Ikinci et al. (2000) não encontraram resultados satisfatórios para a permeação da CBZ através das mucosas suínas bucais, quando ela foi veiculada em formas farmacêuticas sólidas; enquanto que, Giannola et al. (2005), com abordagem mais detalhada, utilizando experimentos *ex vivo* (em mucosas suínas bucal) e *in vitro* (epitélio oral humano), comprovou o potencial de administração da mesma por esta via, estimulando novos estudos na área.

Para os estudos de permeabilidade da CBZ, através das mucosas suínas bucal e esofágica (frescas e congeladas), optou-se por utilizar uma solução do fármaco (1mg/mL) em tampão saliva: etanol (80:20), evitando tanto fenômenos de supersaturação quanto para manter as condições *sink*. O objetivo deste trabalho não era veicular a CBZ em soluções aquosas para administração em mucosa bucal, mas melhorar a permeabilidade do fármaco nesta mucosa e permitir que o experimento pudesse ser realizado em curto intervalo de tempo (inferior a 12 h), facilitando os cálculos dos parâmetros de permeabilidade. Quanto menor o tempo total experimental, menores são as chances de comprometimento da viabilidade tecidual e maior a fidedignidade dos resultados. Além disto, para fármacos com baixa solubilidade e alta permeabilidade, como a CBZ, a dissolução é geralmente a fase limitante da absorção, conforme comentado por Welling (1997).

Após os ensaios *ex vivo* de permeabilidade da CBZ, utilizaram-se duas metodologias de quantificação: CLAE e espectrofotometria na região do ultravioleta (UV/Vis). O objetivo foi correlacionar estas duas metodologias, verificando o potencial da utilização de uma metodologia mais simples, mais rápida e de menor custo para estudos de permeabilidade de fármacos com alta permeabilidade (classes I e II).

A quantificação da CBZ por CLAE, realizada após os experimentos de avaliação da sua permeabilidade, através das mucosas suínas bucal e esofágica, frescas e congeladas, gerou cromatogramas, tais como os visualizados nas Figuras 12 e 13. Nota-se que quanto maior o intervalo de tempo considerado, maior a quantidade de fármaco permeada.

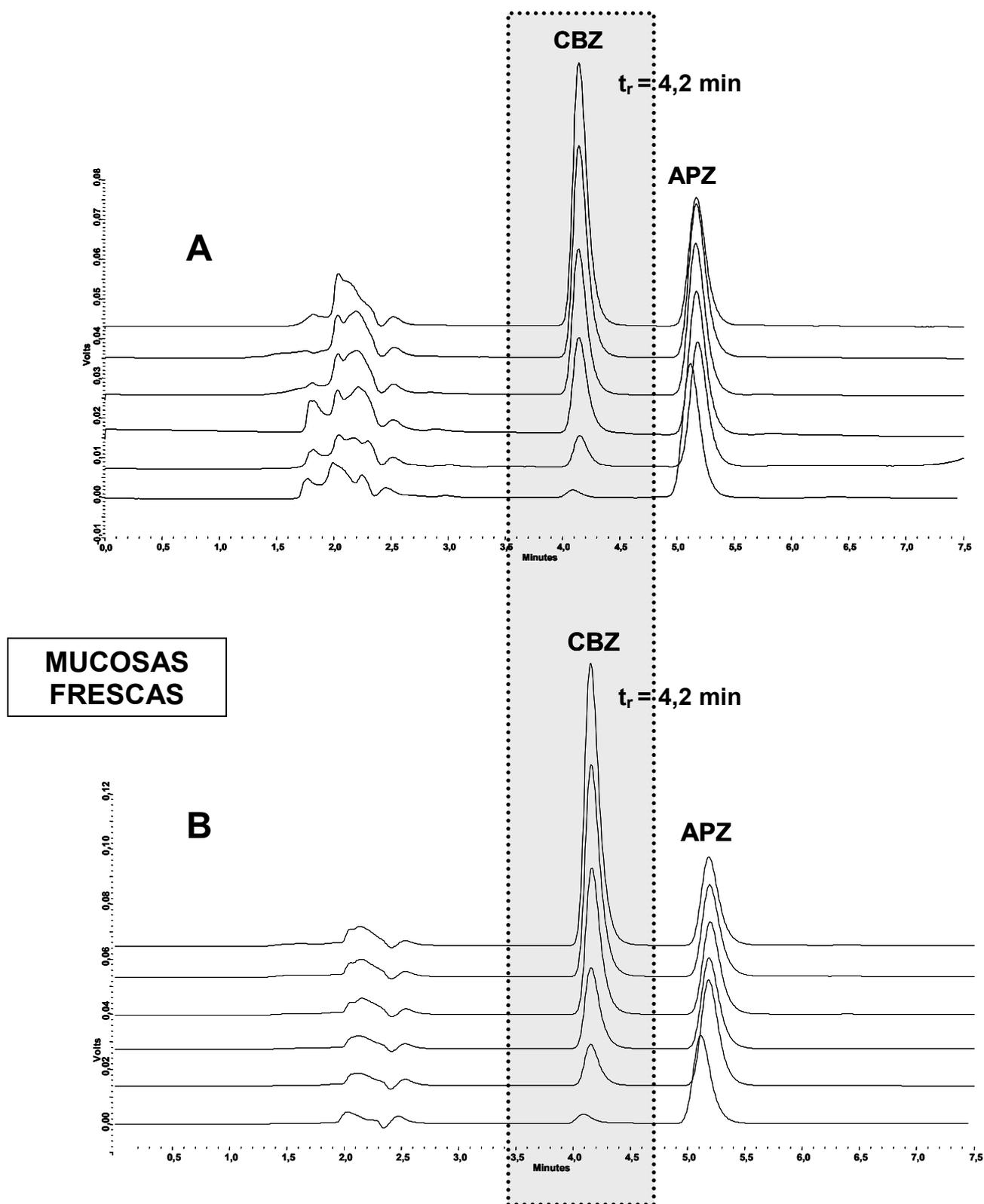


Figura 12: Cromatogramas referentes à quantidade de carbamazepina permeada, através das mucosas suínas bucal (A) e esofágica (B), **ambas frescas**. Cromatogramas referentes à quantidade de carbamazepina permeada, através das mucosas suínas bucal (A) e esofágica (B), ambas frescas. Os cromatogramas foram sobrepostos, ordenando-os de forma crescente em relação ao tempo.

Condições cromatográficas: Fase móvel: metanol:água (70:30); Fase fixa: C18 - 150x4,6 mm (Kromasil®); Detecção: UV ($\lambda = 286$ nm); Fluxo = 0,7 mL/min.

CBZ = carbamazepina; APZ = alprazolam (padrão interno).

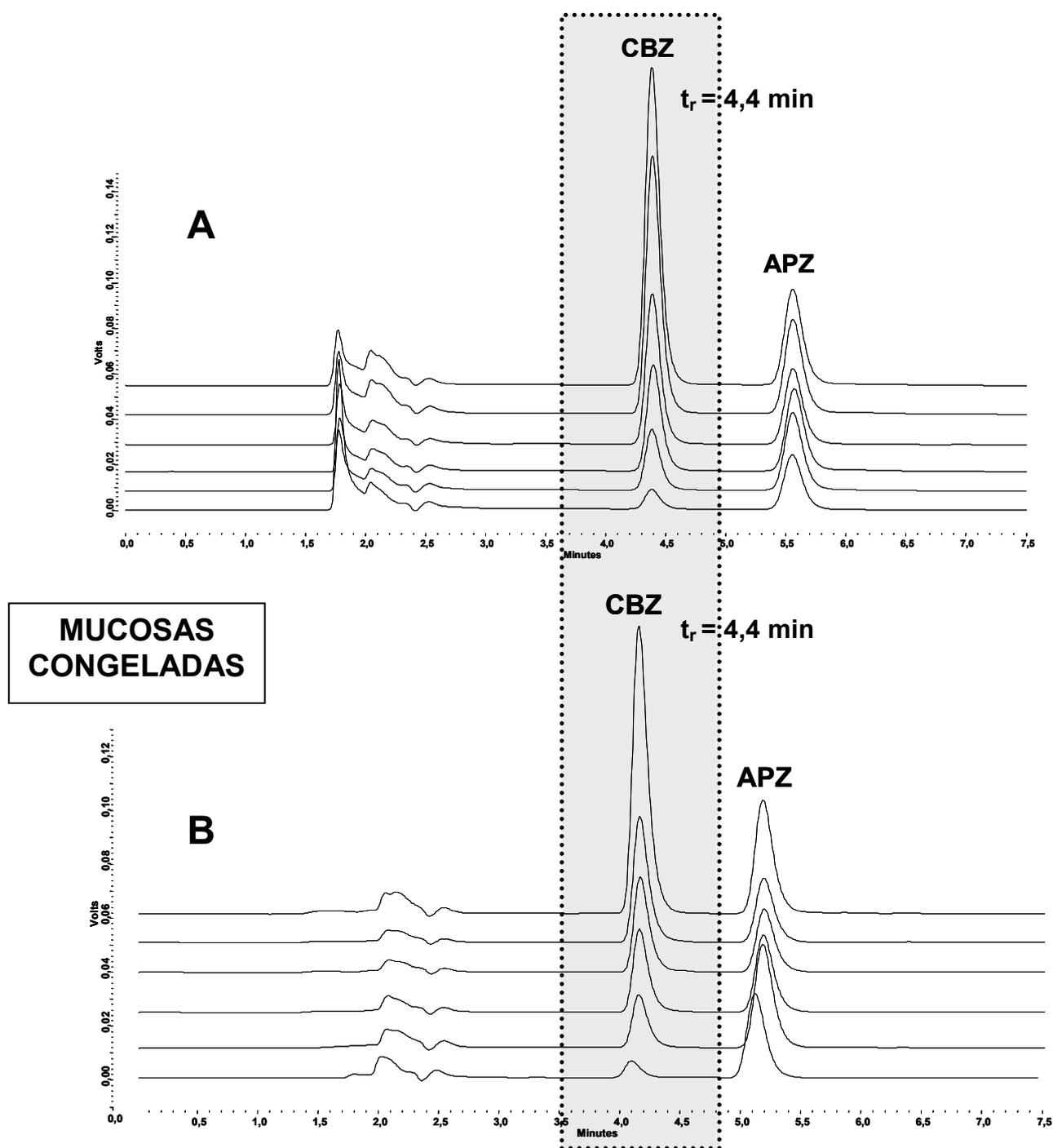


Figura 13: Cromatogramas referentes à quantidade de carbamazepina permeada, através das mucosas suínas bucal (A) e esofágica (B), **ambas congeladas**. Os cromatogramas foram sobrepostos, ordenando-os de forma crescente em relação ao tempo.

Condições cromatográficas: Fase móvel: metanol:água (70:30); Fase fixa: C18 - 150x4,6 mm (Kromasil®); Detecção: UV ($\lambda = 286 \text{ nm}$); Fluxo = 0,7 mL/min.

CBZ = carbamazepina; APZ = alprazolam (padrão interno); t_r = tempo de retenção médio.

Através dos cromatogramas da CLAE, foi possível calcular as concentrações de CBZ no compartimento receptor (considerando-se a equação da reta resultante da construção de diferentes curvas de calibração), realizar os ajustes de diluição necessários, obtendo-se, então, o gráfico que relaciona a quantidade permeada ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) em função do tempo (h), frente às diferentes condições testadas (Figura 14, A). Este gráfico permite visualizar o perfil cinético de difusão e, a partir dele, calcular os parâmetros de permeabilidade.

Este mesmo tratamento dos dados foi realizado com os valores de absorbância, resultantes da quantificação por espectrofotometria de UV, no mesmo comprimento de onda que o utilizado na detecção por CLAE ($\lambda=286\text{ nm}$) (Fig. 14, B).

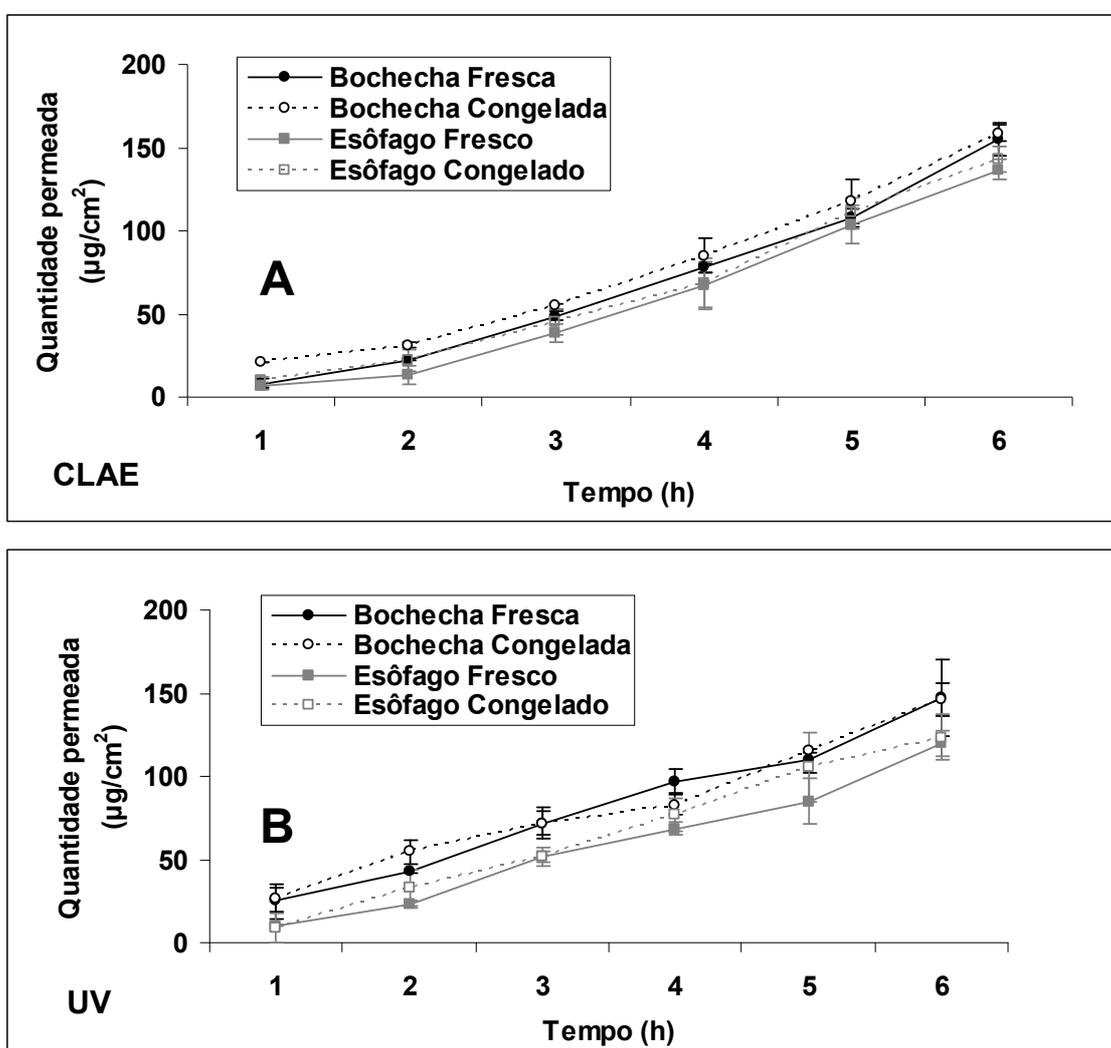


Figura 14: Cinética de difusão da carbamazepina, através das mucosas suínas bucal e esofágica, frescas e congeladas.

Condições experimentais: compartimento doador: 0,1% fármaco, tampão saliva: etanol (80:20); compartimento receptor: tampão saliva: etanol (80:20).

A) Quantificação por CLAE; B) Quantificação por espectrofotometria na região do UV.

A análise das cinéticas de difusão (Figura 14) mostrou um aumento da quantidade de CBZ permeada com o tempo, com um comportamento de permeação mais uniforme na quantificação por CLAE. Para CLAE, nos intervalos finais (3,4,5 e 6h), todas as mucosas demonstraram um comportamento estatisticamente semelhante com relação a permeação do fármaco ($p > 0,05$; SNK), fato não observado nos estágios iniciais, em função da não constância dos fluxos nesta faixa. Na quantificação por UV, observou-se que, em quase todos os intervalos de tempo (1,2,3,5,6h), não ocorreu diferença de permeação da CBZ entre mucosas bucal e esofágica, bem como entre tecidos frescos e congelados ($p > 0,05$; SNK). Os maiores desvios-padrões das amostras quantificadas por UV pode ser a explicação para esta metodologia analítica ter detectado menos diferenças entre as condições testadas.

O perfil cinético da CBZ, obtido por quantificação por CLAE, revelou comportamento linear, mediante cálculo dos coeficientes de correlação ($R^2 > 0,997$), classificando-o como sendo de ordem zero. Esta avaliação da linearidade desconsiderou o primeiro intervalo de tempo, considerando apenas o intervalo onde o estado do fluxo foi constante. Desta forma, pôde-se dispensar o modelo de Higuchi, que relaciona a quantidade permeada com a raiz quadrada do tempo, para o tratamento dos dados.

No entanto, a análise do perfil cinético da CBZ, obtido por quantificação por espectrofotometria na região do UV, não revelou linearidade para classificar o modelo cinético como sendo de ordem zero; apresentando pontos dispersos que tornam os valores dos coeficientes de correlação inferiores a 0,997. Desta forma, procedeu-se o tratamento dos dados conforme o modelo de Higuchi. Os coeficientes de correlação obtidos foram inferiores àqueles do modelo cinético de ordem zero, sugerindo que o modelo de ordem zero seria mais adequado para explicar o comportamento cinético da CBZ, quando quantificada por espectrofotometria de UV. É preciso ter cautela durante comparações entre os diferentes parâmetros de permeabilidade, considerando o erro associado aos mesmos.

Com relação aos parâmetros de permeabilidade (Tabela 1), observou-se que o tempo de latência foi relativamente baixo (inferior a 1,19 h), demonstrando a rápida difusão do fármaco através do epitélio e tecido conectivo das mucosas suínas bucal e esofágica, dispensando outras estratégias de reforço de permeabilidade. A comparação entre os tempos de latência, resultantes da quantificação por CLAE e por espectrofotometria na região do UV, demonstrou que as mucosas bucais (frescas e congeladas), quantificadas por UV, apresentaram menor tempo de latência que as mucosas esofágicas (frescas e congeladas). Quando a mesma mucosa foi comparada, variando-se apenas a metodologia de quantificação, não foram observadas diferenças

estatisticamente significantes entre os tempos de latência obtidos ($p > 0,05$; SNK). A duração total dos experimentos (6h) foi quase 6X maior que o maior tempo de latência evidenciado (igual a 1,1853h para mucosa esofágica fresca), aumentando a confiabilidade dos parâmetros de permeabilidade calculados.

Tabela 1: Resultados obtidos durante a avaliação da permeabilidade da carbamazepina 0,1% (p/V), através de mucosas suínas bucal e esofágica (frescas e congeladas), após quantificação por CLAE e espectrofotometria na região do UV (N=4).

Quantificação por CLAE	Mucosa Bucal Fresca	Mucosa Esofágica Fresca	Mucosa Bucal Congelada	Mucosa Esofágica Congelado
Fluxo (média \pm dp) ($\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$)	29,203 \pm 2,4491 ^(a)	27,1415 \pm 1,8788 ^(a)	28,0025 \pm 0,5268 ^(a)	27,3117 \pm 1,8687 ^(a)
Tempo de Latência (média \pm dp) (h)	1,0903 \pm 0,128 ^(ab)	1,1853 \pm 0,089 ^(b)	0,7182 \pm 0,071 ^(a)	1,0709 \pm 0,217 ^(ab)
Coefficiente de permeabilidade (média \pm dp) (cm/h)	2,92x10 ⁻² \pm 2,45x10 ^{-3(a)}	2,71x10 ⁻² \pm 1,87x10 ^{-3(a)}	2,80x10 ⁻² \pm 5,27x10 ^{-4(a)}	2,73x10 ⁻² \pm 1,87x10 ^{-3(a)}
Quantificação por espectrofotometria na região do UV	Mucosa Bucal Fresca	Mucosa Esofágica Fresca	Mucosa Bucal Congelada	Mucosa Esofágica Congelado
Fluxo (média \pm dp) ($\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$)	23,8463 \pm 3,8382 ^(a)	21,424 \pm 2,5498 ^(a)	22,6785 \pm 2,9634 ^(a)	23,2375 \pm 1,6864 ^(a)
Tempo de Latência (média \pm dp) (h)	0,4361 \pm 0,005 ^(ab)	0,7002 \pm 0,127 ^(b)	0,4355 \pm 0,274 ^(a)	0,6449 \pm 0,287 ^(ab)
Coefficiente de permeabilidade (média \pm dp) (cm/h)	2,38x10 ⁻² \pm 3,83x10 ^{-3(a)}	2,14x10 ⁻² \pm 2,55x10 ^{-3(a)}	2,27x10 ⁻² \pm 2,96x10 ^{-3(a)}	2,32x10 ⁻² \pm 1,69x10 ^{-3(a)}

Utilizou-se os testes ANOVA e SNK; valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. Letras iguais indicam que não há diferenças estatísticas significantes entre as médias. Cada parâmetro de permeabilidade foi analisado separadamente.

Com relação aos valores de fluxo (J) e coeficientes de permeabilidade (P) (Tabela 1), não foram observadas diferenças estatísticas significantes entre as diferentes condições testadas ($p > 0,05$; SNK). O fluxo da CBZ, na mucosa suína bucal, foi maior (cerca de 1,5X) que o encontrado por Giannola e colaboradores (2005), em seus estudos de permeabilidade da CBZ, através da mucosa suína bucal. Isto poderia estar relacionado tanto com o efeito reforçador do etanol, quanto com a maior quantidade de fármaco da solução doadora dos nossos experimentos (1 mg/mL *versus* 0,4 mg/mL). No entanto, o coeficiente de permeabilidade foi menor (cerca de 1,5 vezes menor) pois, conforme visto anteriormente, o cálculo do mesmo inclui a concentração inicial de fármaco no compartimento doador. Esta diferença pode ser explicada com base no tipo de membrana utilizada, considerando que o fluxo é menor quanto maior

forem as barreiras limitantes para a passagem do fármaco. Estes autores utilizaram apenas o tecido epitelial, retirando tecido conectivo e gorduroso, diferentemente do nosso estudo que incluiu o tecido conectivo. Desta forma, este tecido também poderia atuar como barreira limitante para a passagem do fármaco, reduzindo o fluxo da CBZ. Adicionalmente, Nicolazzo e colaboradores (2003) também observaram que a presença do tecido conectivo reduzia significativamente a permeabilidade da cafeína e do estradiol. Além disto, eles observaram maior tempo de latência, considerando o aumento do percurso difusional até a solução receptora. Considerando que o objetivo dos estudos de permeabilidade *ex vivo* é mimetizar as condições *in vivo*, a utilização do tecido conectivo é de suma importância, permitindo maior correlação entres estes dados.

Outra característica avaliada, não explorada para a CBZ, e muito importante para estudos de comparação da permeabilidade entre mucosas bucal e esofágica (frescas e congeladas), foi a retenção do fármaco nestas mucosas. Tal avaliação adquire maior relevância quando se considera o estudo de Squier e colaboradores (1999), que demonstrou a capacidade da mucosa bucal de atuar como reservatório de fármacos.

A Figura 15 mostra as quantidades retidas de CBZ por grama de tecido, nas diferentes condições testadas.

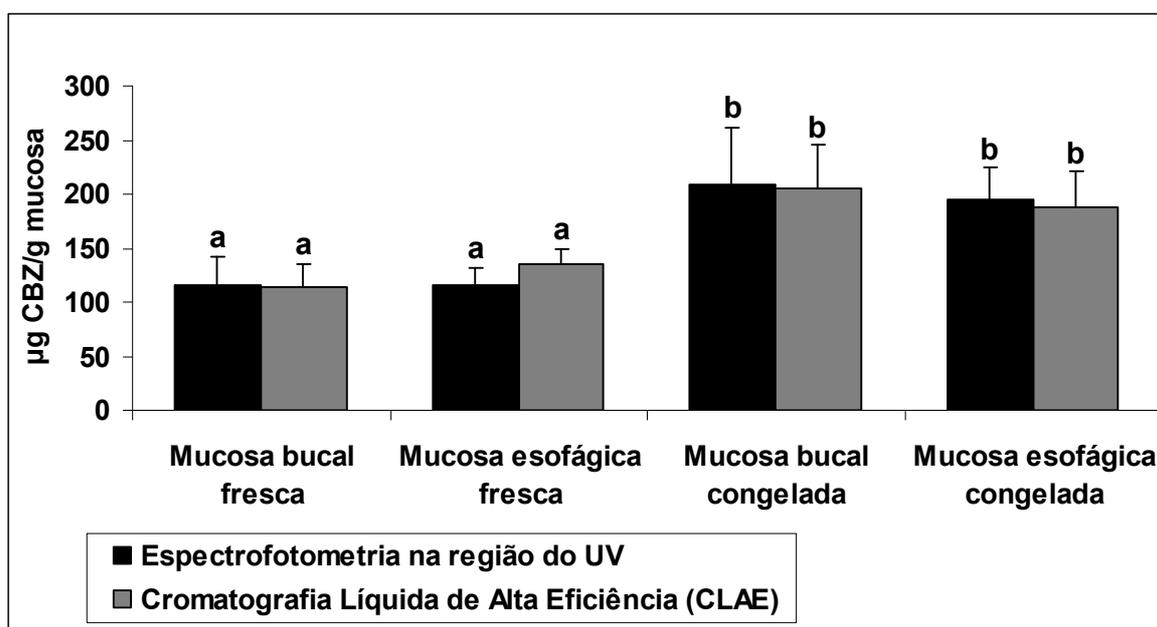


Figura 15: Quantidades retidas (μg de carbamazepina/g de mucosa) nas mucosas suínas bucal e esofágica, frescas e congeladas, através de duas metodologias de quantificação ($N=4$). Diferenças foram consideradas significativas entre os diferentes tratamentos quando $p < 0,05$ (ANOVA; SNK). Letras iguais indicam que não há diferença estatística significativa entre as médias.

As mucosas suínas esofágica e bucal não demonstraram diferenças estatísticas significantes, quanto à capacidade de retenção de fármaco ($p < 0,05$; SNK), quando comparadas entre si. No entanto, as mucosas congeladas, independente da origem, demonstraram maior capacidade de retenção que as mucosas frescas ($p < 0,05$; SNK). As duas metodologias analíticas utilizadas para a quantificação da CBZ retida nas mucosas demonstraram resultados estatisticamente semelhantes ($p < 0,05$; SNK). Esta maior capacidade de retenção das mucosas congeladas pode ser explicada quando são considerados os dados obtidos na avaliação histológica. Nesta avaliação, foi demonstrada a presença de vacúolos nas mucosas, provavelmente associada à formação extracelular de cristais de gelo, durante o processo de congelamento. A formação destes cristais parece não comprometer as propriedades de barreira das mucosas bucal e esofágica, considerando-se que os valores de fluxo não foram alterados, comparativamente, àqueles das mucosas frescas. No entanto, observou-se um aumento da retentividade, provavelmente devido ao acúmulo da CBZ nestes vacúolos.

Considerando-se as semelhanças dos perfis cinéticos de difusão da CBZ, através das diferentes mucosas, bem como sua maior capacidade de retenção nos tecidos congelados, acreditava-se que, no cálculo de balanço final da massa (Figura 16), os experimentos com tecidos congelados mostrariam menores quantidades da CBZ nas soluções doadoras. No entanto, observou-se que, as quantidades do fármaco nos compartimentos doadores, foram semelhantes em todos os experimentos ($p > 0,05$; SNK). Os altos desvios-padrões, associados as quantidades médias de fármaco presentes nas soluções doadoras, poderiam explicar esta semelhança estatística entre as diferentes condições avaliadas.

Informações sobre a quantidade inicial de fármaco adicionada no compartimento doador, a quantidade final presente nas soluções doadora e receptora, e a quantidade retida nas diferentes mucosas permitem calcular os percentuais de recuperação e de perdas experimentais, através do balanço final de massa (Figura 16). Na quantificação por CLAE, os percentuais de recuperação variaram entre 91,5 e 93,7%; enquanto que, por espectrofotometria de UV, os percentuais variaram de 84,8 a 90,1%. A diferença entre o percentual de recuperação e o percentual total teórico (sem perdas = 100%) corresponde ao percentual de perdas. Estas perdas podem ser resultantes, tanto da adsorção de CBZ nas paredes dos compartimentos da câmara de Franz, quanto da difusão por rotas indesejadas (ex.: excesso de membrana disposta lateralmente à área de difusão), ou ainda, podem ser decorrentes da degradação do fármaco pelas enzimas das mucosas bucal e esofágica. Os percentuais de perdas da CBZ variaram entre 6,3 a 8,5%, quando se utilizou CLAE, e entre 9,9 a 15,2%, quando

se utilizou espectrofotometria de UV. De forma geral, observou-se que, a espectrofotometria no UV produziu maior variação nas estimativas de perdas e de recuperação.

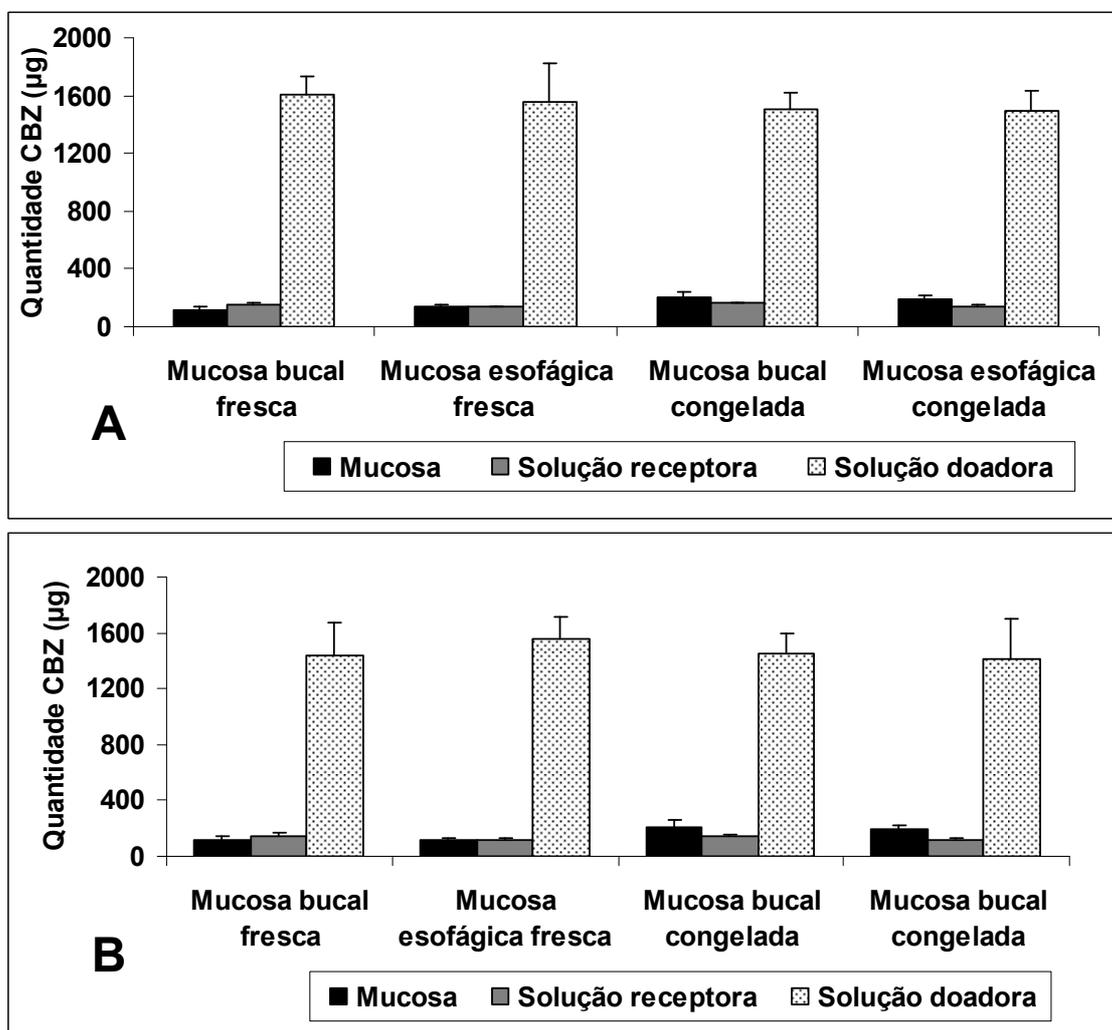


Figura 16: Balanço da massa final da carbamazepina, após sua quantificação por CLAE (A) ou espectrofotometria na região do UV (B). A quantidade total inicial da CBZ adicionada no compartimento doador foi de 2000 µg (1mg/mL).

Resumindo, os resultados obtidos demonstraram que mucosas esofágicas podem substituir as bucais nos estudos de permeabilidade *ex vivo* da CBZ, enquanto que os tecidos congelados podem substituir os frescos apenas nos estudos em que a avaliação da retenção da CBZ não é desejada, tendo em vista as diferenças encontradas entre estes tecidos quando da avaliação da mesma. Quanto à comparação entre as metodologias de quantificação, CLAE e espectrofotometria no UV, esta última pode ser utilizada nos estudos *ex vivo* de permeabilidade da CBZ, pois os dados obtidos, particularmente os parâmetros de permeabilidade, não foram estatisticamente diferentes entre estas duas técnicas. Aconselha-se um maior número de repetições dos experimentos de permeabilidade, quando da quantificação por

espectrofotometria por UV, para facilitar a detecção de diferenças entre diferentes condições testadas, bem como reduzir os desvios-padrões associados às médias.

5.1.3 AVALIAÇÃO DA PERMEABILIDADE DO ACETONIDO DE TRIANCINOLONA

Anteriormente à realização dos experimentos, as condições dos mesmos foram definidas com base na literatura. Mesmo que o AT seja utilizado, convencionalmente, em sistemas mucoadesivos para tratamento local de patologias, neste trabalho, objetivou-se otimizar a absorção do mesmo, através da utilização de agentes de solubilização, para que os parâmetros de permeabilidade (fluxo, coeficiente de permeabilidade e tempo de latência) pudessem ser estimados com maior confiabilidade. Na ausência de promotores, as quantidades de AT permeada (compartimento receptor) são pequenas e próximas aos limites de quantificação (NICOLAZZO; REED; FINNIN, 2005), o que exige a avaliação conjunta de outros parâmetros, como retenção e desaparecimento de fármaco do compartimento doador, para que as discussões se tornem mais representativas, particularmente nas situações de desenvolvimento de formulações. Como este trabalho visava facilitar aspectos experimentais, a estratégia de utilização de promotores mostrou ser mais viável.

A otimização da permeabilidade do AT exigiu várias etapas, onde foram testados diferentes promotores, mas apenas as mais relevantes são apresentadas nesta dissertação. A Figura 17 resume as condições experimentais de cada etapa, algumas limitações, direcionamentos e os principais resultados obtidos.

Em todos os experimentos, o AT foi veiculado em soluções, visando eliminar a etapa de liberação do componente ativo, comum em formas farmacêuticas sólidas (no caso, comprimidos mucoadesivos), reduzindo o tempo de duração dos experimentos.

Diferentes promotores químicos de permeabilidade, tais como dodecil sulfato de sódio (SDS), dimetilsulfóxido (DMSO) e etanol foram testados e a escolha das concentrações considerou aspectos da solubilidade do fármaco, bem como relatos de toxicidade destes promotores. A utilização do SDS, com este propósito, é bastante antiga e, segundo Scheuplein e Ross (1970), os surfactantes aniônicos são mais efetivos que os catiônicos ou não-iônicos, justificando sua escolha neste trabalho. Já o DMSO, um solvente dipolar, miscível em água e solventes orgânicos, é utilizado pela sua capacidade de acelerar a permeação de compostos, tais como esteróides, salicilatos e antimicóticos (JANTHARAPRAPAP; STAGNI, 2007), mediante modificações do conteúdo lipídico da membrana celular. Segundo Prista, Bahia e Pilar (1992), este aumento da permeabilidade, nas concentrações de 2 a 20%, é reversível e desaparece ao final de três horas, demonstrando que a desorganização do conteúdo

lipídico não é permanente. Embora a semelhança estrutural do AT com os esteróides sugerisse que este promotor seria adequado para melhorar a absorção do AT, os resultados não foram satisfatórios, estimulando a pesquisa por outros promotores, tendo em vista que, a elevação da concentração do mesmo, resultaria em problemas de toxicidade celular, além de limitações analíticas (redução da vida útil da coluna de separação). Neste sentido, o etanol foi utilizado como substituto do DMSO, eliminando os problemas citados acima, com a vantagem de melhorar a permeação do AT de forma significativa, fato comprovado experimentalmente.

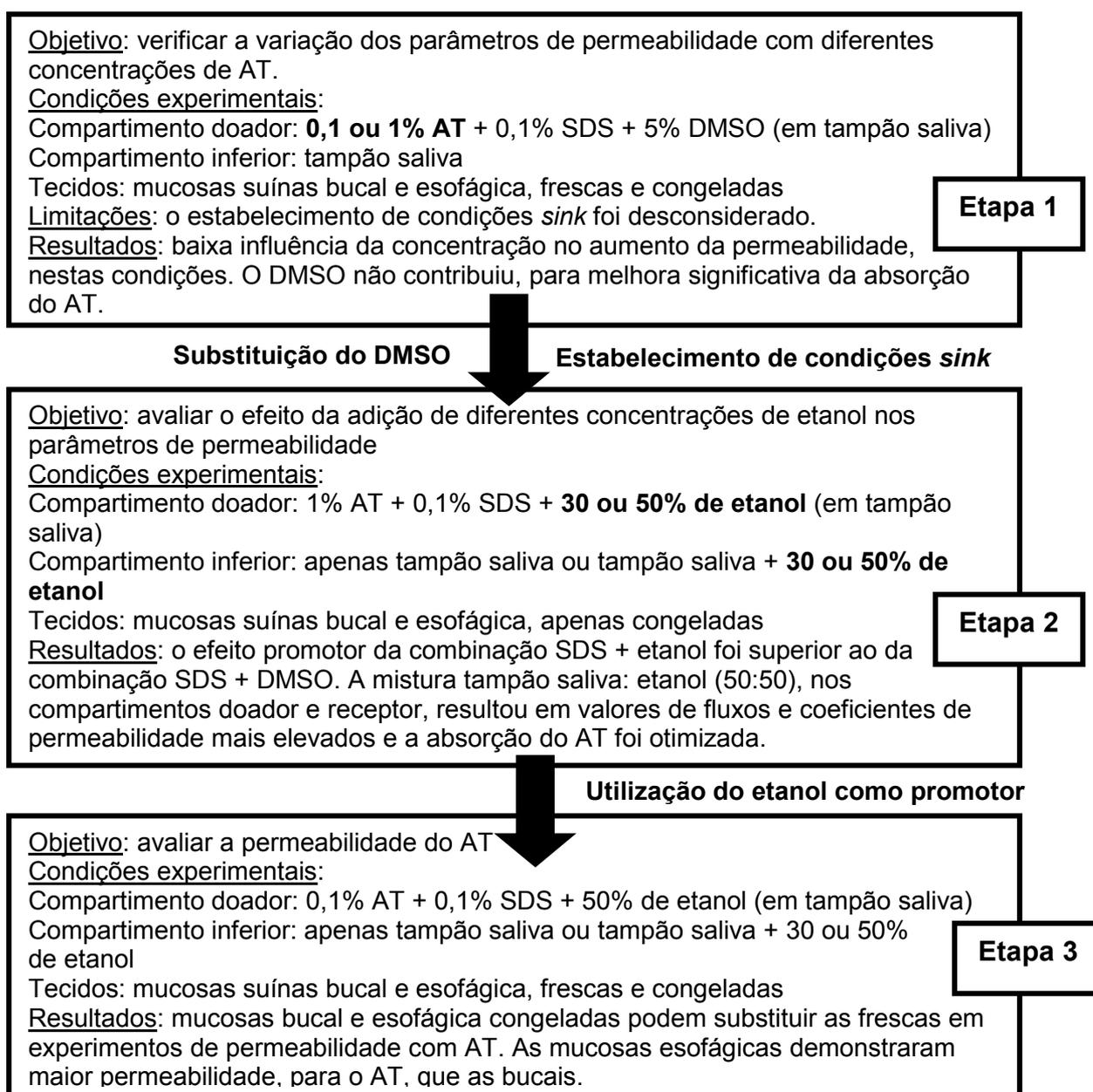


Figura 17: Fluxograma das principais etapas experimentais referente à avaliação da permeabilidade ex vivo do AT, através das mucosas bucais e esofágicas, visando à otimização das condições experimentais.

Na primeira etapa experimental, optou-se por testar a permeabilidade do AT nas concentrações de 0,1% (p/V), conforme os estudos de Shin e Kim (2000), e de 1% (p/V). Em situações em que o fármaco é lipofílico e, preferencialmente, transportado por sistemas de difusão passiva, como no caso do AT, variações de concentração do fármaco, no compartimento doador, são interessantes, pois um aumento desta concentração poderia potencialmente provocar aumento da permeabilidade (SHOJAEI et al., 1998). Este tipo de abordagem, relacionado à elevação da concentração do fármaco, não muito freqüente, pode ser utilizado quando se deseja reduzir a concentração dos promotores químicos utilizados, ou até mesmo, eliminá-los.

A avaliação da permeabilidade do AT, nas mucosas bucal e esofágica suínas, frescas e congeladas, incluiu tanto a análise do perfil de permeabilidade (quantidade permeada x tempo; Figura 18), quanto o cálculo dos parâmetros de permeabilidade: [fluxo (J; $\mu\text{g}/\text{cm}^2\cdot\text{h}$), coeficiente de permeabilidade (P; cm/h) e tempo de latência (L_T ; h)] (Tab. 2 e 3).

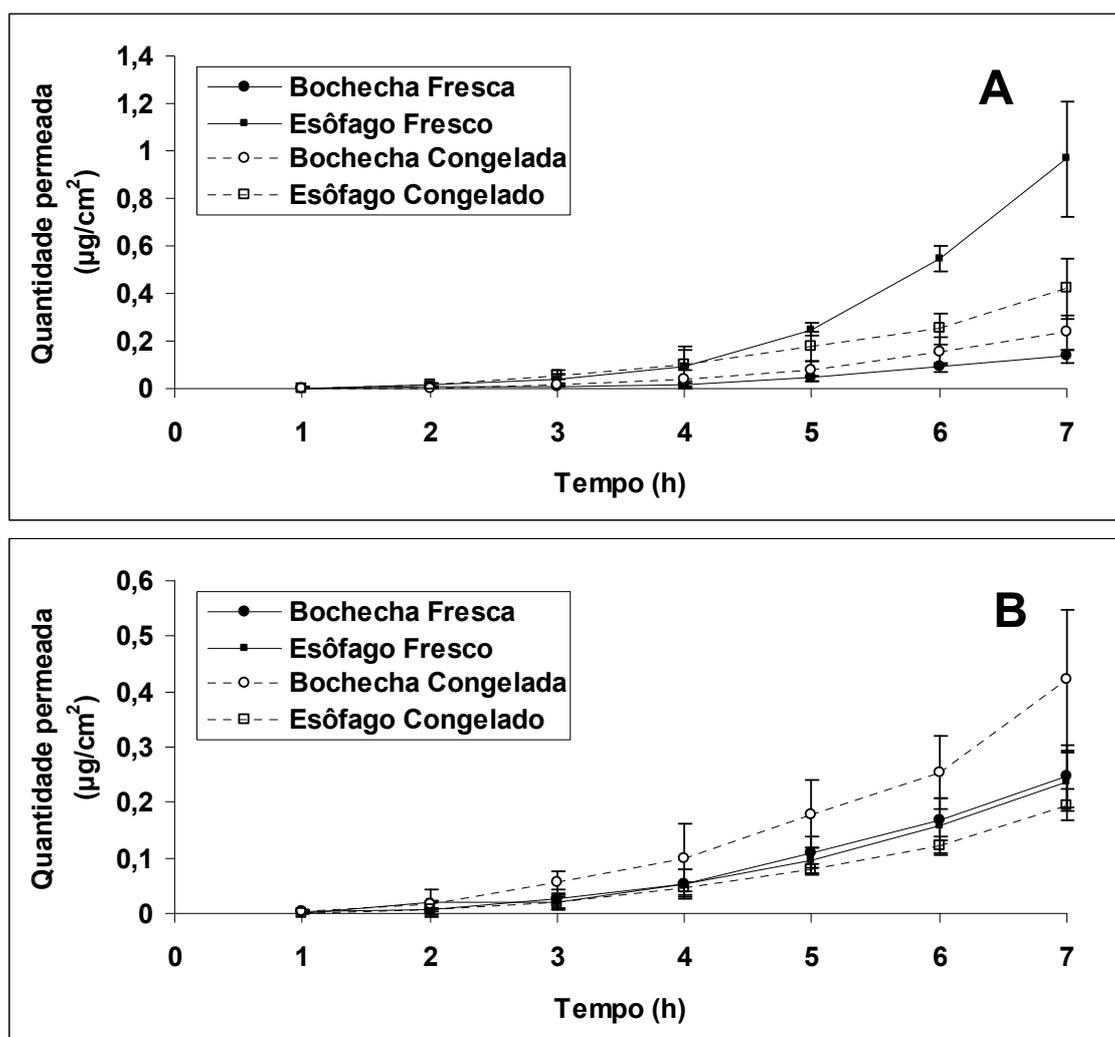


Figura 18: Avaliação da permeabilidade do acetonido de triancinolonona, através das mucosas suínas bucal e esofágica, frescas e congeladas. Compartimento doador: 0,1% AT (A) ou 1% AT (B); 0,1% SDS; 5% DMSO. Compartimento receptor: tampão salina. (N=3)

A análise dos perfis de difusão do AT (Figura 18) demonstrou que a quantidade de fármaco permeada (compartimento receptor), aumentou com o tempo. No(s) primeiro(s) intervalo(s), anterior(es) ao tempo de latência, é comum a não diferenciação entre as condições testadas, em função da ausência ou baixa permeabilidade. Isto reforça a idéia de que a duração dos experimentos deve ser superior a 3X o tempo de latência (SHAH, 1993), uma vez que, se houver diferenças entre as condições testadas, elas poderão ser evidenciadas após o cálculo dos parâmetros de permeabilidade (que consideram todo o perfil de difusão) e o tratamento estatístico.

Quando foram considerados os valores de fluxo (J), nos experimentos com AT a 0,1% (p/V) (Tab. 2), não houve diferenças estatísticas significativas entre tecidos frescos e congelados; no entanto, a mucosa esofágica demonstrou maior permeabilidade ($p < 0,05$; SNK). Nos experimentos utilizando AT a 1% (p/V) (Tab. 3), todos os valores de fluxo foram estatisticamente iguais ($p > 0,05$; SNK), tanto nos tecidos frescos quanto congelados e entre as diferentes mucosas. O tempo de latência do AT, de todas as condições testadas (Tab. 2 e 3), situou-se entre 3 e 4 h, demonstrando baixa permeabilidade do fármaco, mesmo na presença dos promotores de permeabilidade testados (0,1% SDS e 5% DMSO), o que exigiu a adoção de outras estratégias de promoção mais efetivas.

Com relação ao coeficiente de permeabilidade (P), esperava-se uma elevação dos mesmos com o aumento da concentração do AT no compartimento doador, tendo em vista que o fármaco é transportado passivamente através das mucosas. No entanto, mesmo com pequeno aumento do fluxo (J), em muitos casos, observou-se a redução dos coeficientes de permeabilidade nestes experimentos com 1% (p/V) de AT, particularmente, naqueles que utilizavam mucosas esofágicas (frescas e congeladas). Como o compartimento receptor era constituído por solução tampão saliva e o fármaco é pouco solúvel nestas condições, acredita-se que este baixo coeficiente de permeabilidade, obtido mesmo na maior concentração do AT (1%, p/V), relaciona-se a limitações de solubilidade e ao não atendimento das condições *sink*. Outra explicação para este menor coeficiente de permeabilidade, em concentrações mais elevadas, seria a possibilidade de recristalização do fármaco, fenômeno comum com fármacos altamente lipofílicos e em condições de supersaturação, como descrito por Moser et al. (2001b). Quando os promotores químicos provocam irritação em mucosas ou pele, o fenômeno de supersaturação pode ser utilizado para aumentar a atividade termodinâmica do fármaco na formulação e, conseqüentemente, aumentar a permeabilidade. No entanto, este fenômeno pode levar à recristalização do fármaco e,

muitas vezes, há necessidade de se adicionar polímeros para retardar esta cinética de recristalização, fato desconsiderado neste trabalho.

Tabela 2: Resultados obtidos durante a avaliação da permeabilidade do **Acetonido de Triancinolona 0,1% (p/V)**, através de mucosas suínas bucal e esofágica (frescas e congeladas) (N=3).

Parâmetros avaliados	Mucosa Bucal Fresca	Mucosa Esofágica Fresca	Mucosa Bucal Congelada	Mucosa Esofágica Congelada
Fluxo (média ± dp) ($\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$)	0,0399 ± 0,0004 ^(a)	0,2916 ± 0,0542 ^(b)	0,0678 ± 0,0004 ^(a)	0,3325 ± 0,0254 ^(b)
Tempo de latência (média ± dp) (h)	3,7219 ± 0,0218 ^(ab)	3,9100 ± 0,0369 ^(a)	3,6394 ± 0,0054 ^(b)	3,4818 ± 0,1515 ^(b)
Coefficiente de permeabilidade (média ± dp) (cm/h)	3,99x10 ⁻⁵ ± 4x10 ^{-7(a)}	2,916x10 ⁻⁴ ± 5,542x10 ^{-5(b)}	6,678x10 ⁻⁵ ± 4x10 ^{-7(a)}	3,325x10 ⁻⁴ ± 2,54x10 ^{-5(b)}

Utilizou-se os testes ANOVA e SNK; valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. Letras iguais indicam que não há diferenças estatísticas significantes entre as médias. Cada parâmetro de permeabilidade foi analisado separadamente.

Tabela 3: Resultados obtidos durante a avaliação da permeabilidade do **Acetonido de Triancinolona 1% (p/V)** através de mucosas suínas bucal e esofágica (frescas e congeladas) (N=3).

Parâmetros avaliados	Mucosa Bucal Fresca	Mucosa Esofágica Fresca	Mucosa Bucal Congelada	Mucosa Esofágica Congelada
Fluxo (média ± dp) ($\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$)	0,0641 ± 0,0273 ^(a)	0,0697 ± 0,0432 ^(a)	0,1041 ± 0,0583 ^(a)	0,0724 ± 0,0395 ^(a)
Tempo de latência (média ± dp) (h)	3,5972 ± 0,8078 ^(a)	3,7463 ± 0,3407 ^(a)	3,2209 ± 0,3149 ^(a)	3,4727 ± 0,5161 ^(a)
Coefficiente de permeabilidade (média ± dp) (cm/h)	6,41x10 ⁻⁵ ± 2,73x10 ^{-5(a)}	6,97x10 ⁻⁵ ± 4,32x10 ^{-5(a)}	1,041x10 ⁻⁴ ± 5,83x10 ^{-5(a)}	7,24x10 ⁻⁵ ± 3,95x10 ^{-5(a)}

Utilizou-se os testes ANOVA e SNK; valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. Letras iguais indicam que não há diferenças estatísticas significantes entre as médias. Cada parâmetro de permeabilidade foi analisado separadamente.

Através dos resultados obtidos, pôde-se determinar o modelo de cinética de difusão do AT empregando-se regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados, para a AT ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) em função do tempo (h) (modelo de cinética de ordem zero) e em função de raiz quadrada do tempo ($t^{1/2}$) (modelo de cinética segundo Higuchi) (KALIA; GUY, 2001).

Segundo Shah e colaboradores (1994), aceita-se como valor de coeficiente de correlação adequado, na determinação do modelo de cinética, aquele igual ou superior

a 0,997. A maior parte das repetições apresentou como modelo de cinética para a liberação do AT o de ordem zero, com coeficiente de correlação superior a 0,997. Apenas o intervalo linear, superior ao tempo de latência, foi considerado para o cálculo do R^2 (dados não mostrados). Shah (1993) relatou que a duração total do experimento deve ser superior a 3X o tempo de latência, para que os valores de fluxo sejam mais representativos, sem que sejam sub ou superestimados. No entanto, este requisito não foi respeitado nestes experimentos, agregando erro aos valores de fluxo obtidos.

Em síntese, nesta primeira etapa experimental, não se observou uma influência significativa da concentração do AT no aumento da sua permeabilidade, com resultados bastante inconsistentes. A combinação dos promotores químicos DMSO (5%, v/v) e SDS (0,1%, p/v) foi pouco efetiva para a melhoria da permeabilidade, considerando-se os baixos valores de fluxo e o longo tempo de latência, comparativamente, aos experimentos realizados preliminarmente (dados não mostrados).

Aspectos como a baixa permeabilidade do fármaco, o não estabelecimento da condição *sink* e a baixa solubilidade do fármaco estimularam a realização de novos experimentos (Etapa 2), priorizando estas questões. O objetivo foi reduzir o tempo de latência e aumentar os valores de fluxos e dos coeficientes de permeabilidade. Assim sendo, optou-se pela utilização de estratégias de promoção mais efetivas, que possibilitassem incrementos de permeabilidade (com redução do tempo de latência) e solubilidade. Nesta perspectiva, o etanol é considerado um promotor promissor, pois além de efeitos diretos na permeabilidade da pele e mucosas, ele também facilita a solubilização de outros promotores, amplificando o efeito de modulação lipídica (BERNER; LIU, 1995). Optou-se por utilizar duas concentrações de etanol (30 e 50%) com base no trabalho de Sznitowska (1996), que mostrou melhor efeito promotor, na pele, em concentrações entre 25 e 50%.

Para testar a efetividade do etanol como promotor de permeabilidade do AT, sinergicamente ao efeito do promotor SDS (0,1%, p/v), diferentes proporções de etanol foram testadas (30 e 50%, v/v). Tendo em vista o grande estoque de mucosas congeladas, bem como o propósito desta etapa em testar o efeito promotor do etanol, para otimizar as condições experimentais, optou-se pela utilização somente de tecidos congelados, sem necessidade de deslocamento ao abatedouro. O Quadro 5 resume o delineamento experimental e os resultados obtidos.

Quadro 5: Resumo do delineamento experimental (composição das soluções dos compartimentos superior e inferior) e dos principais resultados obtidos para os parâmetros de permeabilidade: fluxo (J), tempo de latência (T_L) e coeficiente de permeabilidade.

Delineamento	A	B	C	D	E	F	G	H
Compartimento superior V = 2 mL	1% fármaco 30% etanol 0,1% SDS	1% fármaco 50% etanol 0,1% SDS	1% fármaco 30% etanol 0,1% SDS	1% fármaco 50% etanol 0,1% SDS	1% fármaco 30% etanol 0,1% SDS	1% fármaco 50% etanol 0,1% SDS	1% fármaco 30% etanol 0,1% SDS	1% fármaco 50% etanol 0,1% SDS
Compartimento inferior V = 10 mL	Etanol: tampão saliva (50:50)	Etanol: tampão saliva (50:50)	Tampão saliva	Tampão saliva	Etanol: tampão saliva (50:50)	Etanol: tampão saliva (50:50)	Tampão saliva	Tampão saliva
Tecido	Mucosa bucal congelada	Mucosa bucal congelada	Mucosa bucal congelada	Mucosa bucal congelada	Mucosa esofágica congelada	Mucosa esofágica congelada	Mucosa esofágica congelada	Mucosa esofágica congelada

Resultados – Parâmetros de Permeabilidade (fluxo, coeficiente de permeabilidade, tempo de latência); (N=1).

Fluxo (J) ($\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$)	42,265	77,961	3,8353	10,046	45,556	107,11	0,4413	0,3454
Tempo de latência (T_L) (h)	1,09173	0,56923	1,24454	0,36873	1,18397	0,83675	0,05937	0,56688
Coeficiente de Permeabilidade (P) (cm/h)	$4,23 \times 10^{-2}$	$7,796 \times 10^{-2}$	$3,84 \times 10^{-3}$	$1,005 \times 10^{-2}$	$4,56 \times 10^{-2}$	$1,07 \times 10^{-1}$	$4,413 \times 10^{-4}$	$3,454 \times 10^{-4}$

Quando da análise dos valores obtidos, relativos aos parâmetros de permeabilidade, notou-se que o tempo de latência teve redução significativa (cerca de 3 a 4X), em relação aos experimentos anteriores. Quanto maior a proporção de etanol, no compartimento doador, notou-se que menor é o tempo de latência, pois melhor é o particionamento do fármaco nas mucosas bucal e esofágica. A duração total do experimento foi maior que 3X o tempo de latência, requisito este a ser cumprido, segundo Shah e colaboradores (1993), para que os valores de fluxo e outros parâmetros de permeabilidade possam ser calculados com maior confiabilidade.

Com relação aos valores de fluxo, observou-se um aumento dos mesmos com o aumento da proporção de etanol, com exceção da condição H.

Na mucosa bucal, o aumento da proporção de etanol de 30 para 50%, no compartimento doador, aumentou o valor de fluxo em 1,84X, quando o compartimento receptor continha etanol: tampão saliva (50:50) e em 2,61X, quando era somente tampão saliva.

Na mucosa esofágica, este mesmo aumento da proporção de etanol, no compartimento doador, promoveu um aumento do fluxo em 2,35X, quando o meio receptor foi etanol: tampão saliva (50:50), porém, reduziu em 1,28X quando o compartimento receptor continha apenas tampão saliva. Isto demonstra que o etanol teve um papel reforçador da permeabilidade do AT, quando utilizado em concentrações elevadas (30 e 50% V/V), comparando-se com as situações anteriores. No entanto, a condição *sink* deve ser considerada para que, muitas vezes, este efeito promotor não seja perdido (considerar condição H em que o meio receptor foi constituído apenas por tampão saliva).

As cinéticas de difusão que relacionam a quantidade permeada do fármaco ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) em função do tempo (h), em condições nas quais o meio receptor era constituído por tampão saliva ou por uma mistura deste tampão com etanol (50%), permitem visualizar a importância da manutenção da condição *sink* nestes estudos de permeabilidade *ex vivo* (Figura 19).

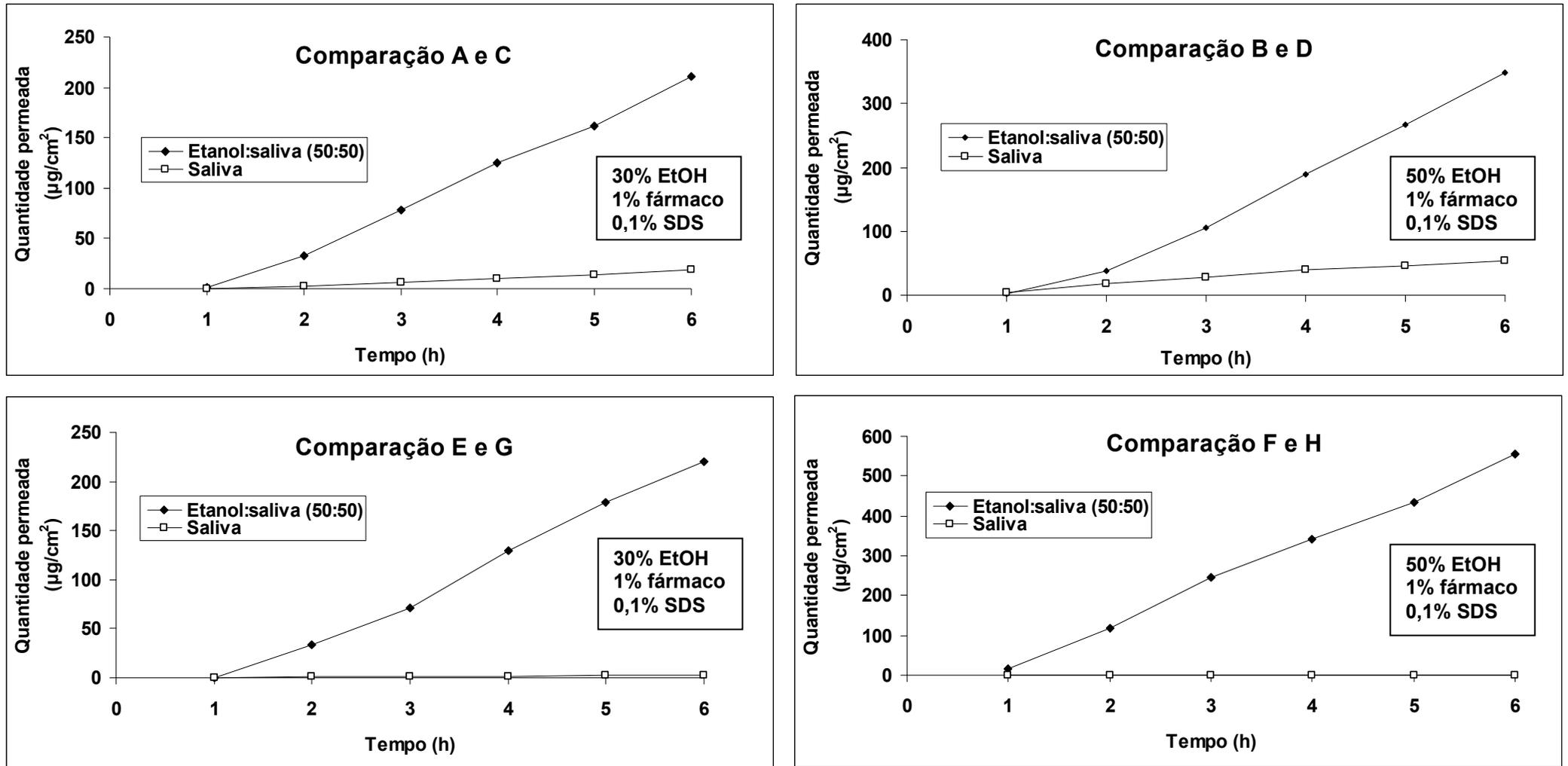


Figura 19: Cinéticas de difusão do acetonido de triancinolona (1% p/V), através das mucosas suínas bucal (A,B,C,D) e esofágica (E,F,G,H), ambas congeladas (N=1). As letras (A,B,C,D,E,F,G,H) representam as diferentes condições experimentais, conforme consta no Quadro 5. EtOH = etanol; SDS = dodecil sulfato de sódio.

O modelo cinético de ordem zero foi preponderante nas situações testadas, sendo que apenas os intervalos lineares foram considerados para o cálculo dos coeficientes de correlação. Os coeficientes de correlação apresentaram valores superiores a 0,997, com exceção das condições G e H. No entanto, para essas condições, quando foi plotada a quantidade permeada ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) versus raiz quadrada do tempo ($\text{h}^{1/2}$), os valores dos coeficientes de correlação obtidos foram inferiores ($R^2=0,9648$ para G; $R^2=0,9765$ para H) ao obtido com o modelo cinético de ordem zero ($R^2=0,9933$ para G; $R^2=0,9879$ para H) sugerindo que, este último modelo, é mais representativo para estes casos. Novos experimentos poderiam esclarecer esta dúvida, considerando que foi realizada apenas uma repetição de cada condição.

A combinação dos promotores químicos etanol (30 e 50% V/V) e SDS (0,1% p/V) demonstrou maior eficácia, comparativamente à combinação DMSO (5% V/V) e SDS (0,1% p/V) (Figura 19) na progressão da permeabilidade do AT. Considerando aspectos de citotoxicidade, o etanol pode ser utilizado com maior segurança, em concentrações mais elevadas do que as de DMSO, optando-se então pela utilização do primeiro nos experimentos subsequentes (Etapa 3, Figura 17).

Tendo sido comprovados a baixa influência da concentração no aumento da permeação do AT (Etapa 1, Figura 17) e o potencial promotor do etanol (Etapa 2, Figura 17), definiu-se como condições experimentais da etapa 3: compartimento superior (0,1% fármaco; 0,1% SDS; tampão saliva: etanol – 50:50) e compartimento inferior (tampão saliva: etanol – 50:50). Com estes experimentos, objetivou-se determinar se a mucosa esofágica poderia substituir a mucosa bucal em experimentos de permeabilidade, tendo em vista as vantagens já citadas, e se o congelamento dos tecidos provocaria alterações nos parâmetros de permeabilidade.

As cinéticas de difusão do AT (Figura 20) mostraram um aumento da permeabilidade com o tempo. Notou-se que, nos intervalos iniciais (1,2,3 e 4h), apenas as mucosas bucais frescas e congeladas permearam a mesma quantidade de fármaco no compartimento receptor ($p>0,05$; SNK), com maior quantidade permeada no caso do esôfago congelado. Nos intervalos finais (5 e 6h), o AT mostrou comportamentos semelhantes ($p>0,05$; SNK) entre tecidos frescos e congelados, sendo superior através da mucosa esofágica (fresca e congelada), visível no gráfico. Esta análise fragmentada, comparando-se as diferentes mucosas em cada tempo isolado, torna as discussões não conclusivas. Assim, todo o perfil cinético de difusão pode ser resumido em variáveis, os parâmetros de permeabilidade, que tornaram estas discussões mais objetivas e representativas.

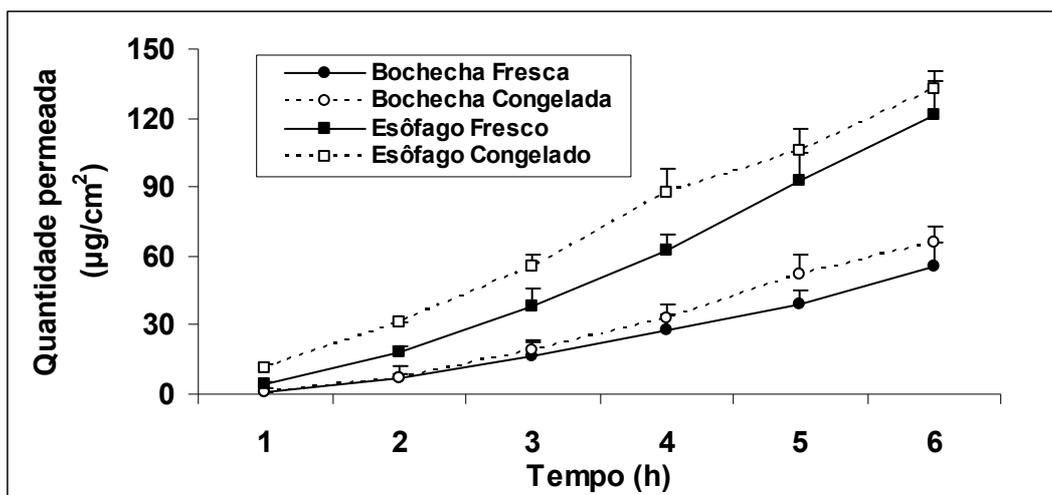


Figura 20: Cinéticas de difusão do acetonido de triancinolona, através das mucosas suínas bucal e esofágica, frescas e congeladas. Condições experimentais: compartimento doador: 0,1% fármaco; 0,1% SDS; 50% EtOH. Compartimento receptor: tampão saliva: etanol (50:50) (N=4).

Os perfis cinéticos de difusão do AT (Figura 20) demonstraram a prevalência do modelo cinético de ordem zero. Nas situações em que o tempo de latência foi inferior ao primeiro tempo de coleta (1h), todos os pontos foram considerados para análise do perfil cinético e do cálculo do coeficiente de correlação. Nas demais situações, os primeiros intervalos de tempo foram desconsiderados e apenas o intervalo linear (onde o estado de fluxo foi constante) foi considerado para que o coeficiente de correlação alcançasse o valor esperado (acima de 0,997), bem como para os cálculos dos parâmetros de permeabilidade.

Para fármacos lipofílicos, como o AT, frequentemente observa-se um desaparecimento bioexponencial dos fármacos da cavidade oral (KUROSAKI; YANO; KIMURA, 1997), sugerindo rápida permeabilidade do fármaco por particionamento através do epitélio bucal, seguida de retenção tecidual e baixa transferência para a circulação sistêmica (HO; 1993). Este comportamento também foi observado por Nicolazzo e colaboradores (2005), quando a taxa de desaparecimento do AT do compartimento doador foi cerca de 18,8X maior que a taxa de aparecimento no compartimento receptor, indicando alta retenção ou estocagem do fármaco na mucosa, ou ainda, perda de fármaco nas paredes dos compartimentos.

A adição do etanol, neste estudo, contribuiu para aumentar a taxa de transferência do AT das camadas subjacentes ao epitélio para a via sistêmica, considerando-se a redução do tempo de latência (entre 0,65 e 1,29h – Tab. 4), em relação aos experimentos anteriores.

Tabela 4: Resultados obtidos durante a avaliação da permeabilidade do acetato de triancinolona 0,1% (p/V), através de mucosas suínas bucal e esofágica (frescas e congeladas) (N=4).

Parâmetros avaliados	Mucosa Bucal Fresca	Mucosa Esofágica Fresca	Mucosa Bucal Congelada	Mucosa Esofágica Congelada
Fluxo (média ± dp) ($\mu\text{g}/\text{cm}^2\cdot\text{h}$)	10,806 ± 1,4842 ^(a)	23,840 ± 3,0147 ^(b)	13,427 ± 1,7099 ^(a)	24,757 ± 0,2871 ^(b)
Tempo de Latência (média ± dp) (h)	1,280 ± 0,1890 ^(a)	1,131 ± 0,1277 ^(a)	1,296 ± 0,0708 ^(a)	0,6529 ± 0,1599 ^(b)
Coefficiente de permeabilidade (média ± dp) (cm/h)	1,08x10 ⁻² ± 1,484x10 ^{-3(a)}	2,384x10 ⁻² ± 3,015x10 ^{-3(b)}	1,34x10 ⁻² ± 1,7099x10 ^{-3(a)}	2,4757x10 ⁻² ± 2,871x10 ^{-4(b)}

Utilizou-se os testes ANOVA e SNK; valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. Letras iguais indicam que não há diferenças estatísticas significantes entre as médias. Cada parâmetro de permeabilidade foi analisado separadamente.

Com relação aos valores de fluxo (Tab. 4), embora se tenha observado um pequeno aumento na permeabilidade dos tecidos congelados, este aumento não foi considerado significativo ($p < 0,05$; SNK). O congelamento provocou pequenos danos teciduais, porém eles não afetaram as propriedades de barreira das mucosas, no caso do AT, nas condições experimentais testadas, possibilitando a utilização de tecidos congelados em substituição aos frescos.

Esta mesma comparação entre mucosa bucal suína fresca e congelada foi realizada por Van Eky (2006). Neste estudo, um dos fármacos utilizados foi o 17- β -estradiol, que possui características físico-químicas e estruturais similares às do AT. A análise da curva, que relaciona a quantidade permeada de fármaco em função do tempo, não mostrou diferenças entre tecidos frescos e congelados. Mesmo com um tempo experimental relativamente alto de 24 h, não ocorreu constância no estado de fluxo. A média estimada para o fluxo do 17- β -estradiol, através da mucosa bucal suína, foi 24% maior no tecido congelado em relação ao tecido fresco.

Outro estudo mais elaborado, também com o estradiol, realizado por Nicolazzo e colaboradores (2003), avaliou o efeito do congelamento do epitélio e da mucosa bucal (epitélio + tecido conectivo) suínos na permeabilidade. Não foi possível calcular o fluxo do estradiol, quando os estudos de permeabilidade foram conduzidos com a mucosa bucal, mas a análise da quantidade permeada demonstrou semelhança entre os dois tratamentos: fresco e congelado. Com o epitélio, teoricamente mais permeável que a mucosa bucal, em função da redução do caminho difusional, o armazenamento do mesmo a -20°C , por um mês, não afetou os valores de fluxo e da quantidade

permeada de estradiol, também sugerindo que os tecidos congelados podem substituir os frescos considerando esta mesma abordagem experimental.

Quando se compararam os valores de fluxo do AT, entre as mucosas suínas bucal e esofágica (Tabela 4), detectou-se diferenças estatísticas significativas entre elas ($p < 0,05$; SNK). A mucosa esofágica fresca apresentou um valor de fluxo 2,2X maior que o da mucosa bucal fresca. A mucosa esofágica congelada demonstrou um valor fluxo 1,84X maior que o da mucosa bucal congelada. Esta mesma análise comparativa foi realizada por Consuelo e colaboradores (2005b), utilizando o citrato de fentanil (CF). Os valores de fluxo e as cinéticas de difusão foram similares para ambas as mucosas. Em outro estudo realizado por este mesmo grupo (CONSUELO et al., 2005a), foram comparados os perfis lipídicos das mucosas suínas esofágica e bucal e poucas diferenças foram encontradas entre ambas. No entanto, os autores afirmaram que uma das limitações de seus estudos foi à utilização de um único modelo de fármaco para avaliar diferentes condições.

Assim sendo, acredita-se que as características físico-químicas diferenciadas entre estes dois fármacos (AT e CF) expliquem tais comportamentos divergentes. O citrato de fentanil é um fármaco potencialmente ionizável e, desta forma, segue pela via paracelular (SQUIER; HALL, 1985), diferentemente do AT que é fracamente ionizável. Outra explicação, de caráter especulativo, poderia ser a existência de um sistema enzimático diferenciado nestas mucosas. No caso do AT, ocorreria maior degradação na mucosa bucal e isto explicaria a menor permeabilidade ou valor de fluxo. Outra hipótese poderia ser uma interação diferenciada com os lipídeos da via de transporte nas mucosas.

Resumindo, os resultados obtidos demonstraram que as mucosas esofágicas não podem substituir as mucosas bucais nos estudos de permeabilidade *ex vivo* do AT, tendo em vista que os parâmetros de permeabilidade obtidos foram diferentes. Embora o congelamento provocasse pequenos danos teciduais (item 5.1.1), ele não afetou as propriedades de barreira das mucosas, no caso do AT, nas condições experimentais testadas, tornando possível a substituição dos tecidos congelados pelos frescos. O estabelecimento das condições *sink* e de eficiente estratégia de reforço foram importantes para a otimização das condições experimentais, gerando dados mais confiáveis e representativos que tornaram esta discussão mais objetiva.

5.2 AVALIAÇÃO *EX VIVO* DA PERMEAÇÃO DOS PARABENOS, ATRAVÉS DA PELE DE ORELHA SUÍNA

5.2.1 PERMEAÇÃO CUTÂNEA DOS PARABENOS ISOLADOS

A possibilidade dos parabenos serem absorvidos sistemicamente, interferindo em diferentes sistemas orgânicos, reforça a necessidade de estudos avaliando a segurança dos mesmos. Estes estudos devem considerar tanto a frequência de utilização de produtos que contenham parabenos (que é bastante alta quando se consideram os cosméticos), o período de exposição, além da possibilidade de interação dos mesmos com outros componentes das formulações.

Inicialmente, estudou-se a permeação *ex vivo* dos principais parabenos isolados (metil, etil, propil e butilparabeno) para, então, prosseguir com a avaliação da interação entre os mesmos, mediante delineamento fatorial. O meio de dissolução, foi constituído por PBS:etanol (80:20). Optou-se pela utilização do etanol, como reforçador de permeação, em função das vantagens anteriormente reconhecidas. Para possibilitar maior correlação com os dados *in vivo*, a forma farmacêutica testada deve ser equivalente à utilizada na prática. É comum a utilização de parabenos como conservantes em xampus, soluções de uso tópico, entre outras aplicações. Assim sendo, para os estudos de permeação, soluções destes adjuvantes farmacêuticos demonstraram maior conveniência. Além disto, esta forma farmacêutica elimina a etapa de liberação do adjuvante da formulação, facilitando a difusão dos mesmos no veículo. Com isto, o tempo de latência e o tempo total experimental são reduzidos e a constância no estado de fluxo é atingida mais rapidamente. Lembrando que, quanto menor o tempo experimental, menor as chances de comprometimento da viabilidade das camadas viáveis, subjacentes ao estrato córneo.

Após a realização dos experimentos *ex vivo*, procedeu-se à quantificação dos parabenos por EC. Alguns resultados desta quantificação podem ser visualizados nas Figuras 21 e 22. Semelhantemente aos outros experimentos de permeação, notou-se um aumento da quantidade permeada dos parabenos com o tempo, com exceção do BP a presença do mesmo não foi detectada, nos três intervalos de tempo iniciais.

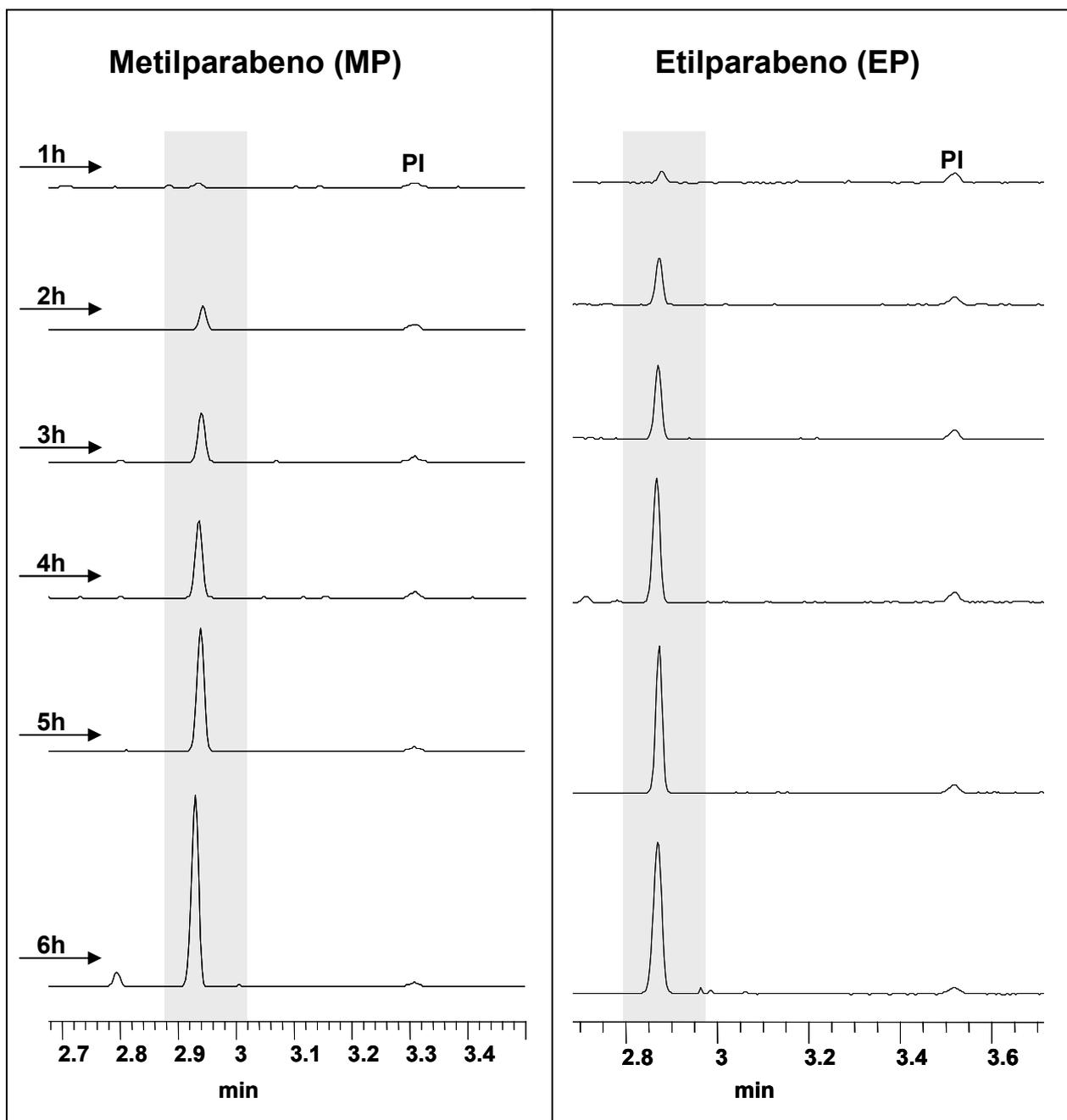


Figura 21: Eletroferogramas referentes à quantidade de metil e etilparabeno permeada na pele de orelha suína. Os eletroferogramas foram sobrepostos, ordenando-os de forma crescente em relação aos tempos de permeação.

Condições analíticas: capilar, 48,5 cm L_{tot} ; 40 cm L_{det} (50 μm d.i.); eletrólito de corrida, 30 mmol L^{-1} tetraborato de sódio (TBS); tensão, 30 kV; polaridade positiva; injeção hidrodinâmica, 50 mbar durante 10 s. PI (padrão interno): ácido 3,5-dinitrobenzóico 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Detecção UV-Vis (λ 297 nm).

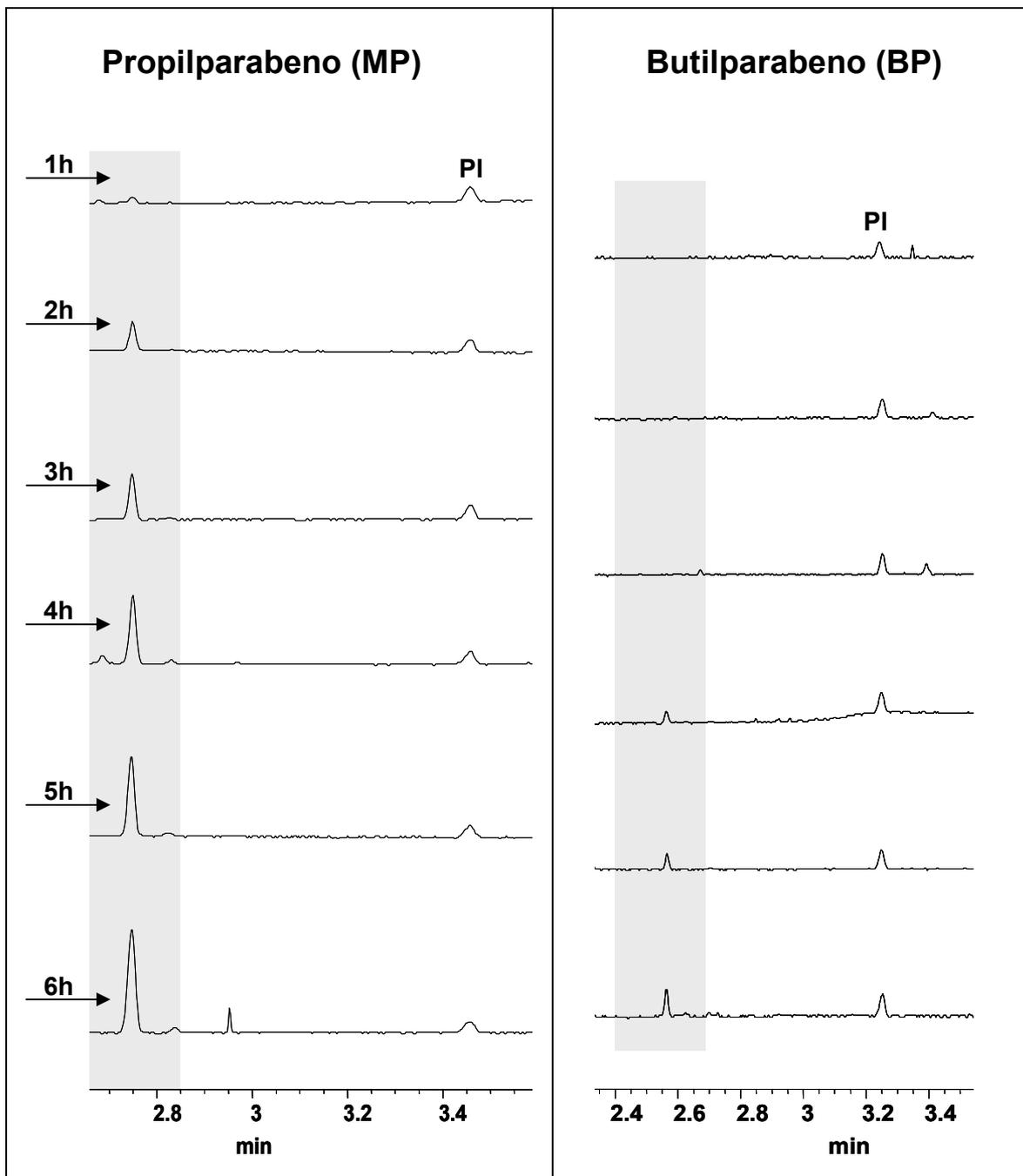


Figura 22: Eletroferogramas referentes à quantidade de propil e butilparabeno permeada na pele de orelha suína. Os eletroferogramas foram sobrepostos, ordenando-os de forma crescente em relação aos tempos de permeação.

Condições analíticas: capilar, 48,5 cm L_{tot} ; 40 cm L_{det} (50 μm d.i.); eletrólito de corrida, 30 mmol L^{-1} tetraborato de sódio (TBS); tensão, 30 kV; polaridade positiva; injeção hidrodinâmica, 50 mbar durante 10 s. PI (padrão interno): ácido 3,5-dinitrobenzóico 20 μg mL^{-1} . Detecção UV-Vis (λ 297 nm).

Após obtenção dos eletroferogramas e tratamento dos dados, obtiveram-se os diferentes perfis de difusão para os parabenos em estudo, agrupando-os em um único gráfico para facilitar a análise comparativa dos mesmos (Figura 23).

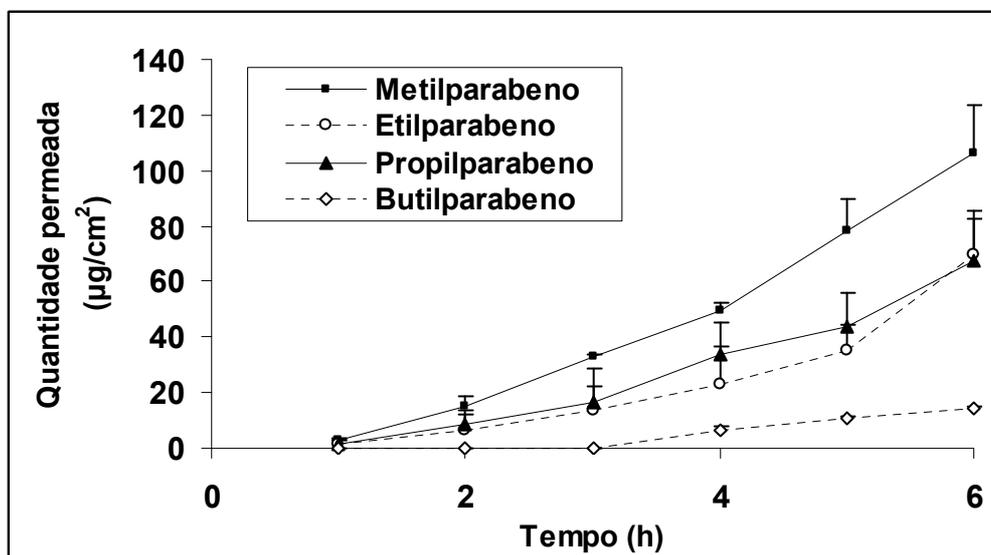


Figura 23: Perfis de permeação do metil, etil, propil e butilparabeno (0,1% p/V), através da pele de orelha suína. Cada ponto representa a média \pm desvio-padrão. Os parabenos foram testados isoladamente, no entanto, foram agrupados para facilitar a análise comparativa (N=4). **Condições experimentais:** o meio de dissolução dos compartimentos doador e receptor foi uma mistura de PBS:etanol (80:20).

Quando a quantidade permeada, nos diferentes intervalos de tempo, foram comparadas, notou-se um aumento das diferenças entre os parabenos com o tempo, particularmente para o MP e BP. O MP mostrou maior permeação com o tempo, seguido do EP e PP. O BP apresentou a mais baixa permeação, principalmente quando se consideram os tempos iniciais. O alto desvio-padrão encontrado para as amostras é justificável, considerando-se a variabilidade intra-espécie, bem como outras variáveis interferentes. Um estudo realizado por Heuber e colaboradores (1998), envolvendo 10 laboratórios, avaliou as causas de variações experimentais nos estudos de permeação de uma mesma substância através da pele de porco e estimou-se que 55% destas variações podem estar associadas com diferenças da pele. Os outros 45% estariam associados com fatores experimentais (32%) e erros humanos (13%).

Os perfis cinéticos de difusão dos parabenos, que relacionam a quantidade permeada dos mesmos em função do tempo, apresentaram tendência à linearização, indicando provável modelo cinético de ordem zero. No entanto, os baixos valores dos coeficientes de correlação ($R^2 < 0,997$) estimularam a busca por outro modelo que pudesse melhor representar este perfil cinético. Os coeficientes de correlação obtidos

com o modelo de Higuchi foram ainda inferiores aos do modelo cinético de ordem zero. Desta forma, considerando-se os erros associados aos parâmetros de permeabilidade, calculados conforme o modelo cinético de ordem zero (em função do baixo valor de coeficiente de correlação), foi necessário buscar outros modelos matemáticos para complementar esta discussão do comportamento de permeação dos parabenos. Neste contexto, o modelo proposto por Moser e colaboradores (2001b) mostrou-se como uma proposta interessante, já que os dados experimentais são ajustados à Lei de Fick e não há exigência de um estado de fluxo constante para a obtenção dos diferentes parâmetros de permeabilidade.

Os parâmetros de permeabilidade, obtidos a partir dos gráficos que relacionam a quantidade permeada dos parabenos em função do tempo (modelo cinético de ordem zero), podem ser visualizados na Tabela 5.

Tabela 5: Resultados obtidos, durante a avaliação da permeabilidade dos parabenos 0,1% (p/V), através da pele de orelha suína, após quantificação por eletroforese capilar (N=4).

Parâmetros avaliados	Metilparabeno	Etilparabeno	Propilparabeno	Butilparabeno
Fluxo (média ± dp) (µg/cm².h)	20,657 ± 4,133 ^(a)	14,288 ± 2,108 ^(b)	7,274 ± 3,205 ^(c)	2,1989 ± 0,0744 ^(c)
Tempo de latência (média ± dp) (h)	1,1675 ± 0,281 ^(a)	1,2673 ± 0,1905 ^(a)	1,3623 ± 0,3883 ^(a)	2,2936 ± 0,2081 ^(b)
Coeficiente de permeabilidade (média ± dp) (cm/h)	0,0206 ± 0,0041 ^(a)	0,0143 ± 0,0021 ^(b)	0,0073 ± 0,0032 ^(c)	0,0022 ± 7,4388x10 ⁻⁵ ^(c)

Utilizou-se os testes ANOVA e SNK; valores de p<0,05 foram considerados estatisticamente significantes. Letras iguais indicam que não há diferenças estatísticas significantes entre as médias. Cada parâmetro de permeabilidade foi analisado separadamente.

Um dos parâmetros de permeabilidade, o tempo de latência, que é definido como o tempo necessário para que a passagem de uma substância, através de uma membrana, atinja o equilíbrio (BARRY, 2002) foi calculado a partir da extrapolação da linha do estado estacionário. Este tempo de latência é dependente da espessura da membrana de permeação e da interação entre a amostra e as diferentes moléculas que constituem esta membrana. Considerando-se que a permeação dos parabenos ocorre através dos lipídeos intercelulares da pele humana (AKOMEAH; MARTIN; BROWN, 2007), quanto maior a interação dos parabenos com estes lipídeos, maior será o tempo de latência e menor a difusão. Quando se observa a Tabela 5, nota-se um pequeno aumento no tempo de latência do metil para o etilparabeno (aproximadamente 8,6%), bem como do EP para o PP (aproximadamente 7,5%). Esta

diferença é ainda maior quando o BP é comparado aos demais parabenos (96,4; 80,9 e 68,4% em relação ao MP, EP e BP, respectivamente). Quando se aplica o teste de separação das médias Student-Newman-Keuls, observa-se diferenças estatisticamente significativas apenas entre o BP e os demais parabenos ($p < 0,05$). No estudo de Pedersen e colaboradores (2007), foi testado o EP (0,08% p/V) isoladamente e foi demonstrada uma rápida permeação do mesmo através da pele de coelho, com tempo de latência nulo. Akomeah e colaboradores (2007) avaliaram a permeação do MP e BP, através da epiderme humana, cujos tempos de latência calculados foram de $17,27 \pm 5,57$ e $26,97 \pm 6,55$ min, respectivamente. Os valores dos tempos de latência obtidos neste trabalho foram superiores aos relatados na literatura. Uma das justificativas para esta diferença poderia ser o modelo de membrana utilizado. Diferentemente do estudo de Akomeah e colaboradores (2007) que utilizou apenas epiderme humana, aqui foi utilizada pele de orelha de porco (incluindo derme e epiderme), assim, as barreiras a serem percorridas pelos parabenos são maiores, explicando o maior tempo de latência encontrado. Além disso, diferentes espécies animais foram utilizadas nestes estudos.

A comparação entre os valores de fluxo dos parabenos (Tabela 5) demonstrou redução destes valores com o aumento da lipofilicidade dos mesmos. Esta mesma análise pode ser efetuada com os coeficientes de permeabilidade, considerando-se que a concentração inicial foi fixa (0,1% p/V), o que facilita comparações entre os parabenos. O MP apresentou maior valor de fluxo, seguido pelo EP, e foram estatisticamente diferentes ($p < 0,05$; SNK). Mesmo que tenha ocorrido uma redução do fluxo do PP para o BP, esta diferença não foi estatisticamente significativa ($p > 0,05$; SNK).

A comparação dos valores obtidos com dados da literatura (NICOLI et al., 2008; AKOMEAH et al., 2007; EL HUSSEIN et al., 2007; PEDERSEN et al., 2007) mostrou que a ordem de permeação foi influenciada pela lipofilicidade, sendo que os mais lipofílicos (BP>PP>EP>MP) atravessaram as barreiras da pele com menor velocidade, apresentando menores valores de fluxo (BP=PP<EP<MP).

Além disto, para fins de comparação com os dados obtidos experimentalmente, optou-se por estudos onde os parabenos foram testados isoladamente e na forma de soluções. Segundo Nicoli e colaboradores (2008), os valores de fluxo do MP, EP, PP e BP foram 110, 48, 33 e 22 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$, respectivamente. Pedersen e colaboradores (2007) encontraram fluxo de $22,4 \pm 4,4$ $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ para o EP. Estes dois estudos foram realizados pelo mesmo grupo de pesquisadores, ambos utilizando soluções saturadas dos parabenos (em água) e pele de orelha de coelho, e detectaram uma diferença (cerca de 2X) entre os valores de fluxo do EP, nas mesmas condições

experimentais. Os valores de fluxo do MP e BP, obtidos nos experimentos deste trabalho, também foram inferiores aos do estudo de Akomeah e colaboradores (2007). Porém, quando os coeficientes de permeabilidade dos mesmos foram comparados (após conversão dos valores), observou pequena diferença para o MP ($P=0,0212$ cm/h – literatura; $P=0,0206$ cm/h – experimental), enquanto que para o BP, esta diferença aumentou ($P=0,01044$ cm/h – literatura; $P=0,0022$ cm/h). Uma das explicações para tal é que, neste trabalho, utilizou-se tanto derme quanto epiderme suína, diferentemente do estudo de Akomeah que apenas utilizou epiderme humana. A derme parece ter tido maior influência sobre a permeação do BP do que do MP. O caráter mais hidrofílico da derme, comparativamente à epiderme, em função do menor conteúdo lipídico, limitaria a passagem de substâncias que apresentam maior caráter lipofílico, no caso, o BP. Com isto, com uma barreira adicional, seu coeficiente de permeabilidade foi menor, explicando as diferenças encontradas.

Considerando-se as limitações citadas anteriormente, relativas aos erros associados com os parâmetros de permeabilidade, devido aos baixos coeficientes de correlação, quando a quantidade permeada é relacionada com o tempo ou com a raiz quadrada do mesmo, o modelo proposto por Moser e colaboradores (2001b) foi utilizado como complemento desta discussão. Neste modelo, não há exigência de um estado de fluxo constante e os princípios da Lei de Fick são facilmente ajustáveis. Com esta equação, foi possível calcular os parâmetros KH e D/H^2 (Tabela 6), que indicam as características de particionamento da molécula e os parâmetros de difusão através da pele, respectivamente.

Tabela 6: Parâmetros da permeação dos parabenos através da pele de orelha de porco (obtidos com a equação mostrada no item 4.3.2) (N=4).

	KH (cm)	D/H^2 (cm ⁻¹)	P (cm/h)
MP	0,20724 ± 0,09688	0,11116 ± 0,03222	0,02148 ± 0,00409
EP	0,35001 ± 0,08974	0,05874 ± 0,01805	0,01975 ± 0,00105
PP	0,15598 ± 0,06107	0,07273 ± 0,03797	0,01019 ± 0,00148
BP	0,06632 ± 0,07247	0,04513 ± 0,00053	0,00313 ± 0,00016

Valores médios ± desvio-padrão; KH = características de particionamento das moléculas; D/H^2 = parâmetro de difusão; P = coeficiente de permeabilidade calculado.

Com relação às características de particionamento (KH), o MP e o PP apresentaram comportamento similar ao encontrado nos estudos de Nicoli e colaboradores (2008). O menor valor de KH para o BP, comparativamente aos demais parabenos, não era esperado. Acredita-se que o maior tempo de latência (cerca de 2,3h), o tempo total do experimento (6h) e o menor coeficiente de permeabilidade poderiam explicar esta discrepância. Através de projeções estatísticas das quantidades permeadas (dados não mostrados), em intervalos de tempo maior do que 6h, notou-se o aumento dos coeficientes de partição e de permeabilidade do BP, sugerindo que, em experimentos futuros, sejam utilizados promotores mais eficientes (ou em maiores proporções), objetivando reduzir o tempo de latência e, ainda, que se aumente a duração do experimento.

Quanto ao parâmetro difusional (D/H^2), o BP apresentou menor difusão através da pele de orelha de porco, e o MP a maior difusão (cerca de 1,53X mais que o PP e 1,89X que o EP). Esta difusão, através da pele, depende tanto da interação dos parabenos com os lipídeos intercelulares (considerando-se o transporte intercelular dos mesmos), bem como do tamanho da molécula. De forma geral, quanto maior a lipofilicidade dos parabenos, maior a interação com os lipídeos intercelulares e menor a difusão, com exceção do EP, que teve menor difusão em relação ao PP.

A análise dos coeficientes de permeabilidade, obtidos mediante multiplicação destes dois parâmetros ($KH \times D/H^2$), demonstrou que os parabenos mais lipofílicos permeiam menos através da pele de orelha de porco. O tratamento estatístico dos dados (ANOVA; SNK, $p=0,05$) revelou a seguinte ordem de permeação: $MP=EP>PP>BP$. No estudo de Nicoli e colaboradores (2008), os coeficientes de permeabilidade calculados não diferiram estatisticamente entre o MP, EP e PP. Neste mesmo estudo, o BP apresentou maior coeficiente de permeabilidade, em função do maior parâmetro de particionamento, contrariamente aos nossos achados. A provável causa deste menor coeficiente de permeabilidade já foi exposta anteriormente: menor parâmetro de particionamento em relação aos demais parabenos; diferenças na membrana utilizada e maior tempo de latência. O coeficiente de permeabilidade médio do MP, obtido com o modelo de Moser ($P=0,0215$ cm/h), foi semelhante ao encontrado nos estudos de Akomeah e colaboradores (2007) ($P=0,0212$ cm/h), após transformação das unidades de medida. Para o EP, o coeficiente de permeabilidade experimental médio ($P=0,0198$ cm/h) foi menor que o encontrado nos estudos de Pedersen e colaboradores (2007) ($P=0,028$ cm/h). Esta diferença poderia ser atribuída às diferentes membranas utilizadas (pele de orelha de coelho *versus* pele de orelha suína).

Ao final dos experimentos de permeação dos parabenos, analisou-se as quantidades finais dos parabenos retidas na epiderme e na derme, bem como as diferenças de retenção entre estas camadas, para cada parabeno, mediante tratamento estatístico (ANOVA; SNK) (Figura 24). Para MP e PP, observou-se maior acúmulo de parabenos na epiderme, comparativamente à derme. Para PP e BP, foram observadas retenções semelhantes nestas duas camadas ($p > 0,05$; SNK). As diferenças de lipofilicidade dos parabenos, bem como da composição lipídica destas duas camadas de pele, poderiam explicar estas diferenças. A epiderme é constituída por uma rica camada lipídica, o estrato córneo, com a qual os parabenos apresentam alta afinidade, justificando a maior quantidade de parabenos nesta camada.

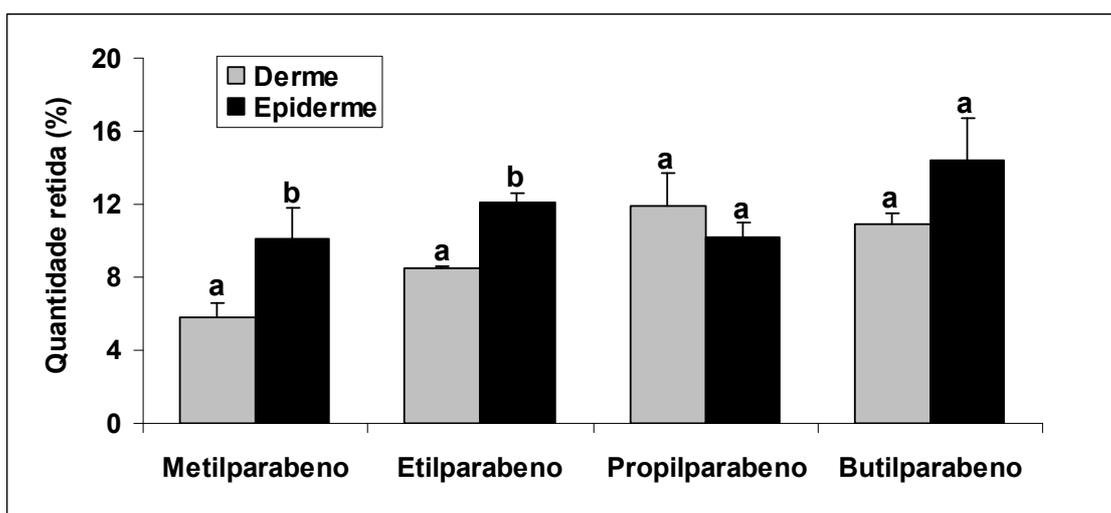


Figura 24: Avaliação da quantidade percentual de metil, etil, propil e butilparabeno retida (por grama de tecido) na derme (barra cinza) e epiderme (barra preta) da pele de orelha suína (N=4).

Informações sobre as quantidades dos parabenos presentes nos compartimentos doador e receptor, e as retidas na derme e epiderme, permitiram o cálculo do balanço da massa final (Figura 25). Com isto, foi possível estimar as perdas dos parabenos (degradação enzimática, adesão às paredes das células de Franz, entre outros fatores), bem como seus teores de recuperação. A quantidade final total recuperada, para cada parabeno, foi utilizada para a normalização dos dados, diferentemente de Pedersen e colaboradores (2007), cuja normalização dos dados considerou a quantidade inicial de parabeno adicionada no compartimento doador. Esta diferença no tratamento dos dados explica a ordem de retenção contrária encontrada quando da comparação dos resultados aqui obtidos com os deles. Quando os dados aqui obtidos foram normalizados com relação à concentração inicial dos parabenos, a ordem de retenção foi similar ao encontrado por estes mesmos autores

(MP<EP=PP). Em função das altas porcentagens de perdas para o PP e o BP, optou-se pela estratégia de normalização que considerou apenas a quantidade recuperada.

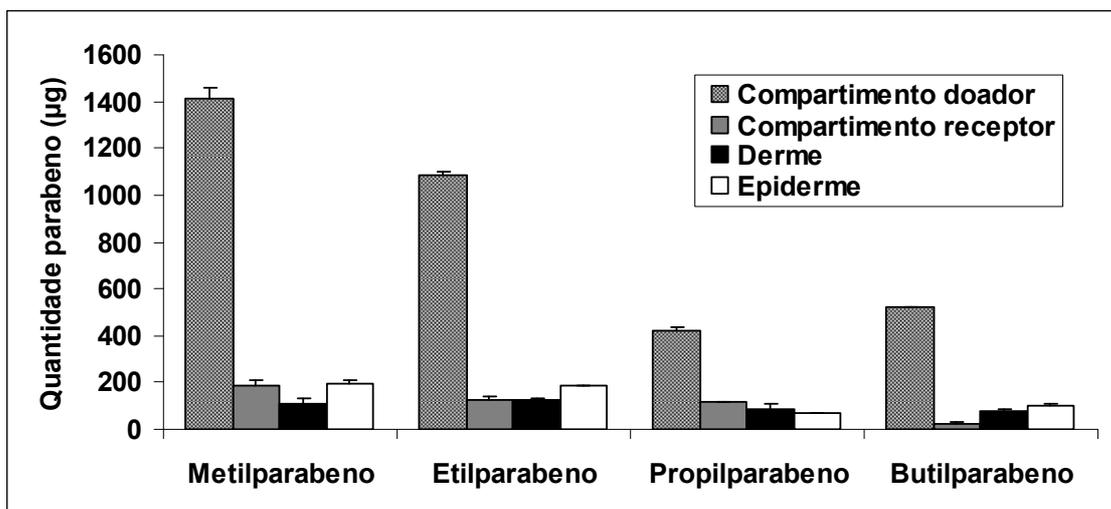


Figura 25: Balanço da massa final (valores médios \pm desvio-padrão). A quantidade total inicial dos parabenos adicionados no compartimento doador foi de 2000 μg (1mg/mL).

O balanço da massa final revelou maiores quantidades de parabenos no compartimento doador, particularmente para MP e EP. O cálculo das quantidades percentuais dos parabenos na solução doadora, ao final do experimento, após normalização dos dados com base nas quantidades totais recuperadas, demonstrou uma variação entre 60,5 e 74,3% e, na solução receptora, de 3,5 a 17,3%. Com relação às quantidades retidas na derme e epiderme da pele de orelha suína, os intervalos percentuais foram, respectivamente, de 5,8 a 11,9% e 10 a 14,4%.

Baseado na comparação da quantidade total de parabeno recuperada e da quantidade total inicial adicionada (2000 μg) foi possível estimar as perdas. O MP foi o que apresentou melhor recuperação (95,28%), seguido por EP (75,98%), BP (36,62%) e PP (34,53%), respectivamente.

Considerando os altos percentuais de perdas, particularmente para PP e BP, iniciou-se uma investigação teórica das prováveis causas deste fato. Cabe lembrar que é esperado uma certa perda de parabenos, que aderem nas paredes dos compartimentos, além de uma difusão não desejada dos mesmos por secções de tecidos não correspondentes à área de permeação (excesso de membrana disposta lateralmente).

Outra explicação para esta baixa recuperação poderia ser a ocorrência de atividade metabólica na pele. Além das propriedades de barreira, é conhecida a capacidade da pele viável de metabolizar xenobióticos. De forma geral, o metabolismo na pele inclui reações de fase I (oxidativas, redutoras ou hidrolíticas) e reações de

biotransformação de fase II (conjugação) (BOEHNLEIN et al., 1994). A baixa temperatura de armazenamento (-80°C) das orelhas também poderia contribuir para a manutenção das enzimas responsáveis por este metabolismo.

A pele apresenta elevados níveis de esterases que têm importantes funções farmacológicas, tais como a ativação de pró-fármacos com grupamentos ésteres aplicados topicamente (JEWELL et al., 2007a). De forma análoga aos pró-fármacos, os derivados do *p*-hidroxibenzóico (como os parabenos) são hidrolisados pelas carboxilesterases, presentes tanto em frações citosólicas quanto microssomais dos componentes da pele. Existem duas isoformas principais desta enzima, a carboxilesterase 1 (CE1) e a carboxilesterase 2 (CE2), que exibem seletividade diferenciada aos substratos (JEWELL et al., 2007b). A CE1 demonstra preferência por substratos que apresentam grupamento álcool de pequeno tamanho ou um grande grupo acil (ZHANG et al., 1999), enquanto que a CE2, hidrolisa substratos lipofílicos com grupamento álcool de maior tamanho ou um pequeno grupamento acil (SATO; HOSOKAWA, 2006). Assim sendo, o MP e o EP são hidrolisados preferencialmente pela CE1 enquanto que, o PP e o BP, pela CE2 (JEWELL et al., 2007b).

Além disto, estas isoformas também apresentam diferentes níveis de expressão, que podem facilitar a compreensão das diferenças de perdas encontradas neste trabalho. Com relação aos níveis de expressão destas isoformas, Jewell e colaboradores (2007b) observaram que a pele apresenta maior proporção da CE2 do que da CE1, comparativamente ao fígado. Assim, neste trabalho, acredita-se que a maior ocorrência da CE2 na pele, em relação ao fígado, poderia contribuir para maior metabolização do PP e BP (em relação ao MP e EP). Adicionalmente, estes mesmos autores também demonstraram que os parabenos são similarmente absorvidos através da pele humana e de porcos (*minipigs*), apesar da pele suína ter apresentado maior capacidade de hidrolisar os ésteres, particularmente os mais lipofílicos (BP>PP>EP>MP) do que a pele humana. Inclusive, na pele suína foi detectada a presença do ácido 4-hidroxibenzóico (precursor dos parabenos), diferentemente do que ocorreu na pele humana.

Outra propriedade interessante da CE1 relaciona-se com sua capacidade de transesterificação na presença de álcool de baixo peso molecular (SUN et al., 2004). Este mecanismo foi melhor explicado por Oh e colaboradores (2002) (Figura 26). Na ausência de etanol, a quantidade de MP e de ácido *p*-hidroxibenzóico aumentava linearmente com o tempo. Em diferentes concentrações de etanol, no compartimento doador, observou-se que a atividade termodinâmica do MP diminuiu com o aumento da concentração de etanol, reduzindo a partição do MP na pele e o fluxo aparente. Foi observado um fluxo máximo de EP (produto desta transesterificação), quando a

concentração de etanol foi de 20%. Assim, estes resultados sugerem que moléculas contendo grupamentos ésteres podem ser convertidas em outras formas esterificadas quando etanol é utilizado como veículo.

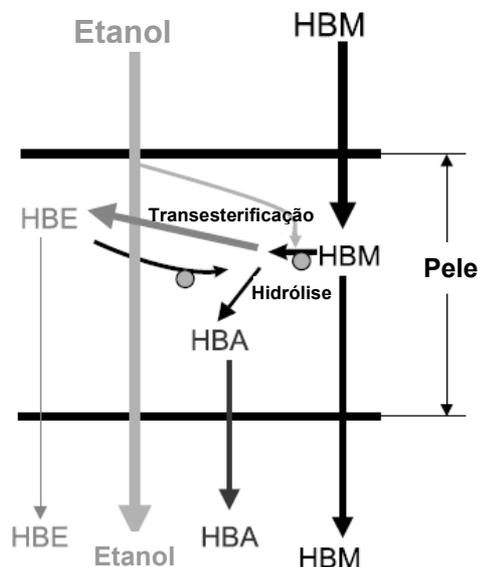
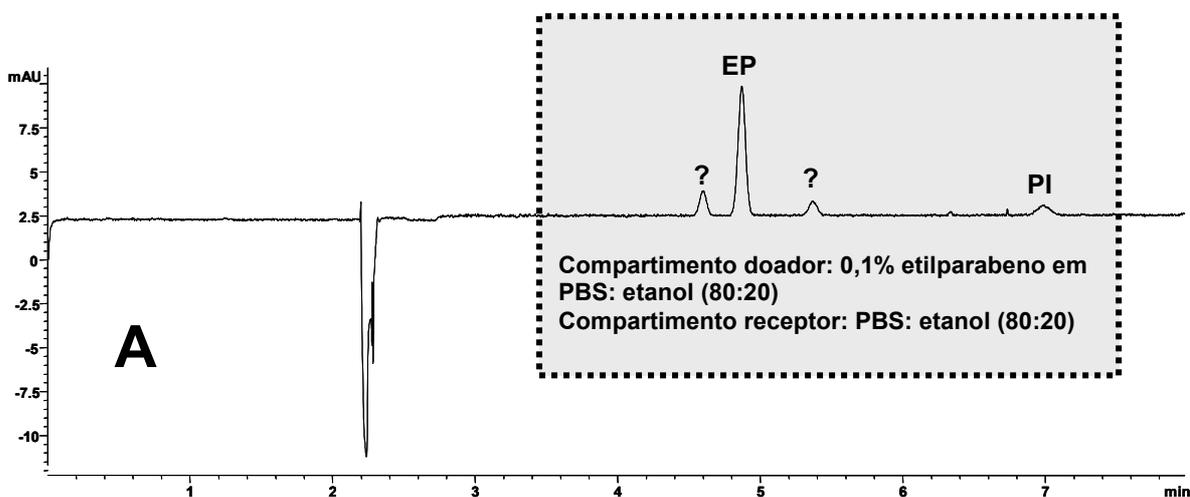


Figura 26: Diagrama esquemático do provável mecanismo de formação do ácido *p*-hidroxibenzóico e do etilparabeno a partir do metilparabeno, em estudos com pele de porcos (*minipigs Yucatan*), em presença de etanol.
 Fonte: Oh et al. (2001).
 HBM = metilparabeno
 HBE = etilparabeno
 HBA = ácido *p*-hidroxibenzóico

Evidências de metabolização dos parabenos pelas esterases da pele, nos estudos de permeação *ex vivo*, podem ser visualizadas quando se consideram alguns resultados analíticos obtidos (Figura 27). Inicialmente, acreditava-se que estes picos inespecíficos “não esperados” seriam resultantes da contaminação cruzada entre as amostras ou, até mesmo, da contaminação das soluções padrões. No entanto, a presença de tais picos era recorrente e, assim foi sugerido que eles seriam provavelmente frutos da metabolização dos parabenos por enzimas da pele viável, fato já relatado em outros estudos da área (já citados anteriormente).



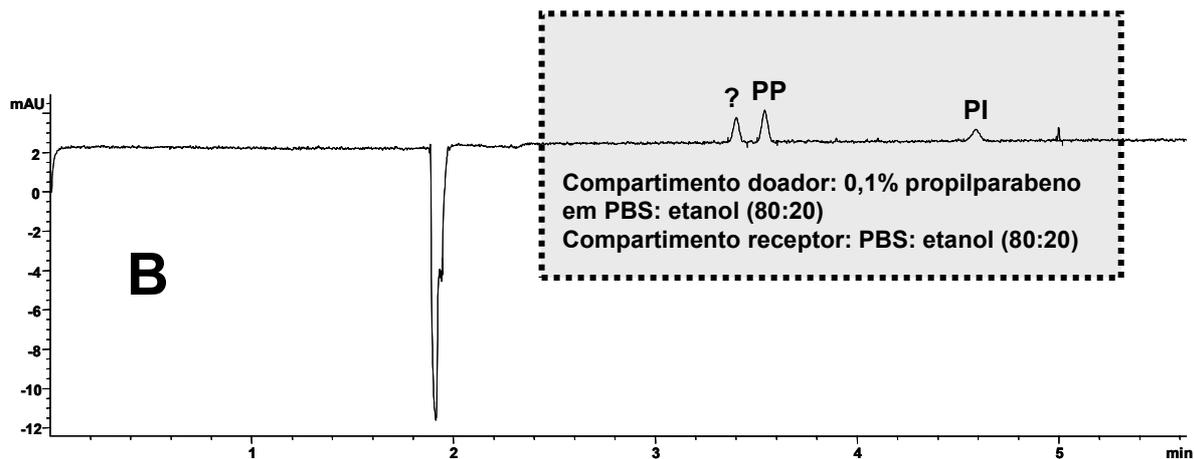


Figura 27: Eletroferogramas referentes às quantidades de etil - EP (A) e propilparabeno - PP (B) permeada, após 6 h, através da orelha de porco, onde se notam traços resultantes de provável metabolização dos parabenos. PI = padrão interno.

Não foram detectados picos inespecíficos nas soluções doadoras, não significando, necessariamente, que as camadas superficiais da pele não apresentam atividade enzimática. As diluições efetuadas com as soluções doadoras, para que os resultados obtidos estivessem dentro do limite quantificável (correspondente a curva de calibração), poderiam ter causado redução dos picos de metabólitos que pudessem eventualmente existir soluções doadoras.

Os baixos valores dos coeficientes de correlação obtidos ($R^2 < 0,99$); particularmente para os parabenos mais lipofílicos, bem como os valores de fluxo encontrados inferiores aos relatados na literatura, em alguns casos, também sugerem a ocorrência de metabolização ou transesterificação destes parabenos. Com a degradação enzimática ou interconversão em outros produtos, a difusão da amostra também é reduzida e o tempo de latência aumenta. Outros metabólitos dos parabenos podem não ser visualizados nestas condições analíticas, em função das diferenças de mobilidade eletroforética.

Resumindo, observou-se que a ordem de permeação dos parabenos (BP=PP<EP<MP), através da pele de orelha de porco, foi contrária a ordem de lipofilicidade dos mesmos (BP>PP>EP>MP), notando-se maior retenção dos parabenos na epiderme do que na derme, em função das diferenças no conteúdo lipídico destas camadas. A aplicação do modelo de Moser et al. (2001b), que relaciona os parâmetros de particionamento e de difusão, gerou coeficientes de permeabilidade similares aos obtidos com o método tradicional (relação entre o fluxo e a concentração inicial), quando os parabenos mais lipofílicos apresentaram menores coeficientes de permeabilidade. As altas perdas, evidenciadas pelo balanço da massa final, aliadas à

presença de picos inespecíficos nos eletroferogramas, bem como a obtenção de baixos coeficientes de correlação na análise dos perfis cinéticos de difusão dos parabenos sugeriram a hipótese de metabolização dos mesmos, por enzimas das camadas viáveis da pele.

5.2.2 PERMEAÇÃO CUTÂNEA DE DIFERENTES COMBINAÇÕES DOS PARABENOS

Tendo em vista que os parabenos podem ser associados para potencializar seu efeito antimicrobiano, particularmente o MP e o PP, o estudo do efeito da interação dos mesmos na permeação, através da pele, tem grande importância. Diversas propostas de planejamentos experimentais podem ser utilizadas com este propósito, nos quais os processos são representados por modelos matemáticos e, com a construção de superfícies de resposta, as análises dos efeitos se tornam mais consistentes.

Dentre as várias propostas de planejamento, optou-se pelo delineamento fatorial, considerando sua utilização em estudos de avaliação dos efeitos da interação dos fatores sobre determinada(s) resposta(s) (OLIVIER et al., 2007). O planejamento prévio incluiu a escolha das variáveis (fatores) e das diferentes faixas de estudo (níveis – neste caso, diferentes concentrações dos parabenos) identificados como mínimo, central e máximo, e codificados como -1, 0 e +1, respectivamente. O conjunto das combinações possíveis entre os níveis de diferentes fatores é chamado de matriz de planejamento. Entende-se por efeito de um fator a variação da resposta produzida por mudanças de nível do fator, e ele pode ser aditivo ou com interação (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2003). Para melhor compreensão destas modalidades de efeitos, é aconselhável a leitura do apêndice D, para que a discussão abaixo seja mais clara.

Existem diversos tipos de planejamento fatorial e a seleção do mais adequado foi realizada com base no objetivo do estudo e no número de ensaios envolvidos, para se conseguir extrair o máximo de informações com a realização de um mínimo de experimentos.

Desta forma, os experimentos foram realizados de acordo com quatro planejamentos fatoriais, onde cada um deles apresentou três fatores e dois níveis (delineamento fatorial 2^3), com triplicata no ponto central. Manteve-se constante o nível (concentração) de um dos parabenos e os outros foram variados, por exemplo, para o fatorial 1, manteve-se constante a concentração do MP (1000 µg/mL) enquanto que,

as concentrações dos demais parabenos (EP, PP e BP) variaram de acordo com o planejamento experimental. O mesmo raciocínio é válido para os fatoriais 2, 3 e 4, respectivamente. Portanto, as respostas de permeação cutânea obtidas para os fatoriais 1, 2, 3 e 4 foram em relação ao MP, EP, PP e BP, respectivamente. Os experimentos realizados no ponto central foram utilizados para calcular o erro experimental, parâmetro necessário para verificar a significância dos parâmetros em análise (valores de fluxos) e das interações. Quanto maior o número de repetições deste ponto central, maior será a confiabilidade do erro experimental estimado.

As variáveis instrumentais [voltagem, injeção, comprimento de onda de detecção, temperatura do cartucho e dimensões do capilar (comprimento e diâmetro)] foram mantidas constantes durante os experimentos para reduzir o número de interferentes no erro experimental.

A realização dos experimentos foi aleatória para evitar a distorção estatística dos resultados, isto é, impedir que erros atípicos sejam obrigatoriamente associados a determinadas combinações de níveis.

Após a realização dos experimentos e obtenção dos dados, foram utilizadas técnicas de regressão múltipla para a obtenção dos parâmetros de regressão do modelo (Betas) com o intuito de avaliar a influência de variações multivariada nos níveis dos fatores sobre as respostas (valores dos fluxos de permeação), bem como a ocorrência ou não de interação entre eles (sinergismo ou antagonismo), o que possibilita identificar quais fatores realmente influenciaram as respostas medidas para um determinado intervalo de significância.

Preliminarmente, o erro experimental foi obtido a partir das três repetições do ponto central, com avaliação simultânea da permeação dos quatro parabenos, em níveis intermediários de concentração (500 µg/mL). Os resultados (dados não mostrados) demonstraram que a sensibilidade (neste caso, vista como a capacidade de detectar diferenças) não foi suficiente para apontar quais fatores eram significativos, sendo coerentes do ponto de vista estatístico, mas sem grande importância para os estudos de permeação. Esta variação pode ser atribuída a diferenças na preparação das membranas, variações intra-espécie, realização destas repetições em dias diferentes, com soluções diferentes, entre outras causas. Desta forma, procedeu-se uma análise qualitativa das respostas obtidas, tanto quando os parabenos foram testados isoladamente, quanto combinações dos mesmos.

Quando um dos parabenos foi mantido no nível alto (1000 µg/mL) e os demais em nível baixo (0 µg/mL), a permeação através da pele de orelha de porco foi de 27,2; 26,7; 21,2 e 12,3 para o MP, EP, PP e BP, respectivamente. Cabe lembrar que nestes

experimentos utilizou-se 50% de etanol, diferentemente dos anteriores que utilizaram 20%.

Combinações binárias do PP com os demais parabenos demonstraram reduções, em cerca de 2X, das respostas (fluxos de permeação), com exceção da combinação EP e PP, na qual esta redução foi maior ($J_{EP}=3,2$; 8,3X para o EP e $J_{PP}=4,1$; 5,2X para o PP), comparativamente aos testes com os parabenos isolados.

De forma geral, a associação de três parabenos provoca diminuição, em cerca de 2X, dos fluxos de permeação dos parabenos através da pele, exceto para a combinação MP, PP e BP, em que o BP mostrou taxa de permeação cerca de 2X maior em relação à condição isolada, evidenciando-se um efeito sinérgico favorável ao aumento da sua permeação, nestas condições.

Em nível elevado para os quatro parabenos (1000 $\mu\text{g/mL}$), simultaneamente, obtiveram-se baixos valores de fluxos de permeação, em comparação as condições isoladas, o que sugere a ocorrência de certo antagonismo entre os mesmos.

Resumindo, do ponto de vista da redução da permeação através da pele de orelha de porco, o experimento com altos níveis de EP e PP e baixos níveis de MP e BP (-1,1,1,-1) foi o mais efetivo, considerando-se as baixas respostas obtidas em relação aos fluxos de permeação e ao total permeado (última coleta). Contrariamente, o experimento com níveis altos de MP, PP e BP e baixo nível de EP (1,-1,1,1), os parabenos demonstraram altas taxas de permeação. Assim, com base nestes resultados, sugere-se priorizar combinações de parabenos que demonstraram baixos fluxos de permeação, até a confirmação de aspectos de segurança dos mesmos.

A estratégia adotada para contornar o problema do grande erro experimental das repetições do ponto central, mencionado anteriormente, foi à normalização das quantidades permeadas dos parabenos em função da quantidade permeada final (tempo de 7,5 h), em cada situação particular, com a obtenção de novos valores de respostas (fluxos de permeação), inclusive para de fluxo para a triplicata do ponto central. A Tabela 7 ilustra a matriz de planejamento para um fatorial 2^3 (2 níveis e três fatores/variáveis) e as respostas dos fluxos obtidas para cada fatorial isoladamente.

Tabela 7: Delineamento fatorial 2³ e respostas obtidas [valores de fluxo=J ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)] nos estudos de permeação do MP, EP, PP e BP, através da pele de orelha suína.

Fatores	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
A	-1	1	-1	1	-1	1	-1	1	0	0	0
B	-1	-1	1	1	-1	-1	1	1	0	0	0
C	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1	0	0	0
Repostas											
Fatorial 1 (R_{MP})	19,2	16,3	19,1	18,9	17,7	18,8	16,5	21,0	19,9	18,9	18,0
Fatorial 2 (R_{EP})	15,2	15,4	11,0	17,0	14,7	16,3	16,2	18,3	16,5	16,8	15,3
Fatorial 3 (R_{PP})	15,1	18,1	12,2	18,0	16,1	17,1	16,3	18,3	16,6	16,8	15,1
Fatorial 4 (R_{BP})	16,0	16,2	15,0	16,3	16,9	17,1	16,9	18,7	15,9	17,0	15,6

- Fatorial 1: A (EP), B(PP) e C(BP); Fatorial 2: A(MP), B(PP) e C(BP); Fatorial 3: A(MP), B(EP) e C(BP); Fatorial 4: A(MP), B(EP) e C(PP). Cada delineamento fatorial foi considerando isoladamente para a análise dos efeitos.

- Níveis ($\mu\text{g}/\text{mL}$): (-) 0,000; (0) 500,0; (+) 1.000;

- R_{MP} , R_{EP} , R_{PP} and R_{BP} representam as repostas pós-normalização (coeficientes angulares-fluxos).

A análise qualitativa da Tabela 7 demonstra que o fluxo de permeação pode aumentar ou diminuir de acordo com a combinação dos parabenos, conforme descrito abaixo:

A) Fatorial do metilparabeno (concentração fixa em 1.000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para o MP, com variação dos níveis dos demais parabenos)

- Em nível elevado de PP e BP, e variando-se o nível de EP de -1 (0) para +1 (1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$), observou-se um aumento dos fluxos de permeação, enquanto que, para nível baixo de PP e BP, e variando-se o nível de EP de -1 para +1, notou-se um decréscimo da permeação.

- Mantendo-se nível reduzido de EP e BP, e com elevação do nível de PP, não se observou variação da taxa de permeação. Contrariamente, mantendo-se nível elevado de EP e BP, com variação do nível de PP, um aumento dos fluxos de permeação foi observado.

- Em nível reduzido de EP e PP, com variação do nível de BP, notou-se um decréscimo da taxa de permeação. Por outro lado, nível elevado de EP e PP, com variação do nível de BP, proporcionaram aumento dos fluxos de permeação.

B) Fatorial do etilparabeno (concentração fixa em 1.000 µg/mL para o EP, com variação dos níveis dos demais parabenos)

- Em nível baixo de PP e BP, com variação do nível de MP, não se observou variação da taxa de permeação. Contrariamente, nível elevado de PP e BP, com variação do nível de MP, resultaram em aumento dos fluxos de permeação.

- Mantendo-se nível reduzido de MP e BP, com variação do nível de PP, notou-se diminuição do fluxo de permeação. Por outro lado, em nível elevado de MP e BP, com variação do nível de PP, observou-se aumento das taxas de permeação.

- Nível baixo de MP e PP e variação do nível de BP, resultaram em diminuição na taxa de permeação. Contrariamente, mantendo-se nível alto de MP e PP e variação do nível de BP promoveram aumento do fluxo de permeação.

C) Fatorial do propilparabeno (concentração fixa em 1.000 µg/mL para o PP, com variação dos níveis dos demais parabenos)

- Mantendo-se, simultaneamente, o nível elevado ou reduzido de EP e de BP com variação do nível de MP, observou-se aumento da taxa de permeação.

- Em nível baixo de MP e BP, com variação do nível de EP, notou-se diminuição da taxa de permeação. Inversamente, em nível elevado de MP e BP, com variação do nível de EP, um aumento dos fluxos de permeação foi registrado.

- Em nível reduzido de MP e EP, e variação do nível de BP, resultaram em aumento do fluxo de permeação. Por outro lado, em nível elevado de MP e EP, com variação do nível de BP, não se observou variação significativa da taxa de permeação.

D) Fatorial do butilparabeno (concentração fixa em 1.000 µg/mL para o BP, com variação dos níveis dos demais parabenos)

- Em nível reduzido de EP e PP, com variação do nível de MP, não se observou variação significativa na taxa de permeação. Inversamente, níveis altos de EP e PP, com variação do nível de MP, resultaram em aumento do fluxo de permeação.

- Mantendo-se o nível baixo de MP e de PP, com variação do nível de EP, notou-se diminuição do fluxo de permeação. Contrariamente, nível elevado de MP e PP, com variação do nível de EP, demonstraram aumento da taxa de permeação.

- Mantendo-se, simultaneamente, o nível baixo ou alto de MP e de EP, com variação do nível de PP, observou-se aumento do fluxo de permeação.

Quando estes dados normalizados foram submetidos a tratamento estatístico, (Tabela 8), observou-se que o MP foi o único fator que apresentou efeito positivo significativo na permeação, através da pele de orelha suína (fatoriais 2 e 3). Para os fatoriais 1 e 4, nenhum dos efeitos foi considerado significativo para o nível de significância selecionado (95%).

Tabela 8: Tratamento estatístico dos resultados do delineamento fatorial 2³ para estudos de permeação do MP, EP, PP e BP, através da pele de orelha suína.

Fatorial 1	^a Efeito _{MP}	Fatorial 2	^b Efeito _{EP}	Fatorial 3	^c Efeito _{PP}	Fatorial 4	^d Efeito _{BP}
Média	18.58	Média	15.70	Média	16.34	Média	16.50
EP	0.66	MP	2.49*	MP	2.95*	MP	0.86
PP	0.89	PP	0.25	EP	-0.38	EP	0.22
BP	0.14	BP	1.72	BP	1.13	PP	1.52
EP*PP	1.52	MP*PP	1.57	MP*EP	0.96	MP*EP	0.68
EP*BP	2.14	MP*BP	-0.64	MP*BP	-1.46	MP*PP	0.15
PP*BP	-0.36	PP*BP	1.53	EP*BP	1.08	EP*PP	0.64
EP*PP* BP	0.19	MP*PP* BP	-1.30	MP*EP* BP	-0.46	MP*EP* PP	0.13

*Efeitos significativos para α de 0,05%.

^{a,b,c,d}valores de efeitos maiores que 2,91; 2,39; 2,88; 2,13 são considerados significativos para as colunas efeito_{MP}, efeito_{EP}, efeito_{PP} e efeito_{BP}, respectivamente.

Na revisão bibliográfica, foi comentado que a redução da permeação dos parabenos na pele inclui diferentes estratégias, entre elas, a adição de retardadores de permeação que, em geral, desconsidera a associação dos parabenos entre si e destes com outros adjuvantes da formulação, durante a realização dos experimentos *ex vivo*. Assim, deveriam ser realizados experimentos, não apenas com a combinação binária parabeno e retardador de permeação, geralmente soluções dos mesmos, mas também incluindo a avaliação da permeação do produto final. Isto evitaria que, após a formulação de um produto cosmético, o efeito retardador seja perdido através de interações indesejadas ou pela presença de componentes da formulação que demonstrem potencial reforçador de permeação.

Os resultados mais interessantes, após a normalização dos dados, foram os das combinações MP e EP, e para MP e PP, tendo em vista os efeitos

estatisticamente significativos ($p < 0,05$) e a redução das taxas de permeação dos parabenos através da pele de orelha de porco, nestas condições. Coincidentemente, análises recentes confirmaram a presença de MP e PP na maioria dos produtos cosméticos (SHEN et al., 2007). Nestes casos, em que a interação entre os parabenos resulta na queda dos fluxos de permeação dos mesmos, a adição de retardadores de permeação poderia tornar a redução deste parâmetro de permeação ainda mais significativa, tornando os produtos cosméticos mais seguros, considerando que grande parte dos efeitos adversos estudados, até o momento, exigem uma absorção sistêmica dos mesmos.

6 CONCLUSÕES

- Na avaliação histológica, observaram-se pequenas alterações morfológicas no tecido congelado, em função das condições de armazenagem, tais como formações de vacúolos e descamação das camadas mais superficiais.
- As mucosas esofágicas podem substituir as bucais nos estudos de permeabilidade *ex vivo* da CBZ tendo em vista que os parâmetros de permeabilidade calculados, a partir das cinéticas de permeação, foram estatisticamente semelhantes.
- Mesmo que o congelamento não tenha alterado os parâmetros de permeabilidade para a CBZ, observou-se maior retenção deste fármaco em tecidos congelados. Desta forma, experimentos de avaliação da retenção da CBZ devem ser conduzidos com tecidos frescos.
- A espectrofotometria na região do UV pode ser utilizada nos estudos de permeabilidade *ex vivo* da CBZ, considerando a semelhança estatística dos dados obtidos, particularmente os parâmetros de permeabilidade e retenção, em relação à CLAE.
- As mucosas esofágicas não podem substituir as mucosas bucais nos estudos de permeabilidade *ex vivo* do AT, tendo em vista que os parâmetros de permeabilidade obtidos foram estatisticamente diferentes.
- Embora o congelamento provocasse pequenos danos teciduais, ele não afetou as propriedades de barreira das mucosas, no caso do AT, nas condições experimentais testadas, tornando possível a substituição dos tecidos congelados pelos frescos em estudos de permeabilidade *ex vivo* da mesma.
- Dentre as diferentes estratégias de promoção da permeabilidade do AT, o etanol foi o mais efetivo.
- A ordem de permeação dos parabenos (BP=PP<EP<MP), através da pele de orelha de porco, foi contrária a ordem de lipofilicidade dos mesmos (BP>PP>EP>MP), notando-se maior retenção dos parabenos na epiderme do que na derme, em função das diferenças no conteúdo lipídico destas camadas.
- A aplicação do modelo de Moser e colaboradores (2001b) resultou em coeficientes de permeabilidade similares aos obtidos com o método tradicional (relação entre o fluxo e a concentração inicial) em que os parabenos mais lipofílicos apresentaram menores coeficientes de permeabilidade.
- As altas perdas experimentais dos parabenos, evidenciada no balanço da massa final, à presença de picos inespecíficos nos eletroferogramas, bem como obtenção de baixos coeficientes de correlação na análise dos perfis cinéticos de difusão dos parabenos sugeriram a hipótese de metabolização dos mesmos, por enzimas das

camadas viáveis da pele em que o etanol funcionaria como catalisador destas reações, nas concentrações utilizadas.

- Na análise fatorial, efeitos estatisticamente significantes foram observados apenas para as combinações MP e EP, bem como para MP e PP, com redução nos fluxos de permeação. Desta forma, estas associações seriam recomendadas até a definição de protocolos de segurança mais confiáveis, tendo em vista que efeitos nocivos destes adjuvantes seriam observados quando das suas absorções sistêmicas, conforme estudos da literatura.

REFERÊNCIAS

ADDY, M. The oral mucosal absorption and tissue distribution of triamcinolone acetonide in the dog studied by autoradiography. **Arch. Oral Biol.**, v. 25, p. 809–817, 1980.

AFTACH: triamcinolone acetonide. Portugal: Angelini, 2003. Bula de medicamento. Disponível em: <http://www.angelini.it/public/schedepharma/aftach.htm>. Acesso em: 15 jun 2007.

AKOMEAH, F.; NAZIR, T.; MARTIN, G.P.; BROWN, M.B. Effect of heat on the percutaneous absorption and skin retention of three model penetrants. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v.21, p. 337-45, 2004.

AKOMEAH, F.K.; MARTIN, G.P.; BROWN, M.B. Variability in human skin permeability in vitro: comparing penetrants with different physicochemical properties. **J. Pharm. Sci.**, v.96, p.824-34, 2007.

ALLEN, L. V. Jr.; POPOVICH, N. G.; ANSEL, H. C. **Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos**. 8. ed. São Paulo: Artmed, 2007, p. 775.

ALTRIA, K.D. Overview of capillary electrophoresis and capillary electrochromatography. **J. Chromatogr. A**, v. 856, p. 443-63, 1999.

ALUR, H.H.; JOHNSTON, T.P.; MITRA, A.K. Encyclopedia of pharmaceutical technology. In: SUPERBRICK, J.; BOYLAN, J.C. (eds.). **Peptides and Proteins: Buccal Absorption**. New York: Marcel Dekker Inc., 2001, p. 193–218.

AMIDON, G.L.; LENNERNAS, H.; SAH, V.P., CRISON, J.R. A theoretical basic for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. **Pharm. Res.**, v. 12, p.413-420, 1995.

ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; ALLEN, L. V. **Farmacotécnica: Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos**. 6 ed., São Paulo: Editorial Premier, 2000, p. 398-400.

ANVISA. Proíbe o uso do formol e determina a adequação dos produtos químicos nos salões de beleza do estado do Rio de Janeiro e dá outras providências. Resolução n.79, de 28 de agosto de 2000. **Lex: Assembléia Legislativa**, Rio de Janeiro, 1 Trim. de 2008. Legislação Federal.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. **Planejamento e otimização de experimentos**. 2 ed. Campinas: Unicamp, 2003.

BARRY, B. Transdermal drug delivery. In: AULTON, M.E. (ed.) **Pharmaceutics: The science of dosage form design**. 2. ed. New York: Churchill Livingstone, 2002, p. 499-533.

BARRY, B. W. Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v.14, p.101-14, 2001.

BASHIR, S.J.; CHEW, A.L.; ANGIGBOGU, A.; DREHER, F.; MAIBACH, H.I. Physical and physiological effects of stratum corneum tape stripping. **Skin Research and Technology**, v. 4, p. 40-48, 2001.

BERGH, B.A.I.V.; SWARTZENDRUDER, D.C.; GEST, A.B.; HOOGSTRAATE, J.J.; SCHRIJVERS, A.H.G.J; BODDÉ, H.E.; JUNGINGER, H.E.; BOUESTRA, J.A. Development of an optimal protocol for ultrastructural examination of skin by transmission electron microscopy. **J. Microscopy**, v.187, p.125-133, 1997.

BERNER, B. LIU, P. Alcohols. In: SMITH, E.W., MAIBACH, H.I. (Eds). **Percutaneous penetration enhancers**. Boca Raton: CRC, 1995, p. 45.

BOEHNLEINE, J.; SAKR, A.; LICHTIN, J.L.; BRONAUGH, R.L. Characterization of esterase and alcohol dehydrogenase activity in skin. Metabolism of retinyl palmitate to retinol (vitamin A) during precutaneous absorpoin. **Pharm. Res.**, v. 11, p. 1155-59, 1994.

BOUWSTRA, J.A. HONEYWELL-NGUYEN, P.L. GOORIS, G. S. PONEC, M. Structure of the skin barrier and its modulation by vesicular formulations. **Progr. Lipid. Res.**, v.42, p.1-36, 2003.

BRITISH PHARMACOPOEIA, v. II. London: The Stationery Office, 2000.

BRONAUGH, R.L. In vitro diffusion cell studies. In: RIVIERE, J.E. (ed.). **Dermal Absorption Models in Toxicology and Pharmacology**. New York: CRC, 2006, p. 21-27.

CHANG, S.K. WILLIAMS, P.L. DAUTERMAN, W. C. RIVIERE, J.E. Percutaneous absorption, dermatopharmacokinetics and related biotransformation studies of carbaryl, lindane, malathion, and parathion in isolated perfused porcine skin. **Toxicology**, v. 91, p. 269-80, 1994.

CHEN, L.; HUI-NAN, X.; XIAO-LING, L. In vitro permeation of tetramethylpyrazine across porcine buccal mucosa. **Acta Pharmacol. Sin.**, v.23, p.792-796, 2002.

CLOWES, H.M.; SCOTT, R.C.; HEYLINGS, J.R. Skin absorption: Flow-through or static diffusion cells. **Toxic. in vitro**, v. 8, p. 827-30, 1994.

CONSUELO, D.I.; JACQUES, Y.; PIZZOLATO, G-P; GUY, R. H.; FALSON, F. Comparison of the lipid composition of porcine buccal and esophageal permeability barriers. **Arch. Oral Biol.**, v.50, p.981-987, 2005a.

CONSUELO, D.I.; PIZZOLATO, G-P.; FALSON, F.; GUY, R. H.; JACQUES, Y. Evaluation of pig esophageal mucosa as a permeability barrier model for buccal tissue. **J. Pharm. Sci.**, v.94, p.2777-2787, 2005b.

DARBRE, P.D. HARVEY, P.W. Paraben esters: review of recent studies of endocrine toxicity, absorption, esterase and human exposure, and discussion of potential human health risks. **J. Appl. Toxicol.**, v. 28, p. 561-78, 2008.

DARBRE, P.D.; ALJARRAH, A.; MILLER, W.R.; COLDHAM, N.G.; SAUER, M.J.; POPE, G.S. Concentrations of parabens in human breast tumours. **J. Appl. Toxicol.**, v. 24, p. 5–13, 2004.

DENEER, V.H.; DRESE, G.B.; ROEMELE, P.E.; VERHOEF, J.C.; LIE, A. HUEN L.; KINGMA, J.H.; BROUWERS, J.R.; JUNGINGER, H.E. Buccal transport of flecainide and sotalol: effect of a bile salt and ionization state. **Int. J. Pharm.**, v.241, p.127-34, 2002.

EL HUSSEIN, S.; MURET, P.; BERARD, M.; MAKKI, S.; HUMBERT, P. Assessment of principal parabens used in cosmetics after their passage through human epidermis-dermis layers (ex vivo study). **Exp. Dermatol.**, v. 16, p. 830-6, 2007.

EL MAGHRABY, G. M.; BARRY, B. W.; WILLIAMS, A. C. Liposomes and skin: from drug delivery to model membranes, **Eur. J. Pharm. Sci.**, v.34, p.203-222, 2008.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4. ed. São Paulo: Ateneu, 2001.

FDA/CDER. Nonsterile semisolid dosage forms – scale-up and postapproval changes: chemistry, manufacturing, and controls; in vitro release testing and in vivo bioequivalence documentation. 1997. Disponível em: <http://www.fda.gov/cder/guidance.htm>. Acesso em: set 2007.

FRANTZ, S.W. Instrumentation and methodology for in vitro skin diffusion cells in methodology for skin absorption. In: KEMPPAINEN, B.W.; REIFENRATH, W.G. (eds.). **Methods for Skin Absorption**. Boca Raton: CRC, 1990, p.35-59.

- GHANDI, R.B; ROBINSON, J.R. Oral cavity as a site for bioadhesive drug delivery. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v.13, p.43-74, 1994.
- GIANNOLA, L.I.; DE CARO, V.; GIANDALIA, G.; SIRAGUSA, M.G.; D'ANGELO, M.; LO MUZIO, L.; CAMPISI, G. Transbuccal tablets of carbamazepine: formulation, release and absorption pattern. **Int. J. Immunopathol. Pharmacol.**, v. 18, p. 21-31, 2005.
- HAO, J.; HENG, P.W. Buccal delivery systems. **Drug Dev. Ind. Pharm.**, v.29, p.821-832, 2003.
- HARADA, K.; MURAKAMI, T.; YATA, N.; YAMAMOTO, S. Role of intercellular lipids in stratum corneum in the percutaneous permeation of drugs. **J. Invest. Dermatol.**, v.99, p.278-282, 1992.
- HARDING, C.R. The stratum corneum: structure and function in health and disease. **Dermatol. Ther.**, v.17, p.6-15, 2004.
- HASSAN, A.S.; SAPIN, A.; UBRICH, N.; MAINCENT, P.; BOLZAN, C.; LEROY, P. Simple and sensitive HPLC method with fluorescence detection for the measurement of ibuprofen in rat plasma: application to a long-lasting dosage form. **Drug Dev. Ind. Pharm.**, v.34, p. 1064-70, 2008.
- HERKENNE, C.; ALBERTI, I.; NAIK, A.; KALIA, Y.N.; MATHY, F.X.; PREAT, V.; GUY, R.H. In vivo methods for the assessment of topical drug bioavailability. **Pharm. Res.**, v. 25, p.87-103, 2008.
- HERKENNE, C.; NAIK, A.; KALIA, Y.N.; HADGRAFT, J.; GUY, R.H. Pig ear skin ex vivo as a model for in vivo dermatopharmacokinetic studies in man. **Pharm. Res.**, v. 23, p.1850-6, 2006.
- HEUBER, F.; OUVRARD-BARATON, F.; BIESSE, J.P.; COURTELLEMONT, P.; VINCENT, C.M.; MARTY, J.P. Pig ear skin as a model for in vitro percutaneous absorption studies: preliminary results of an inter-laboratory validation. In: BRAIN, R.K.; WALTERS, K.A. (ed.) **Perspectives in Percutaneous Penetration**. Cardiff: STS, 1998, p. 81.
- HO, N.F.H. Biophysical kinetic modeling of buccal absorption. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 12, p. 61– 97, 1993.
- HOOGSTRAATE, A.J.; VERHOEF, J.C.; TUK, B.; PIJPERS, A.; VAN LEENGOED, L.A.; VERHEIJDEN, J. H.; JUNGINGER, H. E.; BODDE, H. E. In vivo buccal delivery of fluorescein isothiocyanate-dextran 4400 with glycodeoxycholate as an absorption enhancer in pigs. **J. Control. Rel.**, v.4, p.77-84, 1996.
- IKINCI, G.; CAPAN, Y.; SENEL, S.; ALAADDINOGLU, E.; DALKARA, T.; HINCAL, A.A. In vitro/in vivo studies on a buccal bioadhesive tablet formulation of carbamazepine. **Pharmazie**, v. 55, p. 762-5, 2000.
- JACOBI, U.; KAISER, M.; RICHTER, H.; AUDRING, H.; STERRY, W.; LADEMANN, J. The number of stratum corneum cell layers correlates with the pseudo-absorption of the corneocytes. **Skin Pharmacol. Physiol.**, v. 18, p.175-79, 2005.
- JANJUA, N.R.; MORTENSEN, G.K.; ANDERSSON, A.M.; KONGSHOJ, B.; SKAKKEBAEK, N.E.; WULF, H.C. Systemic uptake of diethyl phthalate, dibutyl phthalate, and butyl paraben following whole-body topical application and reproductive and thyroid hormone levels in humans. **Environ. Sci. Technol.**, v. 41, p. 5564–70, 2007.
- JANTHARAPRAPAP, R.; STAGNI, G. Effects of penetration enhancers on in vitro permeability of meloxicam gels. **Int. J. Pharm.**, v. 343, p.26-33, 2007.
- JAWORSKA, M.; SZULINSKA, Z.; WILK, M. Application of a capillary electrophoresis method for simultaneous determination of preservatives in pharmaceutical formulations. **J. Sep. Sci.**, v. 28, p. 137-43, 2005.

JEWELL, C.; PRUSAKIEWICZ, J.J.; ACKERMANN, C.; PAYNE, N.A.; FATE, G.; WILLIAMS, F.M. The distribution of esterases in the skin of the minipig. **Toxicol. Lett.**, v. 173, p. 118-23, 2007a.

JEWELL, C.; PRUSAKIEWICZ, J.J.; ACKERMANN, C.; PAYNE, N.A.; FATE, G.; VOORMAN, R.; WILLIAMS, F.M. Hydrolysis of a series of parabens by skin microsomes and cytosol from human and minipigs and in whole skin in short-term culture. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v.225, p. 221-8, 2007b.

JUNGINGER, H.E.; HOOGSTRAATE, J.A.; VERHOEF, J.C. Recent advances in buccal drug delivery and absorption--in vitro and in vivo studies. **J. Control. Release**, v.62, p. 149-59, 1999.

KALIA, Y.N.; GUY, R.H. Modeling transdermal drug delivery. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 48, n. 2-3, p. 159-72, 2001.

KELMANN, R.G.; KUMINEK, G.; TEIXEIRA, H. F.; KOESTER, L.S. Determination of carbamazepine in parenteral nanoemulsions: development and validation of an HPLC method. **Chromatographia**, v. 66, p. 427-30, 2007.

KOESTER, L.S.; BERTUOL, J.B.; GROCH, K.R.; XAVIER, C.R.; MOELLERKE, R.; MAYORGA, P.; DALLA COSTA, T.; BASSANI, V. L. Bioavailability of carbamazepine: beta-cyclodextrin complex in beagle dogs from hydroxypropylmethylcellulose matrix tablets. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v. 22, p. 201-7, 2004.

KUROSAKI, Y.; KIMURA, T. Regional variation in oral mucosal drug permeability. **Crit. Rev. Ther. Drug Carrier. Syst.**, v.17, p.467-508, 2000.

KUROSAKI, Y.; YANO, K.; KIMURA, T. Perfusion cells for studying regional variation in oral mucosal permeability in humans: I. Kinetic aspects in oral-mucosal absorption of alkylparabens, **Pharm. Res.**, v. 14, p. 1241-1245, 1997.

LAKERAM, M.; LOCKLEY, D.J.; SANDERS, D.J.; PENDLINGTON, R.; FORBES, B. Paraben transport and metabolism in the biomimetic artificial membrane permeability assay (BAMPA) and 3-day and 21-day Caco-2 cell systems. **J. Biomol. Screen.**, v. 12, p. 84-91, 2007.

LANGOTH, N.; BERNKOP-SCHNURCH, A.; KURKA, P. In vitro evaluation of various buccal permeation enhancing systems for PACAP (pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide). **Pharm. Res.**, v.22, p.2045-50, 2005.

LEIPOLD, H.R; QUADROS, E. Nicotine permeation through buccal cultures. **Proc. Int. Symp. Control. Release Bioact. Mater.**, v.20, p.242-243, 1993.

LIANG, D.; MA, J.; WEI, B.; POON, I.O.; BELL, E.C.; BATES, T.R. Determination of inositol hexanicotinate in rat plasma by high performance liquid chromatography with UV detection. **J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.**, v. 823, p. 172-6, 2008.

LONG, J.D.; ORLANDO, R.C. Esophageal submucosal glands: structure and function. **Am. J. Gastroenterol.**, v.94, p. 2818-2824, 1999.

MANETTO, G.; TAGLIARO, F.; CRIVELLENTI, F.; PASCALI, V.L.; MARIGO, M. Field-amplified sample stacking capillary zone electrophoresis applied to the analysis of opiate drugs in hair. **Electrophoresis**, v. 21, p. 2891-8, 2000.

MASHRU, R.; SUTARIYA, V.; SANKALIA, M.; SANKALIA, J. Transbuccal delivery of lamotrigine across porcine buccal mucosa: in vitro determination of routes of buccal transport. **J. Pharm. Pharm. Sci.**, v.8, p.54-62, 2005.

MENON, G.K. New insights into skin structure: scratching the surface. **Adv. Drug Del. Rev.**, v. 54, p. 3-17, 2002.

- MEYER, B.K.; NI, A.; HU, B.; SHI, L. Antimicrobial preservative use in parenteral products: past and present. **J. Pharm. Sci.**, v. 96, p. 3155-67, 2007.
- MITRAGOTRI, S. Synergistic effect of enhancers for transdermal drug delivery. **Pharm. Res.**, v.17, p.1354-1359, 2000.
- MOFFAT, A.C.; OSSELTON, M.D; WINDDOP, B. **Clarke's analysis of drugs and poisons**: in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material. 3. ed. London: Pharmaceutical, 2004.
- MOHAMMADI-SAMANI, S.; BAHRI-NAJAFI, R.; YOUSEFI, G. Formulation and in vitro evaluation of prednisolone buccoadhesive tablets. **Il Farmaco**, v.60, p.339-44, 2005.
- MONTEIRO-RIVIERE, N.A. Structure and function of skin. In: RIVIERI, J.E. (ed.) **Dermal absorption models in toxicology and pharmacology**. New York: CRC, 2006, p.1-19.
- MONTEIRO-RIVIERE, N.A. Comparative anatomy, physiology, and biochemistry of mammalian skin. In: HOBSON, D.W. (ed.) **Dermal and ocular toxicology: fundamentals and methods**. New York: CRC, 1991, p. 3-71.
- MOSER, K.; KRIWET, K.; NAIK, A.; KALIA, Y.N. GUY, R.H. Passive skin penetration enhancement and its quantification in vitro. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v.52, p.103-12, 2001a.
- MOSER, K.; KRIWET, K.; NAIK, A.; KALIA, Y.N. GUY, R.H. Supersaturation: enhancement of skin penetration and permeation of a lipophilic drug. **Pharm. Res.**, v.18, p.1006-11, 2001b.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, v.65, p.55-63, 1983.
- MUHAMMAD, F.; RIVIERE, J.E. In vivo models. In: RIVIERE, J.E. (ed.). **Dermal absorption models in toxicology and pharmacology**. New York: CRC, 2006, p. 49-60.
- NAIR, R.; GONEN, S.; HOAG, S. W. Influence of polyethylene glycol and povidone on the polymorphic transformation and solubility of carbamazepine. **Int. J. Pharm.**, v. 240, p. 11-22, 2002.
- NETZ, P.A.; ORTEGA, G.G. **Fundamentos de físico-química**: Uma abordagem conceitual para as Ciências Farmacêuticas. São Paulo: Artmed, 2002.
- NICOLAZZO, J.A.; REED, B.L.; FINNIN, B.C. The effect of various in vitro conditions on the permeability characteristics of the buccal mucosa. **J. Pharm. Sci.**, v.92, p.2399-410, 2003.
- NICOLAZZO, J.A.; REED, B.L.; FINNIN, B.C. Enhancing the buccal mucosal uptake and retention of triamcinolone acetonide. **J. Control. Release**, v.105, p. 240-248, 2005.
- NICOLAZZO, J.A.; FINNIN, B.C. *In vivo* and *in vitro* models for assessing drug absorption across the buccal mucosa. In: EHRHARDT, C.; KIM, K-J. (ed.) **Drug absorption studies**: in situ, in vitro and in silico models. 1. ed. New York: Springer, 2008, p.89-103.
- NICOLI, S.; ZANI, F.; BILZI, S.; BETTINI, R.; SANTI, P. Association of nicotinamide with parabens: effect on solubility, partition and transdermal permeation. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 69, p. 613-621, 2008.
- OH, S.Y.; FUJII, M.; TAKEDA, Y.; YODA, K.; UTOGUCHI, N.; MATSUMOTO, M.; WATANABE, Y. The effect of ethanol on the simultaneous transport and metabolism of methyl *p*-hydroxybenzoate in excised skin of Yucatan micropig. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 236, p. 35-42, 2002.
- OLIVIER, S.; SILVA, V.L.; MOTTA, M.; SILVA, J.E. Emprego de planejamento fatorial no desenvolvimento de uma metodologia para extração de zinco de resíduos galvânicos. **Química Nova**, v. 30, p. 1750-1753, 2007.

OTBERG, N., RICHTER, H., SCHAEFER, H., BLUME-PEYTAVI, U., STERRY, W., LADEMANN, J. Variations of hair follicle size and distribution in different body sites. **J. Invest. Dermatol.** 122, p.14–19, 2004.

PEDERSEN, S.; MARRA, F.; NICOLI, S.; SANTI, P. In vitro skin permeation and retention of parabens from cosmetic formulations. **Int. J. Cosmet. Sci.**, v.29, p. 361-7, 2007.

PERRET, D. Capillary electrophoresis for drug analysis. In: MOFFAT, A.C.; OSSELTON, M.D.; WINDDOP, B. (Ed.) **Clarke's analysis of drug and poisons**. London: Pharmaceutical, v.1, 2003, p. 535-549.

PIZARRO, N.; ORTUNO, J.; FARRE, M.; HERNANDEZ-LOPEZ, C.; PUJADAS, M.; LLEBARIA, A.; JOGLAR, J.; ROSET, P. N.; MAS, M.; SEGURA, J.; CAMI, J.; DE LA TORRE, R. Determination of MDMA and its metabolites in blood and urine by gas chromatography-mass spectrometry and analysis of enantiomers by capillary electrophoresis. **J. Anal. Toxicol.**, v. 26, p. 157-65, 2002.

PORTERO, A.; REMUNAN-LOPEZ, C.; NIELSEN, H.M. The potential of chitosan in enhancing peptide and protein absorption across the TR146 cell culture model - an in vitro model of the buccal epithelium. **Pharm. Res.**, v.19, p.169-74, 2002.

PRAUSNITZ, M.R., MITRAGOTRI, S., LANGER, R. Current status and future potential of transdermal drug delivery. **Nature Rev.**, v. 3, p.115-124, 2004.

PRISTA, L.N.; BAHIA, M.F.; VILAR, E. **Dermofarmácia e cosmética**. Porto: Associação Nacional de Farmácia, 1992.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. **Farmacologia**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

RHIM, S.Y.; PARK, J.H.; PARK, Y.S.; LEE, M.H.; SHAW, L.M.; KANG, J.S. Bioequivalence and pharmacokinetic evaluation of two branded formulations of aceclofenac 100 mg: a single-dose, randomized, open-label, two-period crossover comparison in healthy Korean adult volunteers. **Clin. Ther.**, v.30, p. 633-40, 2008.

RIEGER, M.M. Factors affecting sorption of topically applied substances. In: ZATZ, J.L. (Ed.). **Skin Permeation: fundamentals and application**. Wheaton: Allured, 1993, p. 33-72.

ROBERTS, M.S.; PUGH W, J.; HADGRAFT, J. Epidermal permeability: penetrant structure relationships. 2. The effect of H-bonding groups in penetrants on their diffusion through the stratum corneum. **Int. J. Pharm.**, v.132, p. 23-32, 1996.

ROBINSON, J.R.; YANG, X. Absorption enhancers. In: SWARBRICK, J.; BOYLAN, J.C. (Eds.), **Encyclopedia of Pharmaceutical Technology**. New York: Marcel Decker, 2001, p.1– 27.

ROWBOTHAN, M.C. Treatment of neuropathic pain: Perspectives on currents options. In: PAIN 2005. **An Update Review**. Refresher Course Syllabus. Seattle: IASP, 2005, p. 107-119.

RUSTICHELLI, C.; GAMBERINI, G.; FERIOLI, V.; GAMBERINI, M. C.; FICARRA, R.; TOMMASINI, S. Solid-se study of polymorphic drugs: carbamazepine. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 23, p. 41-54, 2000.

SALAMAT-MILLER, N.; CHITTCHANG, M.; JOHNSTON, T.P. The use of mucoadhesive polymers in buccal drug delivery. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v.57, p.1666-91, 2005.

SANDERS, L.M. Drug delivery system and routes of administration of peptide and protein drugs. **Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.**, v.15, p.95–102,1990.

- SATOH, T., HOSOKAWA, M. Structure, function and regulation of carboxylesterases. **Chem.-Biol. Interact.**, v.162, p. 195–211, 2006.
- SCHUEPLEIN, R.J.; ROSS, L. Effects of surfactants and solvents on the permeability of epidermis. **Journal of the Society of Cosmetic Chemists**, v. 21, p. 853-873, 1970.
- SCHMOOK, F.P.; MEINGASSNER, J.G.; BILLICH, A. Comparison of human skin or epiderms models with human and animal skin in in-vitro percutaneous absorption. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 215, p. 51-56, 2001.
- SENEL, S.; HINCAL, A.A. Drug permeation enhancement via buccal route: possibilities and limitations. **J. Control. Release**, v.72, p.133-44, 2001.
- SHAH, J. Analysis of permeation data: evaluation of lag time method. **Int. J. Pharm.**, v. 90, n. 2, p. 161-169, 1993.
- SHAH, J.C.; KAKA, I.; TENJARLA, S.; LAU, S.W.J.; CHOW, D. Analysis of percutaneous permeation data: II. Evaluation of the lag time method. **Int. J. Pharm.**, v. 109, n. 3, p. 283-290, 1994.
- SHEN, H.Y.; JIANG, H.L.; MAO, H.L.; PAN, G.; CAO, Y.F. Simultaneous determination of seven phthalates and four parabens in cosmetic products using HPLC-DAD and GC-MS methods. **J. Sep. Sci.**, v. 30, p. 48–54, 2007.
- SHIN, S.; BUM, J.; CHOI, J. Enhanced bioavailability by buccal administration of triamcinolone acetonide from the bioadhesive gels in rabbits. **Int. J. Pharm.**, v. 209, p. 37-43, 2000.
- SHIN, S.C.; KIM, J.Y. Enhanced permeation of triamcinolone acetonide through the buccal mucosa. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v.50, p. 217-220, 2000.
- SHOJACI, A.H. Buccal mucosa as a route for systemic drug delivery: a review. **J. Pharm. Pharmaceut. Sci.**, v.1, p.15-30, 1998.
- SHOJAEI, A.H.; BERNER, B.; XIAOLING, L. Transbuccal delivery of acyclovir: I. In vitro determination of routes of buccal transport. **Pharm. Res.**, v.15, p.1182-8, 1998.
- SILVA, J.A.F.; TOMAZELLI, W.K.; CARRILHO, E.; TAVARES, M.F.M. Terminologia para as técnicas de eletromigração em capilares. **Química Nova**, v. 30, p. 740-744, 2007.
- SLOMIANY, B.L.; MURTY, V.L.; PIOTROWSKI, J.; SLOMIANY, A. Salivary mucins in oral mucosal defense. **Gen. Pharmacol.**, v.10, p.569-578, 1996.
- SMART, J. C. Buccal drug delivery. **Expert. Opin. Drug Deliv.**, v.2, n.3, p.507-17, 2005.
- SONG, Y.; WANG, Y.; THAKUR, R.; MEIDAN, V.M.; MICHNIAK, B. Mucosal drug delivery: membranes, methodologies, and applications. **Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.**, v.21, 195-256, 2004.
- SONI, M.G.; TAYLOR, S.L.; GREENBERG, N.A.; BURDOCK, G.A. Evaluation of the health aspects of methyl paraben: a review of the published literature. **Food Chem. Toxicol.**, v. 40, p. 1335-73, 2002.
- SPECHLER, S.J.; GOYAL, R.K. The columnar-lined esophagus, intestinal metaplasia, and Norman Barrett. **Gastroenterology**, v. 110, p. 614-21, 1996.
- SQUIER, C.A.; HALL, B. K. The permeability of skin and oral mucosa to water and horseradish peroxidase as related to the thickness of the permeability barrier. **J. Invest. Dermatol.**, v.84, p.176-79, 1985.

SQUIER, C.A.; KREMER, M.J.; BRUSKIN, A.; ROSE, A.; HALEY, J.D. Oral mucosal permeability and stability of transforming growth factor beta-3 *in vitro*. **Pharm. Res.**, v. 16, p.1557-1563, 1999.

SQUIER, C.A.; KREMER, M.J. Biology of oral mucosa and esophagus. **J. Natl. Cancer Inst. Monogr.**, v.29, p.7-15, 2001.

SUDHAKAR, Y.; KUOTSU, K.; BANDYOPADHYAY, A.K. Buccal bioadhesive drug delivery - a promising option for orally less efficient drugs. **J. Control. Release**, v.114, p.15-40, 2006.

SUN, Z., MURRY, D.J., SANGHANI, S.P., DAVIS, W.I., KEDISHVILI, N.Y., ZOU, Q., HURLEY, T.D., BOSRON, W.F. Methylphenidate is stereo-selectively hydrolysed by human carboxylesterase CES1A1. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 310, p. 469-76, 2004.

SZKITOWSKA, M. The influence of ethanol on permeation behaviour of the porous pathway in the stratum corneum. **Int. J. Pharm.**, v. 137, p. 137-140, 1996.

TAVARES, M.F.M. Mecanismos de separação em eletroforese capilar. **Química Nova**, v. 20, p. 493-511, 1997.

THE JAPANESE PHARMACOPOEIA, 14 ed. Japan: Ministry of Health and Welfare, 2001.

THE UNITED STATES PHARMACOPEIA. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention, 2007.

THONG, H.Y.; ZHAI, H.; MAIBACH, H.I. Percutaneous penetration enhancers: an overview. **Skin Pharmacol. Physiol.**, v.20, p. 272-282, 2007.

TOJO, K. Design and calibration of *in vitro* permeation apparatus. In: CHIEN, Y.W. (ed.). **Transdermal controlled systemic medications**. New York: Marcel Dekker, 1987, p.127-158.

UNGPHAIBOON, S.; MAITANI, Y. *In vitro* permeation studies of triamcinolone acetonide mouthwashes. **Int. J. Pharm.**, v. 220, p. 111-117, 2001.

UNGPHAIBOON, S.; NITTAYANANTA, W.; VUDDHAKUL, V.; MANEENUAN, D.; KIETTHUBTHEW, S.; WONGPOOWARAK, W.; PHADOONGSOMBAT, N. Formulation and efficacy of triamcinolone acetonide mouthwash for treating oral lichen planus. **Am. J. Health Syst. Pharm.**, v. 62, p. 485-91, 2005.

VAN EYK, A.D.; VAN DER BIJL, P. Comparative permeability of fresh and frozen/thawed porcine buccal mucosa towards various chemical markers. **Sadj**, v.61, p.200-3, 2006.

VEUILLEZ, F.; KALIA, Y. N.; JACQUES, Y.; DESHUSSES, J.; BURI, P. Factors and strategies for improving buccal absorption of peptides. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v.51, p.93-109, 2001.

VINCENT, S.D. Diagnosing and managing oral lichen planus. **J. Am. Dent. Assoc.**, v.122, p. 93-94, 1991.

WALKER, G.F.; LANGOTH, N.; BERNKOP-SCHNURCH, A. Peptidase activity on the surface of the porcine buccal mucosa, **Int. J. Pharm.**, v.233, p.141- 147, 2002.

WANG, Y.J.; PEARLMAN, R. Stability and characterization of protein and peptide drugs, case histories. New York: Plenum, 1999.

WELLING, P.G. **Pharmacokinetics: Process, mathematics, and applications**. 2. ed. Washington: American Chemical Society, 1997.

WOLF, P.; MAY, T.; TISKA, G.; SCHREIBER, G. Steady state concentrations and diurnal fluctuations of carbamazepine in patients after different slow release formulations. **Drug Res.**, v. 42, p. 284-288, 1992.

YE, X.; BISHOP, A.M.; REIDY, J.A.; NEEDHAM, L.L.; CALAFAT, A.M. Parabens as urinary biomarkers of exposure in humans. **Environ. Health Perspect.**, v. 114, p. 1843–1846, 2006.

ZHANG, J., BURNELL, J.C., DAMAUAL, N., BOSRON, W.F. Binding and hydrolysis of meperidine by human liver carboxylesterase hCE-1. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 290, p. 314–18, 1999.

ZIELONKA, J.; HARDY, M.; KALYANARAMAN, B. HPLC study of oxidation products of hydroethidine in chemical and biological systems: ramifications in superoxide measurements. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 46, p. 329-38, 2009.

APÊNDICE A – FABRICAÇÃO DO EQUIPAMENTO UTILIZADO NESTA DISSERTAÇÃO

Anteriormente à realização dos experimentos de permeabilidade e permeação *ex vivo*, foi necessária a elaboração de um sistema adequado para tal. Iniciou-se pela busca na literatura de diferentes modelos existentes de câmara de difusão e optou-se pela de Franz, considerando sua ampla aplicabilidade e vantagens. Uma de suas principais limitações seria a formação de bolhas na interface da membrana e do compartimento inferior, alterando a área de difusão (CLOWES; SCOTT; HEYLINGS, 1994). No entanto, este problema pôde ser resolvido com os princípios físicos da hidrostática, considerando-se a cânula de amostragem e o compartimento inferior da câmara de Franz como um sistema de vasos comunicantes. Desta forma, para se evitar a formação de bolhas de ar nesta interface, a cânula de amostragem foi projetada em altura superior ao compartimento inferior. Além disto, a solução receptora foi previamente desgaseificada, removendo bolhas de ar do seu interior. Com relação às dimensões da câmara de Franz, considerou-se uma área de difusão de 1,77 cm², e volumes de 10 e 2 mL para os compartimentos inferior e superior, respectivamente.

Avaliaram-se diferentes variáveis que pudessem interferir nos resultados dos experimentos visando à uniformização e padronização das mesmas. Dentre estas variáveis, considerou-se pH, temperatura, agitação e volume das alíquotas retiradas. Estas variáveis foram controladas para a garantia de maior reprodutibilidade experimental e maior correlação quando da comparação dos resultados obtidos com dados *in vivo*. Nos experimentos preliminares, utilizou-se um agitador magnético convencional e a temperatura foi controlada através da conexão da câmara de Franz a um banho-maria munido de uma pequena bomba de aquário. O agitador tinha como função mimetizar os movimentos mecânicos bucais, bem como distribuir a amostra de forma homogênea na solução receptora, e o banho-maria objetivava simular a temperatura corpórea (37°C). A Figura 1 ilustra a montagem deste aparato de experimentação preliminar.

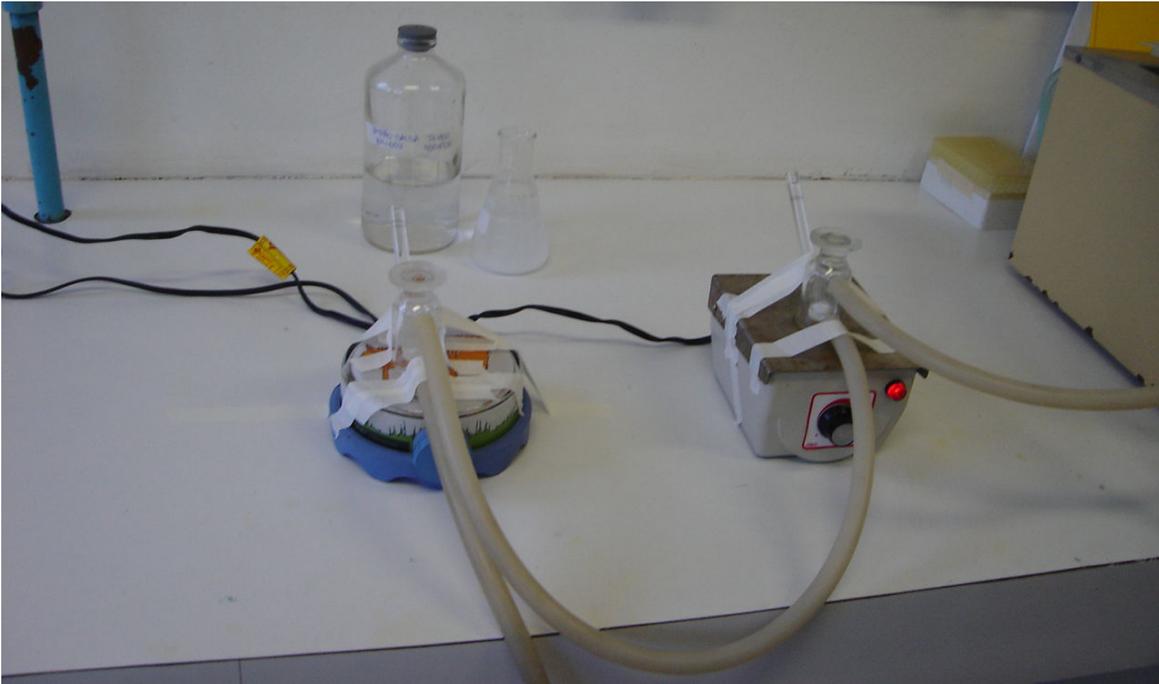


Figura 1: Aparato preliminar de experimentação para os estudos de permeabilidade *ex vivo*.

Considerando-se a variabilidade na agitação deste aparato, devido à utilização de diferentes agitadores magnéticos de formatos variados e à falta de controle da mesma, além da dificuldade de monitorar a perda efetiva de calor, durante a passagem da água do banho-maria para a câmara de Franz, cogitou-se a possibilidade de projetar um equipamento para eliminar tais variações entre as diferentes unidades experimentais. O projeto inicial de um equipamento foi apresentado para a microempresa DIST, situada em Florianópolis, que se comprometeu com a construção do mesmo. Discussões periódicas foram realizadas visando à sua confecção, envolvendo competências e habilidades do mestrando e da professora orientadora, bem como dos profissionais da empresa. O produto final resultante destas discussões consta na Figura 2.

Este banho termostaticado com agitação multiponto permitiu a uniformização de duas variáveis importantes, agitação e temperatura. Através de um dispositivo de controle, que integra todos os pontos de agitação em um único comando, é possível controlar a agitação em todas as câmaras. Os canais de distribuição da água, destinados ao controle da temperatura nas câmaras, partem de um reservatório termostaticado, localizado na porção posterior do equipamento, e alimentam as camisas duplas das câmaras com água a $37^{\circ}\text{C} \pm 1$. Considerando que este sistema de distribuição de água é fechado e tem um percurso menor em relação ao sistema anterior, as perdas de calor foram certamente minimizadas. A possibilidade de se trabalhar com oito câmaras simultaneamente representou outra vantagem metodológica. Apenas os experimentos realizados neste equipamento foram considerados nesta dissertação.



Figura 2: Banho termostatzado com agitação multiponto para estudos de permeabilidade *ex vivo*.

REFERÊNCIAS

CLOWES, H.M.; SCOTT, R.C.; HEULINGS, J.R. Skin absorption: Flow-through or static diffusion cells. *Toxic. in vitro*, v.8, p.827-830, 1994.

APÊNDICE B - CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA TESTADA DE ACETONIDO DE TRIANCINOLONA (AT)

1 METODOLOGIA

A caracterização do AT (Aspen Farmacêutica S.A., Brasil) foi realizada de acordo com literaturas oficiais (USP 30, 2007; BRITISH FARMACOPEIA, 2006; MOFFAT; OSSELTON; WINDDOP, 2004), além de outros métodos, tais como espectroscopia nas regiões do infravermelho e do ultravioleta, polarimetria, cromatografia em camada delgada, bem como análises termoanalíticas [termogravimetria (TG) e calorimetria exploratória diferencial (DSC)].

1.1 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)

Para a realização da cromatografia em camada delgada, utilizaram-se dois sistemas cromatográficos (Quadro 1) (MOFFAT; OSSELTON; WINDDOP, 2004).

Quadro 1: Sistemas cromatográficos utilizados para a caracterização do acetonido de triancinolona

SISTEMA CROMATOGRÁFICO	R _f (referência)
Fase fixa: gel de sílica G, 250 µm de espessura Fase móvel: diclorometano: éter: metanol: água (77:15:8:1,2)	0,32
Fase fixa: gel de sílica, 250 µm de espessura, impregnada com uma mistura de acetona: propilenoglicol (9:1) Fase móvel: ciclohexano: tolueno (1:1)	0,06

1.2 POLARIMETRIA

Considerando que o AT é um fármaco opticamente ativo, procedeu-se à avaliação do seu poder rotatório em polarímetro (Quimis), sob duas condições distintas: dissolução de 0,100 g do fármaco em 10 mL de 1,4-dioxano (BRITISH FARMACOPEIA, 2006); e dissolução de 0,050 g do fármaco em 10 mL de dimetilformamida (USP 30, 2007). Variáveis como concentração e comprimento do tubo onde foi colocada a amostra foram considerados para o cálculo do poder rotatório, realizado de acordo com a equação abaixo:

$$[\alpha] = \frac{\alpha \cdot 1000}{c \cdot l}$$

Onde:

α = valor medido

c = concentração (g/100mL)

l = comprimento do tubo (cm)

1.3 DETERMINAÇÃO DO PONTO DE FUSÃO

Pequena quantidade do AT foi colocada no equipamento destinado à aferição do ponto de fusão (Microquímica®), previamente calibrado. A amostra foi aquecida sob razão de aquecimento de 5°C/min até completa fusão (USP 30, 2007).

1.4 ANÁLISES TERMOANALÍTICAS

As técnicas de DSC e TG foram realizadas conforme literaturas da área (BECKET; QUAH; HILL, 1993; BRUNI et al., 2002; MURA; GRATERI; FAUCCINI, 2002).

As curvas DSC foram obtidas na faixa de temperatura entre 25°C e 350°C, utilizando-se célula calorimétrica modelo DSC-50 (Shimadzu), sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (100 mL.min⁻¹), razão de aquecimento de 10°C.min⁻¹, e cápsula de alumínio parcialmente fechada contendo a amostra.

As curvas TG foram obtidas na faixa de temperatura entre 25°C e 900°C, utilizando-se termobalança modelo TGA-50 (Shimadzu), sob razão dinâmica de nitrogênio (50 mL.min⁻¹), razão de aquecimento de 10°C.min⁻¹, e cadinho de platina contendo aproximadamente 3 mg da amostra.

1.5 ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO

Os espectros de absorção na região do infravermelho (IV) foram realizados com o equipamento FT-IR Shimadzu (IR Prestige 21), com resolução de 4 cm⁻¹. As amostras foram dispersas em brometo de potássio (KBr) e as leituras foram realizadas entre 500 e 4000 cm⁻¹ (MOFFAT; OSSELTON; WINDDOP; 2004).

1.6 ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO ULTRAVIOLETA (UV)

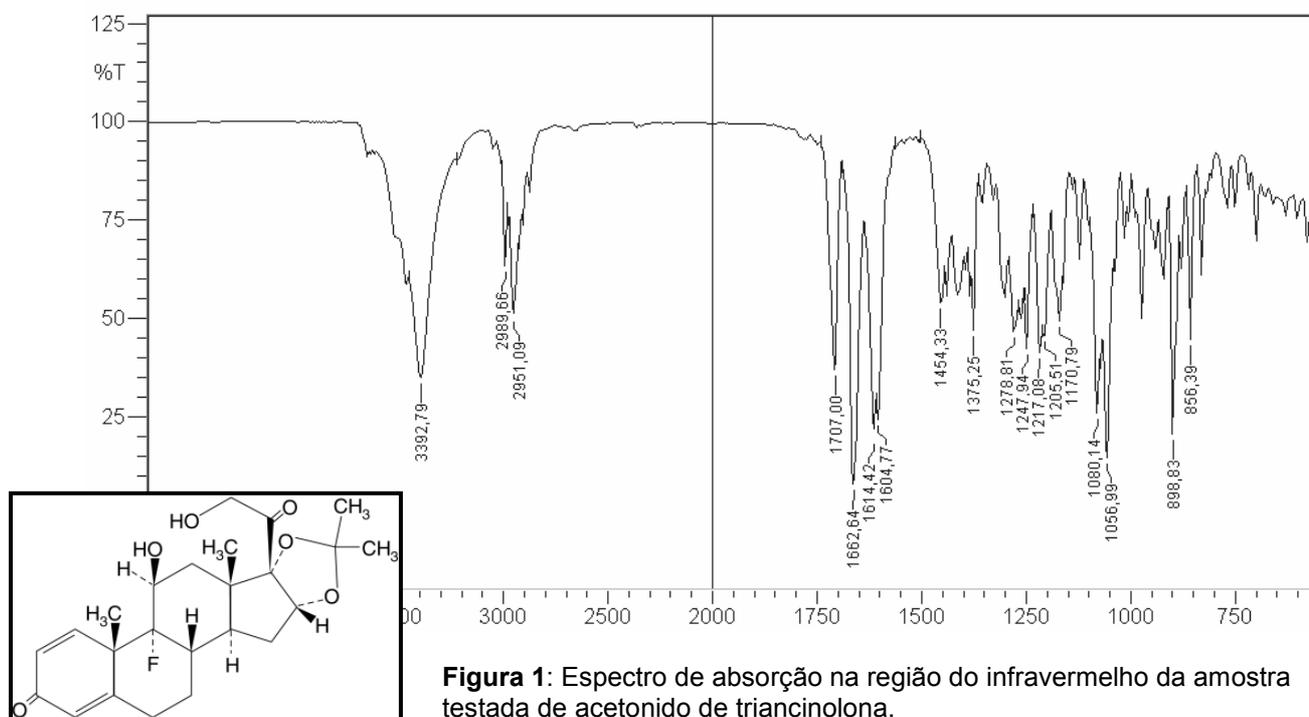
Preparou-se uma solução 0,001% (p/v) do fármaco em metanol. Empregaram-se cubetas de quartzo de 1 cm de percurso óptico, utilizando metanol como branco. O espectro de absorção foi obtido na faixa de 200 a 400 nm, em espectrofotômetro UV-Vis (Perkin-Elmer Lambda 35) (BRITISH FARMACOPEIA, 2006)

2 RESULTADOS

O Quadro 2 resume os resultados obtidos, comparando-os com especificações dos compêndios oficiais.

Quadro 2: Resultados da caracterização da amostra testada do acetono de triancinolona.

Teste	Especificações	Resultados
Identificação colorimétrica	Pó branco cristalino (BRITISH FARMACOPEIA, 2006)	De acordo
Solubilidade	Praticamente insolúvel em água, fracamente solúvel em álcool, muito pouco solúvel em éter (BRITISH FARMACOPEIA, 2006)	De acordo
Cromatografia em Camada Delgada	$R_f = 0,32$ (sistema 1) $R_f = 0,06$ (sistema 2) (MOFFAT; OSSELTON; WINDDOP, 2004)	$R_f = 0,347$ (sistema 1) $R_f = 0,025$ (sistema 2)
Polarimetria	Em dimetilformamida (entre +118 e +130) (USP 30, 2007) Em 1,4-dioxano (entre +100 e +107) (BRITISH FARMACOPEIA, 2006)	+368,5 +308,5
Ponto de Fusão (aparelho de fusão)	Entre 292°C e 294°C (MOFFAT; OSSELTON; WINDDOP; 2004)	281,2°C a 282,5°C
Espectroscopia no UV	Absorção máxima em 238 nm (MOFFAT; OSSELTON; WINDDOP; 2004; BRITISH FARMACOPEIA, 2006)	238 nm
Espectroscopia no IV	Principais picos de absorção são: 1663, 1057, 1618, 1609, 902, 1080 cm^{-1} (MOFFAT; OSSELTON; WINDDOP, 2004)	De acordo (Fig. 1)

**Figura 1:** Espectro de absorção na região do infravermelho da amostra testada de acetono de triancinolona.

Tendo em vista que a faixa de fusão medida para o AT em análise, utilizando-se aparelho de fusão, forneceu resultado diferente daquele especificado na literatura (Quadro 2), as análises termoanalíticas foram bastante úteis para comprovar esta diferença.

A curva DSC do AT apresentou um evento endotérmico na faixa de 280,96 e 291,12°C, característico do processo de fusão do fármaco, com um pico máximo em 288,05°C (Figura 2).

A partir de 309,03°C, observou-se o início da decomposição térmica do AT (Figura 3), sendo essa dividida em duas etapas: a primeira endotérmica (309,03 e 405,37°C) e a segunda exotérmica (405,37 e 517,49°C).

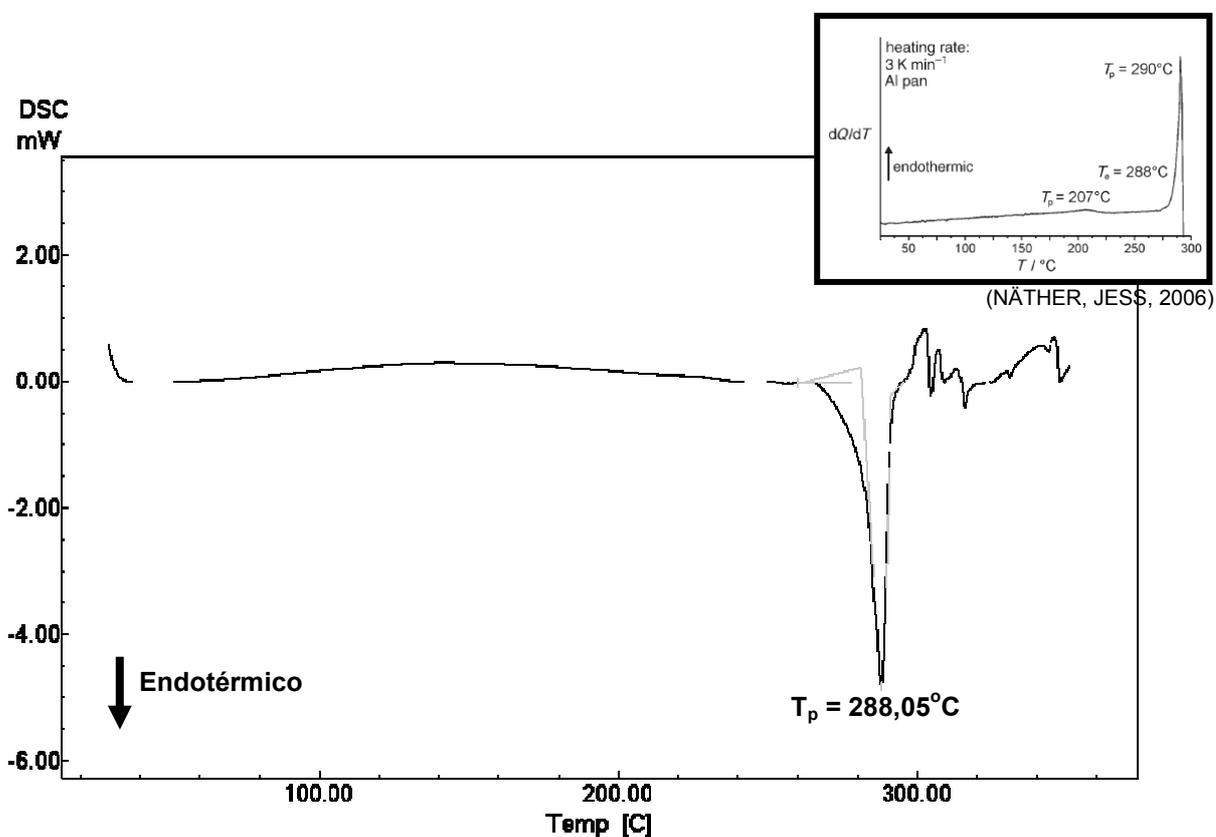


Figura 2: Resultado da análise calorimétrica exploratória diferencial (DSC) da amostra testada do acetono de triancinolona.

T_p = temperatura de pico

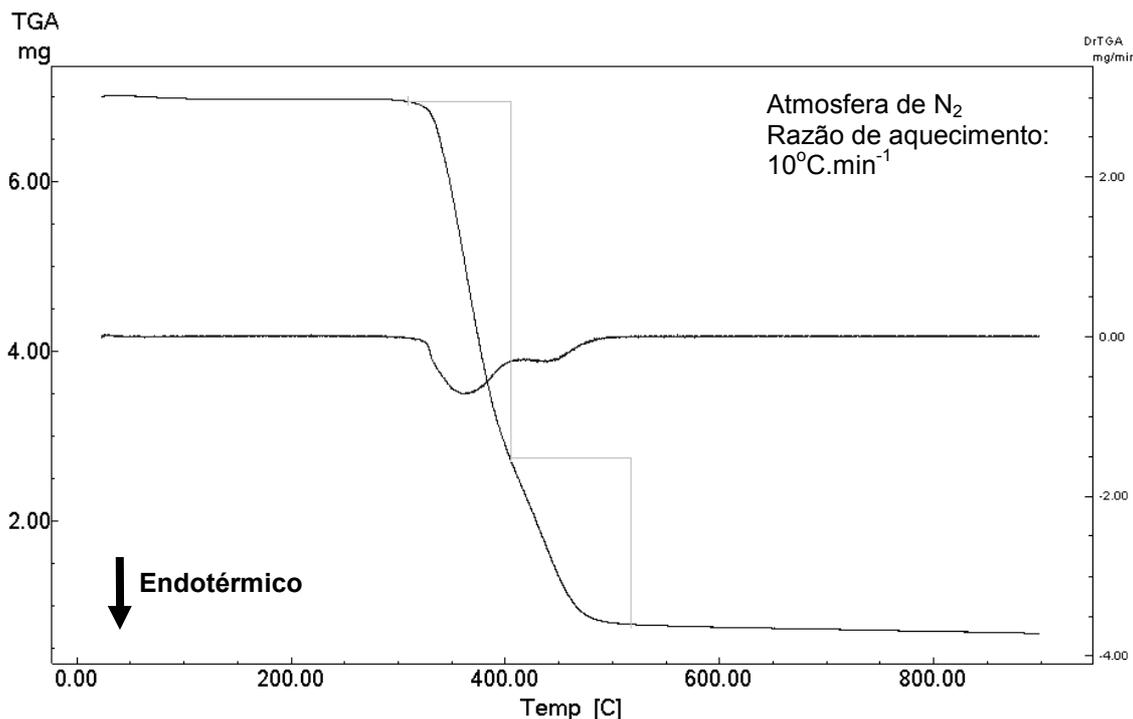


Figura 3: Resultado da análise termogravimétrica (TG) da amostra testada de acetonido de triancinolona.

Os dados encontrados confirmaram os obtidos anteriormente, ainda divergentes aos da literatura (MOFFAT; OSSELTON; WINDDOP, 2004); demonstrando que a utilização de um simples aparelho de fusão pode ser bastante útil nos processos de caracterização de matérias-primas.

A divergência dos resultados obtidos para este parâmetro, bem como daqueles obtidos no ensaio de avaliação do desvio da luz polarizada, levantou a hipótese da existência de diferentes estruturas cristalinas (polimorfismo) para o fármaco. Ao prepararem diferentes suspensões da forma cristalina deste fármaco em diferentes solventes, Nätther e Jess (2006) demonstraram, através de análises termoanalíticas e cristalográficas, que o AT pode existir em, pelo menos, duas formas polimórficas (I e II). A forma I, um hidrato, seria a forma convencionalmente utilizada na terapêutica e caracteriza-se por apresentar uma pequena quantidade de água que confere estabilidade à esta forma. Quando a água é removida, observa-se a transição para a forma II, bem como quando o fármaco é dissolvido em etanol. Comparando-se as análises termoanalíticas aqui realizadas com as apresentadas por Nätger e Jess, acredita-se que o fármaco em questão apresenta-se sob a forma II. Na análise por DSC, o fármaco fundiu-se em aproximadamente 288°C, sem qualquer transformação adicional e, por TG, não houve perda inicial de massa (referente a água). Desta forma, fica claro que o ponto de fusão relatado para este fármaco (MOFFAT; OSSELTON; WINDDOP; 2004) não corresponde à forma I e sim à forma II (anidra). Considerando

que este fármaco geralmente é utilizado como suspensão da sua forma cristalina, estes resultados indicam que a forma II também pode ser utilizada, já que ocorre a interconversão para a forma I em meio aquoso.

Em conclusão, os experimentos de permeabilidade, propostos nesta dissertação, utilizando mucosas suínas e soluções tampões aquosas, foram conduzidos com segurança, sem que tenham ocorrido interferências nos parâmetros biológicos avaliados, devido ao provável polimorfismo do AT testado.

REFERÊNCIAS

BECKET, G.; QUAH, S.B.; HILL, O.J. A DSC compositional of some binary organic mixtures of pharmaceutical significance. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v.40, p.537-542, 1993.

BRUNI, G.; AMICI, L.; BERBENNI, V.; MARINHAND, A.; ORLANDI, A. Drug excipient compatibility studies. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v.68, p.561-573, 2002.

BRITISH PHARMACOPEIA. London: The Stationary Office, 2006.

MOFFAT, A.C.; OSSELTON, M. D.; WINDDOP, B. **Clarke's analysis of drugs and poisons: in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material**. 3. ed. London: Pharmaceutical, 2004. p. 1473-1474.

MURA, P.; GRATTEI, P.; FAUCCINI, M.T. Compatibility studies of multicomponent tablet formulation. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v.68, p.541-551, 2002.

NATHER, C.; JESS, I. New news about an old drug: investigations on the polymorphism of triamcinolone acetonide. **Angewandte Chemie, International Edition England**, v.45, p.6381-3, 2006.

USP 30. **The United States Pharmacopeia**. 30. ed. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention, 2007.

APENDICÊ C - VALIDAÇÃO DAS METODOLOGIAS ANALÍTICAS CLAE E EC UTILIZADAS NESTA DISSERTAÇÃO

A necessidade de se mostrar a qualidade de medições químicas, através de sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade, está sendo cada vez mais reconhecida e exigida. Dados analíticos não confiáveis podem conduzir a decisões desastrosas e a prejuízos financeiros irreparáveis. Para garantir que um método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve sofrer uma avaliação denominada validação. A validação de um método é um processo contínuo que começa no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo de todo o seu desenvolvimento e transferência (RIBANI et al., 2004); tendo papel relevante na avaliação e interpretação dos resultados de estudos de bioequivalência, biodisponibilidade, farmacocinética e toxicocinética (SHAH, 2007).

As técnicas de separação, tais como cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e eletroforese capilar (EC), vêm se destacando na química analítica pela capacidade de realizarem análises quali e quantitativas em amostras ambientais, farmacêuticas, biológicas e em alimentos. Assim, estes dois métodos foram utilizados para a quantificação das amostras resultantes dos estudos de permeabilidade e permeação *ex vivo*, e tem sido alvo de procedimentos de validação, seguindo-se parâmetros definidos por órgãos oficiais, tais como ICH (2005), ANVISA (BRASIL, 2003) e INMETRO (2003).

1 PARÂMETROS DE DESEMPENHO ANALÍTICO

1.1 LINEARIDADE

A linearidade é a capacidade de uma metodologia analítica demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado. A legislação vigente recomenda que a linearidade seja determinada pela análise de, no mínimo, cinco concentrações diferentes, e que o critério mínimo aceitável para o coeficiente de correlação (R^2) deve ser igual a 0,99 (BRASIL, 2003), superior ao limite mínimo estabelecido pelo INMETRO (2003), que é de 0,90.

Quando o exame visual do gráfico (sinal *versus* concentração) demonstrar uma relação linear aparente, os resultados deverão ser tratados por métodos estatísticos

apropriados, para determinação do coeficiente de correlação (R^2), intersecção com o eixo Y, coeficiente angular, soma residual dos quadrados mínimos da regressão e desvio padrão relativo. Se não houver relação linear, deve ser realizada a transformação matemática dos dados, até obtenção da mesma (BRASIL, 2003).

O preparo das soluções padrões pode ser realizado de diversas maneiras; neste trabalho optou-se pelo preparo de uma solução mais concentrada (solução estoque), a partir da pesagem do fármaco ou adjuvante. As soluções de trabalho foram preparadas partindo-se da solução estoque, com exceção das situações em que baixas faixas de concentrações foram desejadas. Nesses casos, as diluições da solução estoque envolveriam medições de volume tão pequenas que o erro se tornaria grande e, por isto, optou-se pela realização de diluições seriadas. O tempo de utilização destas soluções (estoque e trabalho) não ultrapassou uma semana, para evitar problemas de estabilidade dos materiais utilizados. O mesmo sistema de solventes dos experimentos de permeabilidade e permeação *ex vivo* foi utilizado para o preparo destas soluções.

1.2 LIMITE DE DETECÇÃO

O limite de detecção é o menor valor de concentração da substância em análise capaz de ser detectado com grau de confiabilidade adequado, porém, não quantificado com precisão e exatidão aceitáveis. Diferencia-se do ruído do equipamento na relação mínima de ruído: resposta instrumental de 1:3 (ICH, 2005; BRASIL, 2003).

Considerando que o método da relação sinal-ruído não é trivial e às vezes subjetivo (já que a curva analítica é construída com a área e não somente o sinal do detector), outras abordagens podem ser utilizadas para o cálculo do limite de detecção e quantificação. Uma delas, que utiliza parâmetros da curva analítica, permite estimar o limite de detecção (LD) através da seguinte equação:

$$LD = 3,3 \times \frac{s}{S}$$

Onde:

s = estimativa do desvio-padrão da resposta, que pode ser a estimativa do desvio-padrão do branco, da equação da linha de regressão ou do coeficiente linear da equação

S = inclinação ou o coeficiente angular da curva analítica

1.3 LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO

O limite de quantificação (LQ) é a menor concentração da substância em análise que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis. Os valores

limites de precisão e exatidão adequados apresentam-se referendados pela literatura (ICH, 2005; BRASIL, 2003; USP, 2003).

Como o método de mediação sinal-ruído também é problemático para a avaliação do LQ, como suporte, pode-se utilizar a seguinte equação:

$$LD = 10 \times \frac{s}{S}$$

Onde:

s = estimativa do desvio-padrão da resposta, que pode ser a estimativa do desvio-padrão do branco, da equação da linha de regressão ou do coeficiente linear da equação

S = inclinação ou o coeficiente angular da curva analítica

1.4 PRECISÃO

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma substância em análise, sendo comumente expressa como desvio padrão relativo ou coeficiente de variação. Ela pode ser estimada em três níveis: repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade (BRASIL, 2003). Apenas a repetibilidade (precisão intra-dia) e precisão intermediária (precisão inter-dia) foram determinadas neste trabalho.

A repetibilidade representa a concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo, com o mesmo analista e mesma instrumentação (BRASIL, 2003). O guia ICH (2005) recomenda que sejam realizadas nove determinações contemplando toda a faixa de calibração, ou seja, três concentrações (baixa, média e alta) com amostras em triplicata, ou um mínimo de seis determinações em amostras contendo uma concentração equivalente à concentração média da faixa de calibração.

A precisão intermediária é a concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou instrumentos diferentes. A ANVISA recomenda um mínimo de dois dias diferentes com analistas diferentes (BRASIL, 2003). A ICH (2005) recomenda que as variáveis estudadas sejam avaliadas conforme as circunstâncias em que o método será utilizado; as variáveis mais comuns incluem dias, analista, equipamento; não sendo necessária a avaliação destas variáveis de forma independente.

1.5 EXATIDÃO

A exatidão reflete a proximidade entre o valor medido e um valor de referência considerado verdadeiro. Pode ser estimada de duas formas: aplicando-se a metodologia proposta em uma substância de pureza conhecida, como por exemplo,

padrões certificados; ou pela comparação com os resultados obtidos utilizando-se uma segunda metodologia, que seja bem estabelecida e com exatidão e precisão conhecidas (BRASIL, 2003). O guia ICH recomenda que a exatidão deverá ser estabelecida ao longo de toda a faixa de calibração especificada para o procedimento analítico somente após a precisão e a linearidade terem sido estimadas. A ANVISA estabelece que a exatidão deverá ser verificada em três níveis de concentração; alta, intermediária e baixa (no mínimo com determinações em triplicata).

Neste trabalho, a exatidão foi avaliada pelo método de adição de padrão, em que se adicionam quantidades conhecidas do analito a amostras resultantes dos estudos de permeabilidade e permeação *ex vivo*, previamente quantificadas. É calculada como porcentagem de recuperação da quantidade de analito adicionado à amostra, ou como a diferença percentual entre as médias e o valor verdadeiro aceito, acrescida dos intervalos de confiança.

1.6 SELETIVIDADE

A seletividade de um método instrumental de separação é a capacidade de avaliar, de forma inequívoca, as substâncias em exame na presença de componentes que podem interferir com a sua determinação em uma amostra complexa. A seletividade avalia o grau de interferência de espécies como outro ingrediente ativo, adjuvantes, impurezas e produtos de degradação, bem como outros compostos de propriedades similares que possam estar, porventura, presentes. A seletividade garante que o pico de resposta seja exclusivamente do composto de interesse (RIBANI, 2004; BRASIL, 2003; ICH, 2005).

Segundo Ribani (2004), a avaliação da especificidade é o primeiro passo no desenvolvimento e validação de um método instrumental, pois se a seletividade não for assegurada, a linearidade, a exatidão e a precisão estarão seriamente comprometidas.

Na avaliação da seletividade dos métodos cromatográfico e eletroforético, utilizados nessa dissertação, comparou-se os resultados analíticos da matriz isenta da substância de interesse com a matriz adicionada dessa substância. Para a evidência de seletividade do método, nenhum interferente deveria eluir tempo de retenção da substância de interesse (no caso da CLAE) ou demonstrar mobilidade semelhante a esta substância (no caso da EC). Adicionalmente, o sistema de detecção por arranjo de fotodiodos, na EC, também foi utilizado para a pesquisa de interferentes em outros comprimentos de onda.

2 RESULTADOS

2.1 LINEARIDADE E ESTUDO DO INTERVALO

Os níveis de concentrações utilizados para a construção das curvas analíticas do AT, CBZ e dos parabenos podem ser visualizados no Quadro 1. Para a quantificação do AT e CBZ utilizou-se CLAE, enquanto que, para os parabenos (MP, EP, PP e BP) foi utilizada a EC. Adicionalmente, a CBZ foi também quantificada por espectrofotometria na região do UV.

Quadro 1: Concentrações de amostras utilizadas para a construção das curvas analíticas

[AT] µg/mL	[CBZ] µg/mL	[PARABENOS] µg/mL
0,0500	0,100	1,000
0,1500	0,200	2,000
0,2500	0,500	4,000
0,5000	1,000	8,000
1,0000	2,000	12,00
2,0000	4,000	15,00
4,0000	6,000	20,00
6,0000	8,000	25,00
8,0000	10,00	32,00
12,000	12,00	40,00
15,000	15,00	
20,000		

A linearidade do método foi avaliada no gráfico que relaciona a razão das áreas (área da amostra/área do padrão interno) *versus* concentrações das amostras. Os resultados são mostrados nas Figuras 1, 2, 3 e 4, bem como na Tabela 1.

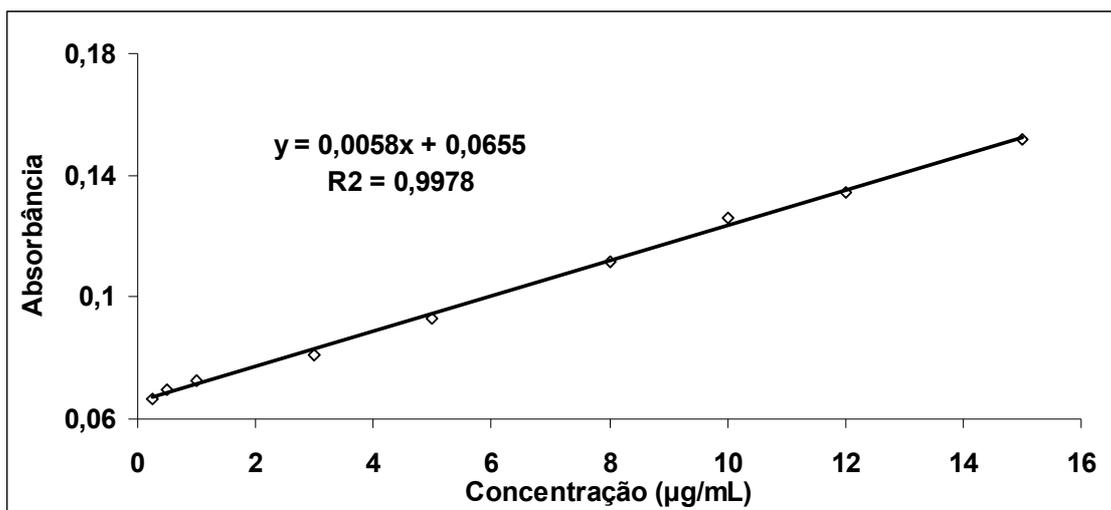


Figura 1: Curva analítica da CBZ (n=3), pós-quantificação por espectrofotometria na região do UV, com sua equação da reta e coeficiente de correlação.

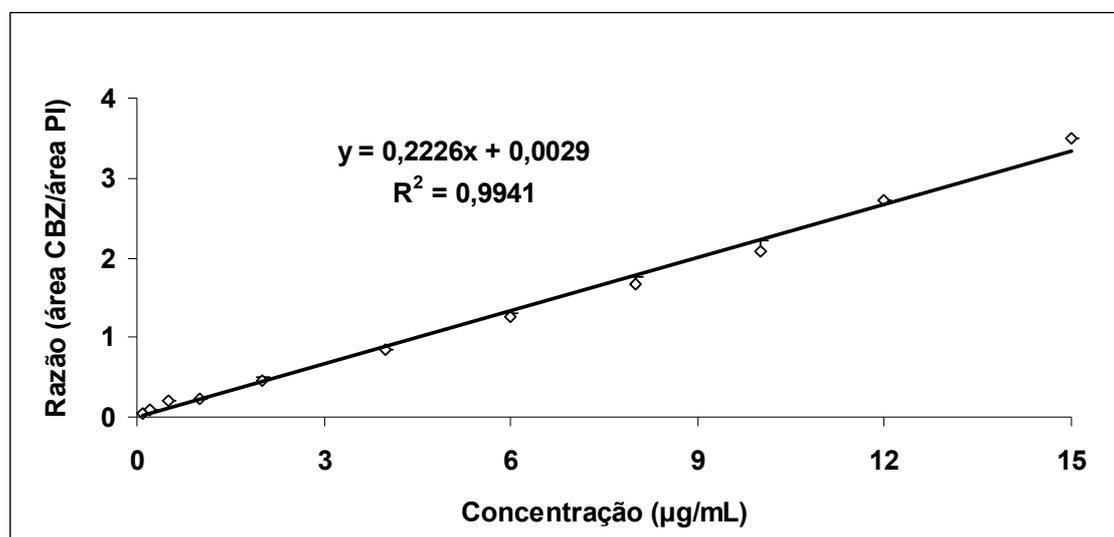
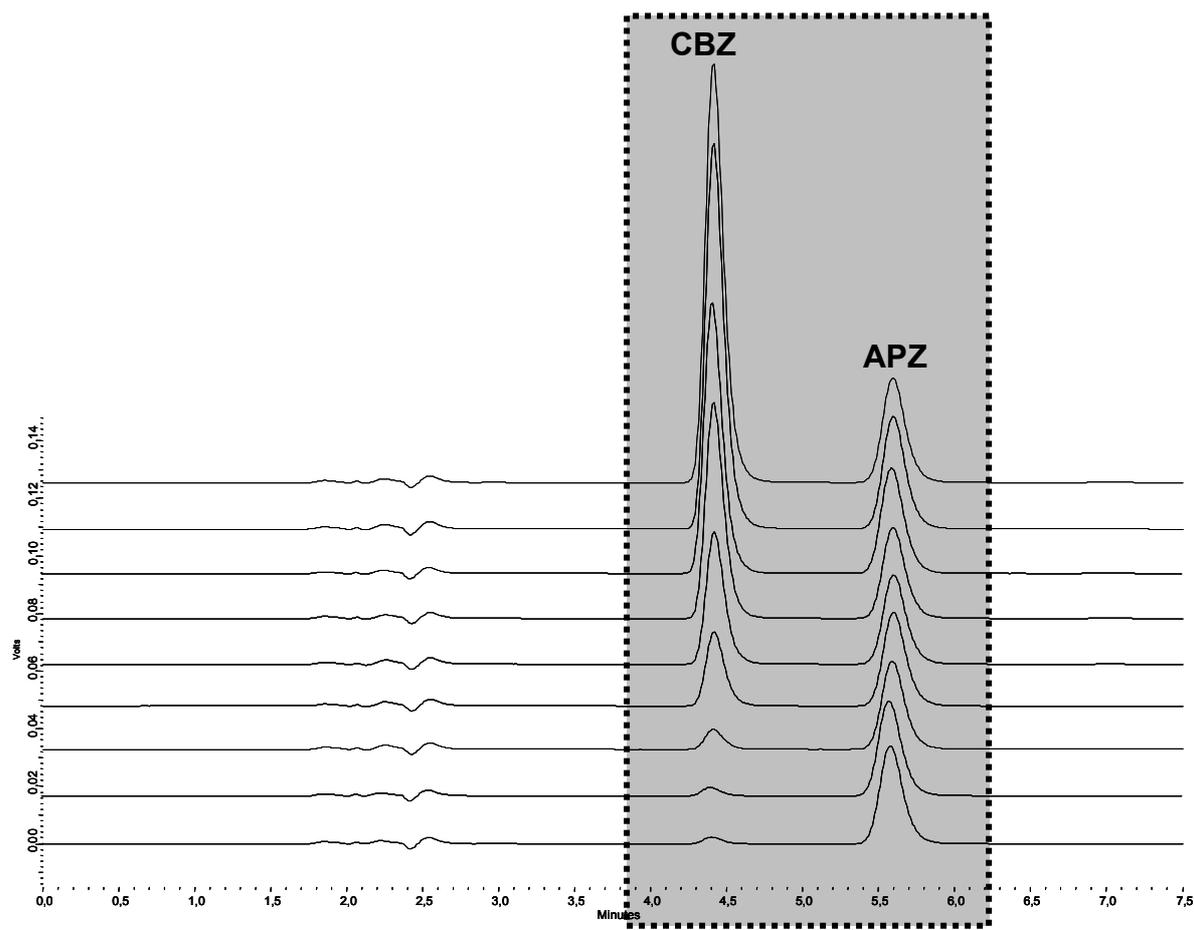


Figura 2: Sobreposição dos cromatogramas obtidos com a quantificação de diferentes concentrações conhecidas de CBZ e curva analítica da mesma (com sua equação da reta e coeficiente de correlação) (n=3).

Condições cromatográficas: Fase móvel: metanol:água (70:30); Fase fixa: C18 - 150x4,6 mm (Kromasil®); Fluxo = 0,7 mL/min; Detecção: UV ($\lambda = 286$ nm); PI = alprazolam.

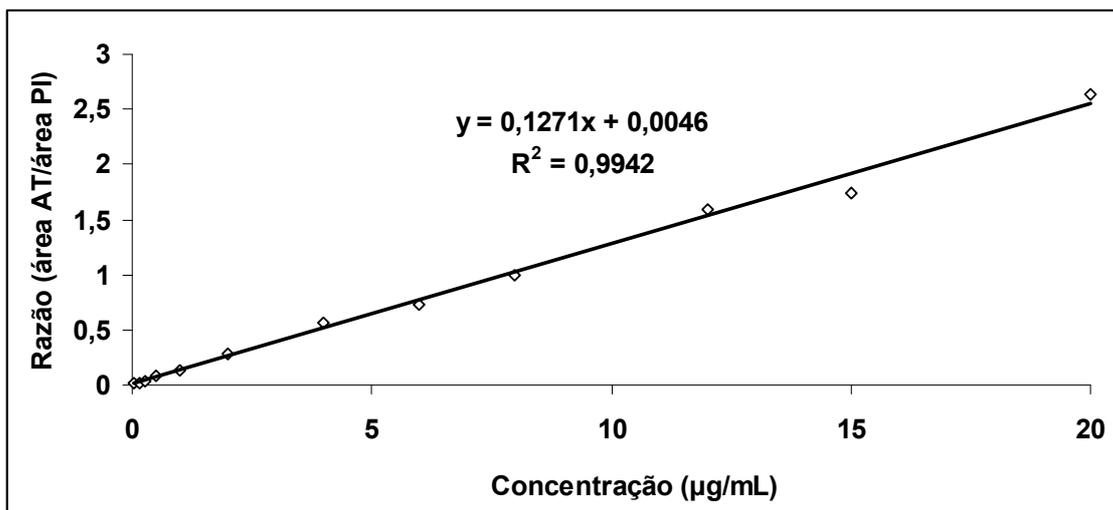


Figura 3: Curva analítica do acetonido de triancinolona ($n=3$), com sua equação da reta ($y = ax + b$) e coeficiente de correlação (R^2). Condições analíticas: Fase estacionária: C18 (300 mm x 4 mm; 5 μ m); Fase móvel: acetonitrila: H₂O (55:45 v/v); Detecção: UV (254 nm); Fluxo: 1 mL/min; PI = prednisolona.

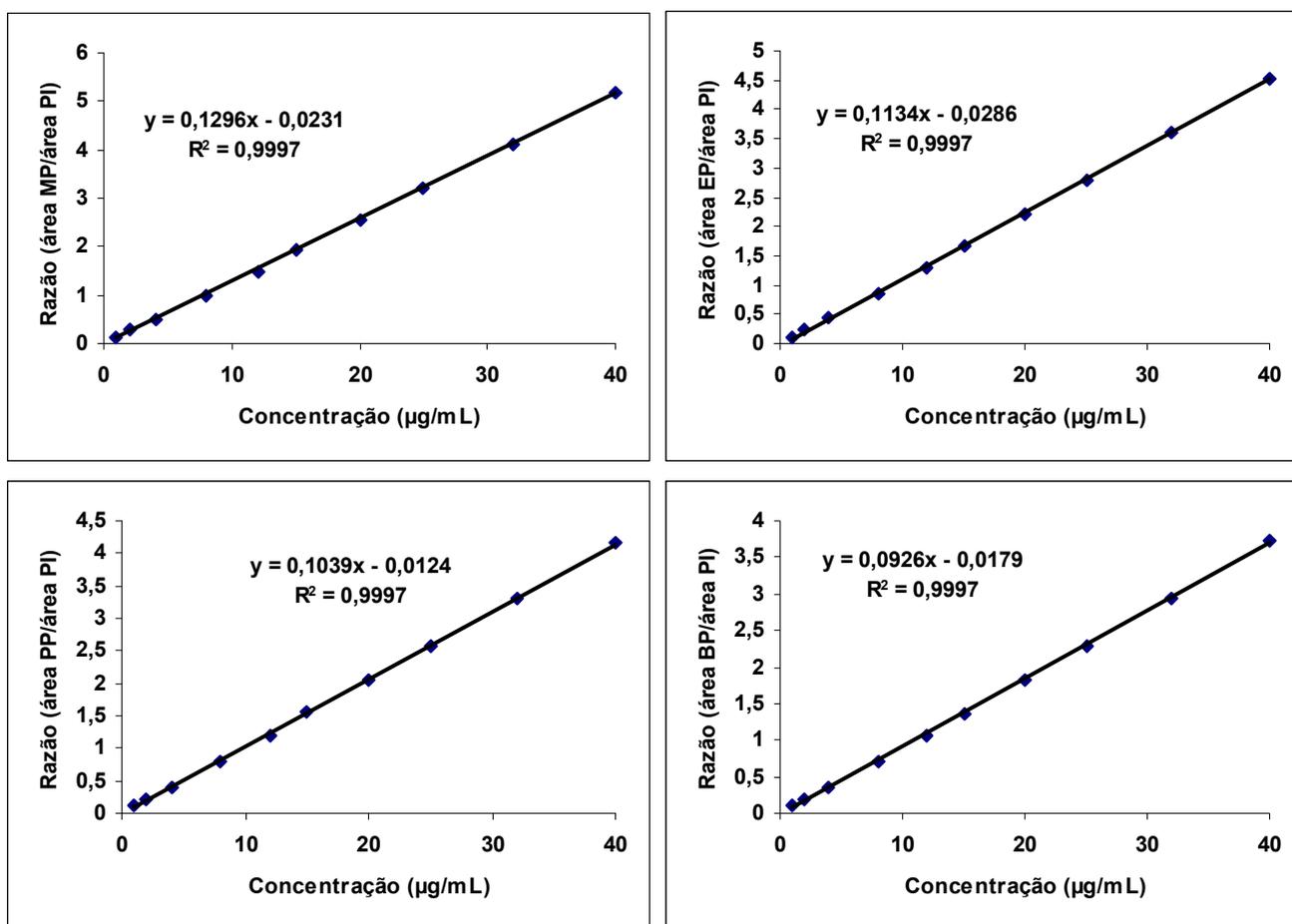


Figura 4: Curva analítica [razão (área do parabenos/ área do PI) *versus* concentração] do metil (A), etil (B), propil (C) e butilparabeno (D), com suas equações da reta e coeficiente de correlação (R^2).

Condições analíticas: capilar, 48,5 cm L_{tot} ; 40 cm L_{det} (50 μ m d.i.); eletrólito de corrida, 30 mmol L⁻¹ tetraborato de sódio (TBS); tensão, 30 kV; polaridade positiva; injeção hidrodinâmica, 50 mbar durante 10 s. PI: ácido 3,5-dinitrobenzóico 20 μ g mL⁻¹. Detecção UV-Vis (λ 297 nm).

Tabela 1: Dados obtidos para a elaboração da equação da reta pelo cálculo da regressão linear por meio do método dos mínimos quadrados para a curva analítica das diferentes amostras

Parâmetros	Acetonido de triancinolona (CLAE)	Carbamazepina (CLAE)	Carbamazepina (UV)	Metilparabeno (EC)	Etilparabeno (EC)	Propilparabeno (EC)	Butilparabeno (EC)
Coefficiente angular (média ± dp)	0,127167 ± 0,009154	0,2226 ± 0,001375	0,0058 ± 0,000141	0,1296 ± 0,001709	0,1134 ± 0,001411	0,103933 ± 0,00132	0,092633 ± 0,001026
Intercepto com o eixo y (média ± dp)	-0,03105 ± 0,175418	-0,0131 ± 0,039081	-11,3058 ± 0,336627	0,1777316 ± 0,1208808	0,2516545 ± 0,1047434	0,11801 ± 0,0962373	0,1921101 ± 0,1047614
R² (média ± dp)	0,995767 ± 0,001943	0,9929 ± 0,00203	0,99705 ± 0,001061	0,999567 ± 0,000153	0,9996 ± 0,0002	0,999567 ± 0,000153	0,9996 ± 0,0002

O estudo do intervalo delimitou a região em que o método comportou-se de forma linear. Cálculos complementares do desvio-padrão relativo (ou coeficiente de variação, em porcentagem) e da exatidão dos níveis de concentrações utilizados, para a construção da curva analítica, auxiliam no estudo deste intervalo. Geralmente, observa-se uma tendência de aumento do coeficiente de variação (CV) com o decréscimo dos níveis de concentração, em função da proximidade com o limite de quantificação. Dos níveis de concentrações selecionados para a construção da curva analítica, apenas o AT teve duas concentrações descartadas (0,0125 e 0,025 µg/mL), em função destes CVs apresentarem valor superior ao limite de 5% estabelecido pela ANVISA (BRASIL, 2003). As curvas analíticas de todas as amostras (parabenos, AT, CBZ) apresentaram, no mínimo, dez níveis de concentrações, considerando a existência de situações de baixa (primeiros intervalos de tempo ou experimentos conduzidos na ausência de p) e alta (últimos intervalos de tempo) permeabilidade nos experimentos *ex vivo*.

Os coeficientes de correlação obtidos, para as curvas analíticas das diferentes amostras, forneceram estimativas favoráveis da qualidade das mesmas, pois os seus valores foram superiores ao limite mínimo estabelecido pela ANVISA ($R^2 \geq 0,99$) (BRASIL, 2003) e próximo de 1, reduzindo a incerteza dos coeficientes de regressão (a e b) estimados.

Considerando-se que o valor do coeficiente de correlação não é suficiente para garantir a adequação do ajuste linear à curva de calibração, outras estratégias podem ser utilizadas, como a análise dos resíduos das diferentes amostras. Modelos de calibração com alto resíduo no sinal analítico ou pontos mal distribuídos ao longo da faixa de calibração poderão fornecer um coeficiente de correlação aceitável, mesmo que uma função linear não seja a melhor descrição para o comportamento entre as variáveis dependente e independente.

O gráfico de resíduos do AT apresentou uma distribuição adequada e homogênea para os oito níveis iniciais de concentrações, com exceção das duas últimas concentrações (10 e 20 µg/mL), que apresentaram variância não uniforme (dados não mostrados). Para os parabenos, todos apresentaram uma distribuição uniforme dos resíduos, principalmente o MP e PP (Figura 5). A CBZ foi a amostra que demonstrou a mais inadequada distribuição dos resíduos (dados não mostrados). No entanto, o ajuste linear simples foi o que forneceu um menor valor para a soma quadrática dos resíduos, sendo o modelo de regressão mais representativo para esta situação.

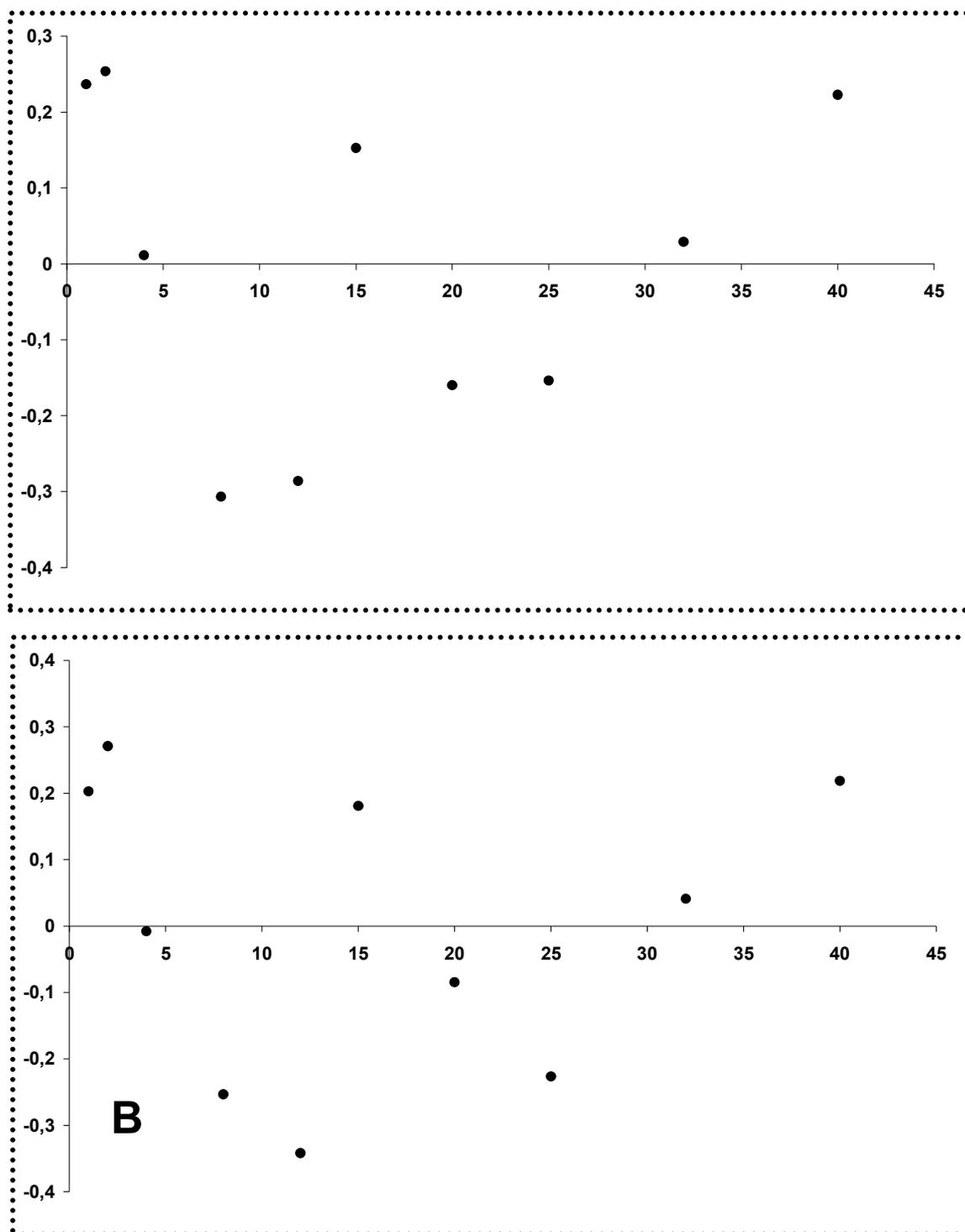


Figura 5: Gráfico dos resíduos para o metil (A) e propilparabeno (B).

2.2 LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO

Com base nos parâmetros das curvas analíticas, os limites de detecção e quantificação de todas as amostras foram estimados (Quadro 2).

Quadro 2: Limites de detecção e quantificação para as diferentes amostras.

Parâmetros da curva analítica	AT (µg/mL)	CBZ (µg/mL)	MP (µg/mL)	EP (µg/mL)	PP (µg/mL)	BP (µg/mL)
Limite de detecção	0,2	0,4	0,4	0,4	0,4	0,3
Limite de quantificação	0,8	1,4	1,2	1,2	1,2	1,1

Para os parabenos, a estimativa dos limites de detecção e de quantificação também foi realizada pelo método do sinal-ruído, com proporções de 3:1 ou 2:1 para o primeiro e de 10:1 para o segundo (Figura 6).

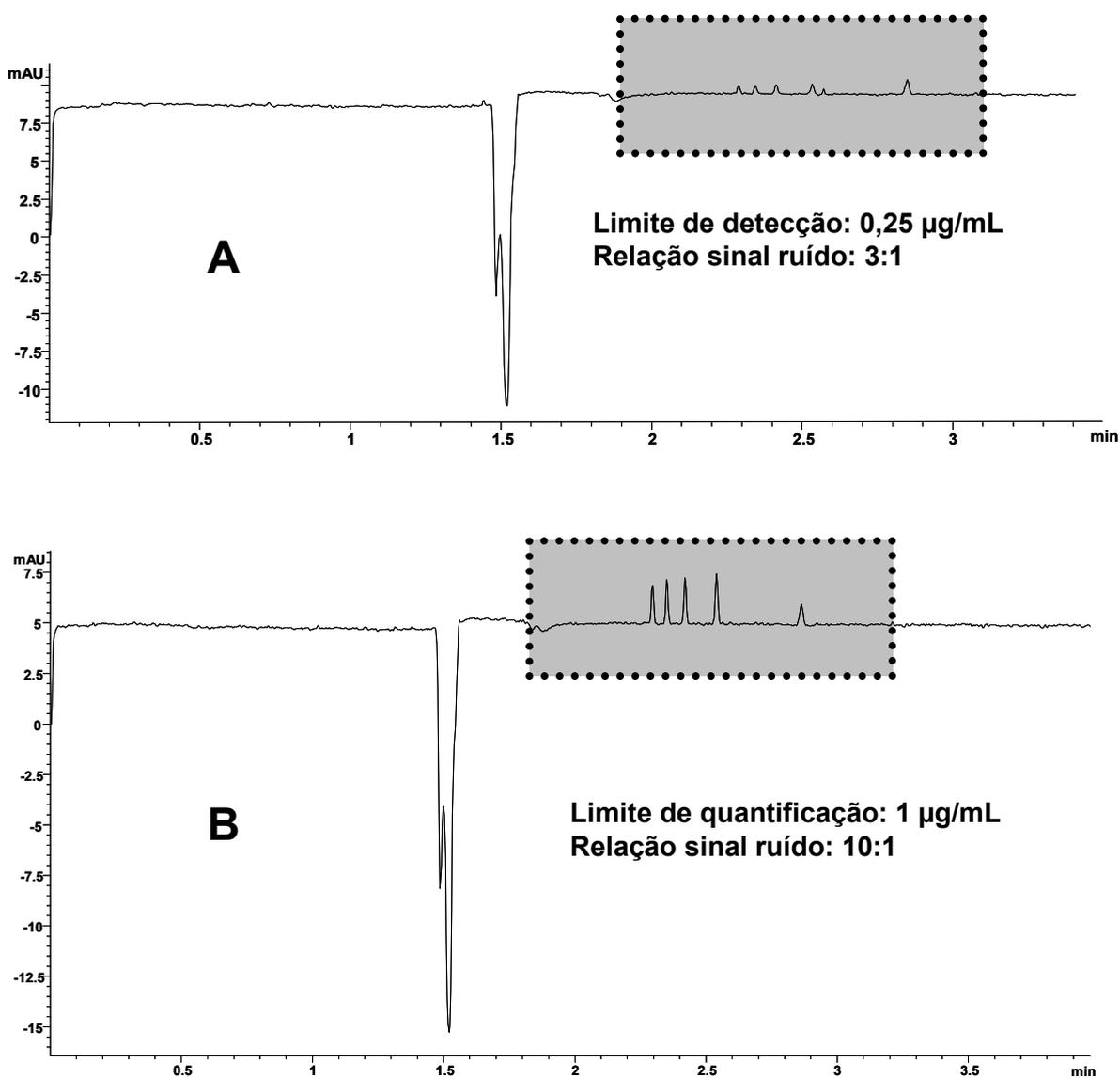


Figura 6: Eletroferogramas dos limites de detecção (A) e de quantificação (B) dos parabenos, após análise pelo método do sinal-ruído.

2.3. PRECISÃO

Os resultados de repetibilidade e de precisão intermediária foram expressos em termos de desvio padrão relativo (DPR) (Tabela 2). A precisão intermediária foi avaliada em três dias consecutivos, com amostras de mesma concentração, com exceção da CBZ. Para as duas metodologias de avaliação da precisão, os valores de DPR foram inferiores a 5, demonstrando repetibilidade e precisão intermediária adequadas para os métodos analíticos em questão (EC e CLAE).

Tabela 2: Valores de desvio padrão relativo da avaliação da precisão intermediária e da repetibilidade dos métodos EC e CLAE, utilizados na quantificação das amostras.

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Dia 1 DPR	Dia 2 DPR	Dia 3 DPR	Média
Metilparabeno				
4	2,968094			
15	1,554583	1,140513	3,223631	1,972909
32	0,627496			
Etilparabeno				
4	0,462302			
15	1,236865	1,67461	2,266973	1,726149
32	0,616334			
Propilparabeno				
4	1,115539			
15	2,131312	1,106052	2,447812	1,895059
32	0,879634			
Butilparabeno				
4	2,739058			
15	1,193816	1,42681	1,729711	1,450112
32	1,017613			
Acetonido de triancinolona				
2	1,622339			
8	1,888177	4,187848	1,879523	2,651849
20	2,396766			
Carbamazepina				
1	2,348226			
6	3,684188	-	-	-
12	0,808372			

2.4 EXATIDÃO

A exatidão foi calculada como a porcentagem de recuperação da quantidade conhecida do analito adicionado a amostra, conforme item 1.5.

Para os parabenos, foram combinadas soluções de amostras, resultantes dos estudos de permeação *ex vivo*, com soluções de concentrações conhecidas dos mesmos. Com base nas quantidades utilizadas e nos resultados prévios da quantificação destas

soluções, avaliaram-se as porcentagens de recuperação (Quadro 3). Todos os valores obtidos encontravam-se dentro dos limites aceitáveis.

Quadro 3: Porcentagem de recuperação do metil, etil, propil e butilparabeno das amostras provenientes de estudos de permeação *ex vivo*.

RECUPERAÇÃO (%)				
Situação 1	Metilparabeno	Etilparabeno	Propilparabeno	Butilparabeno
Repetição 1	94,6514	104,4751	104,5629	116,1534
Repetição 2	88,5929	99,0572	97,3102	107,6621
Repetição 3	91,0166	97,1450	97,3102	106,1900
Média	91,4203	100,2258	99,7277	110,0019
Situação 2	Metilparabeno	Etilparabeno	Propilparabeno	Butilparabeno
Repetição 1	89,5553	97,4361	95,5385	105,0644
Repetição 2	89,1308	96,6913	94,2454	104,5721
Repetição 3	89,0182	97,4361	95,5385	106,1984
Média	89,2348	97,1879	95,1075	105,2783

Nas situações 1 e 2, soluções padrões de concentrações conhecidas (8 µg/mL) foram adicionadas a diferentes amostras, resultantes de estudos da permeação *ex vivo* dos parabenos combinados, analisando-se a quantidade extraída e passível de quantificação por EC.

Com relação à exatidão do AT, avaliada pela adição de soluções padrões deste fármaco na matriz biológica isenta do mesmo, o método permitiu a recuperação de $92,75 \pm 1,37\%$ para a concentração de 2 µg/mL; $98,62 \pm 1,88\%$ para 8 µg/mL e $99,24 \pm 1,43$ para 20 µg/mL, o que caracteriza o método como exato, conforme estabelecido pela ANVISA e pela ICH (variação de $\pm 20\%$).

2.5 SELETIVIDADE

A análise dos cromatogramas e eletroferogramas, em diferentes comprimentos de onda, demonstrou que há separação dos picos de fármacos ou de parabenos dos outros interferentes da matriz.

Resumindo, temos que os métodos bioanalíticos propostos para a quantificação do AT e dos parabenos apresentaram parâmetros de desempenho analítico tais como especificidade, sensibilidade, linearidade, precisão e exatidão satisfatórios, permitindo a utilização destes métodos nos estudos de permeabilidade e permeação *ex vivo* de fármacos

e adjuvantes farmacêuticos. Para a CBZ, o método proposto por Kelman e colaboradores (2007) foi reprodutível, tendo em vista que parâmetros de conformidade do sistema (resolução, fatores de retenção e de alargamento) e de desempenho analítico (seletividade, linearidade estudo do intervalo, repetibilidade, sensibilidade) foram satisfatórios.

REFERÊNCIAS

BRASIL. Resolução R.E. n.899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos”. Disponível em: <<http://elegis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=15132&word>>. Acesso em: 16 jun. 2007.

Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO). Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos, DOQ-CGCRE-008, 2003.

ICH. **Text on Validation of Analytical Procedures Q2(R1)**. 2005. Disponível em: <<http://www.ich.org/cache/compo/276-254-1.html>> Acesso em: jul. de 2007.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, p. 771-80, 2004.

SHAH, V.P. The history of bioanalytical method validation and regulation: evolution of a guidance document on bioanalytical methods validation. **AAPS Journal**, v. 9, p. 43-7, 2007.

APÊNDICE D – ASPECTOS BÁSICOS DO DELINEAMENTO FATORIAL

1. EFEITO ADITIVO E INTERAÇÃO

O significado de efeito aditivo e interação, conceitos básicos da análise fatorial, pode ser melhor compreendido quando se consideram exemplos numéricos. Suponha uma situação simples, em que cada fator apresenta dois níveis (fator A - níveis a_1 e a_2 ; fator B - níveis b_1 e b_2) e as respostas das combinações a_1b_1 , a_1b_2 e a_2b_1 sejam 10, 15 e 12, conforme esquema abaixo.

		Nível de A	
		a_1	a_2
Nível de B	b_1	10 (y_1)	12 (y_2)
	b_2	15 (y_3)	? (y_4)

Se estes valores forem verdadeiros, ou seja, na ausência de variação aleatória, o efeito da mudança do fator B do nível b_1 para b_2 , com o fator A fixo em a_1 , é 5. Se os efeitos forem aditivos, o efeito da mudança de B dos níveis b_1 para b_2 , com A fixo em a_2 , a resposta também seria 5, de modo que, o valor final da variável y_4 seria 17. O efeito da alteração do fator A do nível a_1 para a_2 é 2, independente do nível de B. Em geral, se as respostas apresentadas no esquema acima estiverem livres de erros aleatórios, então $y_2 - y_1 = y_4 - y_3$, caso os efeitos sejam aditivos (Figura 1A). Quando estes efeitos não são aditivos, sugere-se a existência de interação entre A e B (Figura 2A), tendo em vista que uma combinação particular de A com B produz um valor diferente do esperado.

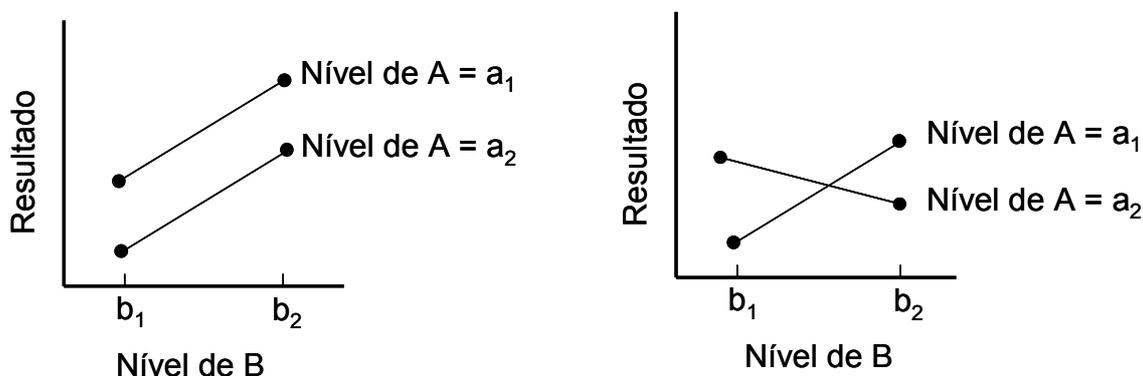


Figura 1: A) Efeitos que são aditivos; B) Efeitos que interagem

Em ambos os gráficos, cada resultado é relacionado com os níveis B e pontos com mesmo nível de A são conectados. Se os efeitos forem aditivos, as linhas serão paralelas conforme gráfico da esquerda. Intersecção entre as linhas é observada quando existe interação entre os efeitos, conforme gráfico da direita.

No entanto, a realidade experimental é confundida pela presença de erros aleatórios. Quando o termo desconhecido assume o valor numérico 17 e prossegue-se a análise da variância, esta torna o valor residual da soma dos quadrados igual a zero. Com a alteração numérica de qualquer outra variável, o valor residual é alterado e torna-se diferente de zero e, neste tipo de experimento, não tem como estimar se o erro é aleatório ou causado pela interação entre os dois efeitos. Este problema pode ser resolvido através da repetição experimental de diferentes combinações dos fatores e, com isto, fica ainda mais clara a importância da triplicata no ponto central, realizada nos experimentos de permeação cutânea dos parabenos associados.

2. DELINEAMENTO FATORIAL E OTIMIZAÇÃO EXPERIMENTAL

O processo que envolve a avaliação dos níveis fatoriais ótimos é conhecido como otimização. Para a avaliação dos fatores e interações dos mesmos que afetam as repostas, pode-se utilizar o delineamento fatorial. Com base no conhecimento do processo, na experiência do pesquisador e em parâmetros físicos são definidos os fatores e níveis a serem avaliados. Por exemplo, se a água é utilizada como solvente, apenas temperaturas entre 0-100°C poderão ser utilizadas e, desta forma, os níveis devem ser definidos dentro desta faixa. A quantidade de fatores e níveis avaliados é que determinará o número de experimentos a serem realizados. No caso desta dissertação, foram considerados três fatores, com dois níveis, caracterizando o delineamento fatorial 2^3 , com oito combinações experimentais (Tabela 1).

Tabela 1: Matriz para um planejamento fatorial 2^3 .

Combinação	A	B	C	Resposta
1	-	-	-	y_1
a	+	-	-	y_2
b	-	+	-	y_3
c	-	-	+	y_4
ab	-	+	+	y_5
ac	+	-	+	y_6
ab	+	+	-	y_7
abc	+	+	+	y_8

Para facilitar a compreensão da maneira como os fatores e suas interações são estimados, apresentou-se o exemplo numérico a seguir.

Em experimentos com cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), a influência de três variáveis (fatores) no parâmetro retenção (k') foi avaliada. Estes fatores foram pH (fator P), a concentração do co-íon (fator T) e a concentração dos solventes da fase móvel (fator C). Foram considerados dois níveis para cada fator e duas réplicas para cada combinação. As respostas médias obtidas para uma destas réplicas são apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2: Respostas obtidas para o parâmetro de retenção

Combinação dos níveis dos fatores	Parâmetro de retenção (k')
1	4,7
p	9,9
t	7,0
c	2,7
pt	15,0
pc	5,3
tc	3,2
ptc	6,0

1 – indica que todos os fatores estão no nível baixo

(a) Efeito dos fatores individuais

O efeito da redução do nível de P pode ser encontrado pelas diferenças médias das respostas, com níveis fixos de C e T. Para esta situação, foram encontrados quatro pares de respostas, e efeitos da variação do nível de P puderam ser estimadas (Tabela 3).

Tabela 3: Efeitos da diminuição do nível de P

Nível de C	Nível de T	Nível de P		Diferença
		+	-	
-	-	9,9	4,7	5,2
+	-	5,3	2,7	2,6
-	+	15,0	7,0	8,0
+	+	6,0	3,2	2,8
				Total = 18,6

Efeito médio das alterações dos níveis de P = $18,6/4 = 4,65$

O efeito médio das reduções dos níveis de T (2,15) e C (-4,85) foi estimado seguindo-se o mesmo raciocínio.

(b) Interação entre dois fatores

Na ausência de interação entre os fatores P e T, a variação na resposta entre os níveis de P deveria ser independente do nível de T. As duas primeiras diferenças obtidas na análise do efeito dos fatores individuais (Tabela 3) consideraram variações da resposta quando o nível de P é reduzido e o fator T é mantido em nível baixo, e a média destas duas diferenças é 3,9 $[(5,2+2,6)/2]$. No caso das duas últimas diferenças, evidenciou-se o efeito da variação de P quando T está em nível alto e a média destas diferenças é 5,4. Na ausência de interação e de erros aleatórios, as estimativas do efeito da variação do nível de P seriam equivalentes. O efeito da interação PT é a metade da diferença das duas médias obtidas anteriormente.

$\text{Efeito da interação PT} = (5,4 - 3,9)/2 = 0,75$
--

Esta quantidade estimada expressa o grau em que os efeitos P e T não são aditivos, ou ainda, o quanto a variação das respostas dos níveis de T é independente do nível de P. As outras interações podem ser calculadas da mesma maneira (efeito da interação CP = -1,95; efeito da interação CT = -1,55).

(c) Interação entre três fatores

A interação PC pode ser particionada de acordo com os níveis de C. Em níveis baixo e alto de C, a interação estimada seria de $(8,0-5,2)/2 = 1,4$ e de $(2,8-2,6)/2 = 0,1$, respectivamente. Na ausência de interação (efeitos são aditivos) entre estes três fatores, bem como de erros aleatórios, as estimativas das interações PT seriam equivalentes. A interação entre os três fatores é estimada pela metade da diferença das médias calculadas anteriormente $[(0,1-1,4)/2] = -0,65$. Supondo que os efeitos da interação PT e de C não sejam aditivos, a interação entre os três fatores poderia ser calculada pela diferença entre a interação estimada de PC para altos e baixos níveis de T, ou ainda, pela da diferença da interação estimada de TC para baixos e altos níveis de P. Estes resultados podem ser sumarizados na Tabela 4.

Tabela 4: Resumo dos efeitos obtidos para um fator único e as diferentes combinações.

	Efeito
Fator único (efeito principal)	
P	4,65
T	2,15
C	-4,85
Interações com dois fatores	
TP	0,75
CT	-1,55
CP	-1,95
Interação com três fatores	
PTC	-0,65

Estes cálculos foram detalhados para facilitar a compreensão dos princípios envolvidos nos estudos de interação. No entanto, algoritmos como o de Yates podem simplificar estes cálculos, tendo maior relevância nas situações em que vários fatores são avaliados simultaneamente.

Para avaliação da significância dos efeitos, a análise da variância (ANOVA) pode ser utilizada, bem como para verificar a adequação do modelo de regressão a um conjunto de dados. Esta análise consiste em um procedimento que decompõe, em vários componentes identificáveis, a variação total entre os valores obtidos no experimento. Cada componente atribui a variação a uma causa ou fonte de variação diferente, e o número de causas de variação depende do delineamento da investigação. Um dos modelos mais simples de ANOVA é o que analisa os dados de um “delineamento completamente casualizado” onde a variação global é subdividida em duas frações – variação entre tratamentos e dentro dos tratamentos. Para que os resultados da ANOVA sejam válidos, é necessário que as variâncias amostrais sejam semelhantes nas diferentes amostras e que os dados apresentem uma distribuição normal.

REFERÊNCIAS

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. **Planejamento e otimização de experimentos**. 2. ed. Campinas: Unicamp, 2003.

MILLER, J.C.; MILLER, J.N. **Statistics for Analytical Chemistry**. 3. ed. London: Ellis Horwood PTR Prentice Hall, 1993.

MONTGOMERY, D.C. **Design and analysis of experiments**. 6. ed. Hoboken: John Wiley, 2005.