

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**

**Faculdade de Farmácia**

**Disciplina de Estágio Curricular em Farmácia**

**ESTUDOS DE PERMEAÇÃO/RETENÇÃO CUTÂNEA *IN VITRO*  
EMPREGANDO PELE SUÍNA PARA COMPARAÇÃO DE DESEMPENHO DE  
FORMULAÇÕES SEMI-SÓLIDAS DERMATOLÓGICAS**

Alianise da Silva Meira

Porto Alegre, novembro de 2010.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**

**Faculdade de Farmácia**

**Disciplina de Estágio Curricular em Farmácia**

**ESTUDOS DE PERMEACÃO/RETENÇÃO CUTÂNEA *IN VITRO*  
EMPREGANDO PELE SUÍNA PARA COMPARAÇÃO DE DESEMPENHO DE  
FORMULAÇÕES SEMI-SÓLIDAS DERMATOLÓGICAS**

Alianise da Silva Meira

Trabalho de Conclusão da Disciplina de Estágio Curricular em Farmácia

Prof<sup>a</sup>. Dr. Nádia Maria Volpato

Orientadora

Porto Alegre, novembro de 2010.

## Sumário

<b>Página de identificação.....</b>	<b>1</b>
<b>Resumo.....</b>	<b>2</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>3</b>
<b>1. Introdução.....</b>	<b>4</b>
<b>2. A pele humana.....</b>	<b>6</b>
<b>3. Rotas de entradas de fármacos através da pele.....</b>	<b>7</b>
<b>4. Produtos farmacêuticos de uso tópico dermatológicos.....</b>	<b>8</b>
<b>5. Pele humana x Pele animal para estudos de permeação cutânea.....</b>	<b>11</b>
<b>6. Terminologia envolvida.....</b>	<b>12</b>
<b>7. Testes <i>in vitro</i> para formas farmacêuticas semi-sólidas.....</b>	<b>13</b>
<b>8. Fatores que influenciam o estudo de permeação <i>in vitro</i>.....</b>	<b>15</b>
<b>8.1 Células de difusão.....</b>	<b>15</b>
<b>8.2 Membranas.....</b>	<b>16</b>
<b>8.3 Temperatura.....</b>	<b>16</b>
<b>8.4 Fluido receptor.....</b>	<b>17</b>
<b>8.5 Duração do experimento e amostragem de tempo.....</b>	<b>17</b>
<b>8.6 Coleta de dados.....</b>	<b>17</b>
<b>9. Exemplo de estudo.....</b>	<b>18</b>
<b>9.1. Experimental: materiais e métodos.....</b>	<b>18</b>
Preparo da pele suína.....	18
Condições Cromatográficas.....	19
Separação das camadas da pele para validação do método analítico.....	19
Procedimento de Extração.....	19
Validação do Método Analítico.....	20
Estudo de Permeação/retenção.....	21
<b>9.2 Resultados e discussão.....</b>	<b>22</b>

Validação do método analítico.....	22
Especificidade.....	22
Linearidade.....	23
Exatidão (recuperação) e precisão.....	23
Estudo de Permeação/Retenção.....	24
<b>10. Conclusões.....</b>	<b>26</b>
<b>Referências.....</b>	<b>27</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>30</b>

**Estudos de permeação/retenção cutânea *in vitro* empregando pele suína para  
comparação de desempenho de formulações semi-sólidas dermatológicas**

**Studies permeation/retention cutaneous *in vitro* using pig skin to compare  
performance of semisolid dermatological formulations**

**Título resumido: Permeação/retenção cutânea *in vitro***

Alianise da Silva Meira<sup>1</sup>, Bethânia Andrade de Vargas<sup>2</sup>, Nádia Maria Volpato<sup>3</sup>

1. Acadêmica do curso de Farmácia, UFRGS, Porto Alegre, RS.
2. Msc Farmacêutica Industrial, Porto Alegre, RS.
3. Docente do Departamento de Produção e Controle de Medicamentos da Faculdade de Farmácia, UFRGS, Porto Alegre, RS.

Autor responsável: Alianise da Silva Meira

E-mail: [alianise@gmail.com](mailto:alianise@gmail.com)

## Resumo

Estudos de permeação/retenção cutânea *in vitro* têm ganhado grande interesse nos últimos anos devido aos benefícios da terapia tópica e à dificuldade de realização dos estudos *in vivo*. Estudos *in vitro* são uma importante ferramenta para avaliar o comportamento de formulações semi-sólidas no que diz respeito à liberação, penetração e absorção do fármaco na pele, sendo úteis tanto no desenvolvimento de novas formulações quanto na avaliação de desempenho de formulações já existentes e, também na comparação de diferentes formulações utilizando um mesmo fármaco. No presente trabalho realizou-se revisão da literatura no que se refere aos principais procedimentos dos estudos *in vitro*. Na parte experimental, determinou-se a validação das condições analíticas para quantificação do fármaco maleato de dexclorfeniramina nas amostras de pele e no fluido receptor. Os estudos de permeação/retenção para as formulações creme e gel do fármaco, foram realizados utilizando célula de difusão tipo Franz com 1,77 cm<sup>2</sup> de área efetiva para liberação, pele suína, temperatura de 32 °C, agitação de 500 rpm, obtendo-se os valores médios de retenção na epiderme quando normalizados pelo peso da pele foram de 0,195 µg/mg para o creme e 1,129 µg/mg para o gel e na derme de 0,039 µg/mg e 0,221 µg/mg para creme e gel respectivamente. Os resultados também são apresentados normalizando a quantidade de fármaco bruto pela área, resultando em 74,14 µg/cm<sup>2</sup> de fármaco para o gel e 15,35 µg/cm<sup>2</sup> para o creme resultando em uma diferença significativa ao nível de 0,1% do fármaco presente nas diferentes camadas de pele quando provenientes das duas formulações. O permeado do fármaco não foi considerado apreciável, do modo que, dados de fluxo no steady state e lag time não foram calculados.

**Palavras-chave:** estudos *in vitro*, permeação cutânea, formulações semi-sólidas, pele suína.

## Abstract

*In vitro* permeation/retention cutaneous studies, have gained great interest in recent years due to the benefits of topical therapy and the difficulty of performing studies *in vivo*. *In vitro* studies are an important tool to evaluate the behavior of semisolid formulations with respect to the release, penetration and absorption of the drug in the skin and, in developing new formulations for the evaluation of performance products. In the present study, it was carried out a literature review in relation to the main procedures for the *in vitro* studies. In the experimental part, it was determined to validated the analytical conditions for the quantification of the drug dexchlorpheniramine maleate in samples of skin and receptor fluid. Studies permeation/retention for a cream and a gel formulations of the drug, were conducted using Franz diffusion cell type with 1.77 cm<sup>2</sup> of effective area for release, pig skin, temperature of 32 °C, agitation of 500 rpm, resulting in the average retention in the epidermis for the cream of 0.195 µg/mg and 1.129 µg/mg for the gel and in the dermis of 0.039 µg/mg and 0.221 µg/mg for cream and gel respectively. The results are also presented by normalizing the amount of the drug by the area, resulting in 74.14 mg/cm<sup>2</sup> of drug for and gel 15.35 mg/cm<sup>2</sup> for the cream producing a significant difference to the level of 0.1% of drug present in the different layers of skin when released from the two formulations. The drug permeate was not considered appreciable so the steady state flux and lag time were not calculated.

**Keywords:** *in vitro* studies, cutaneous permeation, semisolid formulations, pig skin.

## 1. Introdução

A administração de produtos farmacêuticos na pele pode ser dividida em duas categorias: para efeito local e para efeito sistêmico (USP, 2009). Produtos tópicos de ação local ou formulações dermatológicas tratam de doenças nas diferentes camadas da pele ou em apêndices cutâneos; logo, sua eficácia dependerá do tempo em que o fármaco ficará retido e da concentração do mesmo nesses locais. (Ansel, 2007; Pershing *et al.*, 1994; Baby *et al.*, 2008). Por outro lado, produtos de efeito sistêmico necessitam ter assegurada sua absorção percutânea, de modo que o fármaco alcance a circulação em quantidades terapêuticas.

A liberação e penetração de um fármaco na pele dependem, além das condições de integridade do tecido cutâneo, das propriedades físico-químicas da molécula e das características do veículo farmacêutico (OECD, 2004). Assim, por exemplo, para uma retenção na epiderme viável, o fármaco liberado deve vencer a barreira do estrato córneo, sem que haja permeação apreciável para derme com conseqüente absorção sanguínea.

Entre as formas farmacêuticas utilizadas no tratamento tópico da pele estão pomadas, cremes e géis, que são comumente referenciadas como formas farmacêuticas semi-sólidas (Ansel; Allen; Popovich, 2007).

Para a determinação da liberação e previsão da absorção percutânea de produtos dermatológicos, testes *in vitro* estão sendo realizados em substituição aos testes *in vivo*, devido a dificuldade de avaliar a permeabilidade na pele *in vivo*. Conseqüentemente, numerosos modelos *ex vivo* e *in vitro* têm sido empregados para a avaliação da permeação de medicamentos na pele (Godin & Touitou, 2007).

Os estudos *in vitro* constituem uma ferramenta muito valiosa e determinante na avaliação do comportamento de formulações semi-sólidas de uso tópico, diante das



inúmeras variáveis que influenciam o desempenho dos produtos e o processo de fabricação. Através deles, obtêm-se dados que possibilitam um maior entendimento dos fenômenos que ocorrem desde a aplicação na pele, liberação do fármaco da forma farmacêutica, retenção e absorção percutânea.

O modelo mais utilizado para estudos *in vitro* é o sistema de células de difusão, utilizando o modelo vertical proposto por Franz em 1975 (Franz, 1975). No sistema de células de difusão bicompartimentais, pode-se utilizar tanto membrana sintética quanto tecido cutâneo (pele humana ou animal), separando um compartimento doador de um compartimento receptor, para conhecer o comportamento de cedência ou biofarmacêutico de uma formulação, no que diz respeito à penetração e/ou permeação do fármaco (Storpiertis *et al.*, 2009).

Segundo Henning e colaboradores (2009), a pele humana deveria ser utilizada como primeira escolha, sempre que disponível para melhor simular as condições *in vivo*. Apesar de suas vantagens, amostras de pele humana raramente são utilizadas devido à limitação de recursos e questões regulatórias, sendo, desse modo, empregado com maior frequência pele suína (orelha), pele bovina (glândulas mamárias) ou pele de rato, como alternativa.

O modelo de membrana animal mais aceito, em substituição a pele humana, para realização dos testes *in vitro* ou *ex vivo*, é a pele suína (Hadgraft & Lane, 2005; Sartorelli *et al.*, 2000; Godin & Touitou, 2007). Em Sartorelli e colaboradores (2000), o uso da pele de porco para estudos *in vitro* é recomendado devido a semelhança fisiológica à pele humana e boa disponibilidade.

No que se refere à realização dos ensaios *in vitro*, são indicados nas seguintes situações: caracterização do produto na pré-formulação, mudança dos componentes da formulação, controle de qualidade na fase de *scale-up*, para a manutenção das

características da formulação quando da transferência do local de produção e/ou alteração de fornecedor de insumos, para assegurar a “bioequivalência” inter-lotes e nos estudos de estabilidade a longo tempo (SUPACSS, 1997).

Com base no exposto, objetiva-se, por meio de uma revisão bibliográfica discutir o objetivo de realizar testes de permeação/retenção cutânea empregando pele suína, para comparação de desempenho de diferentes formulações dermatológicas, e a possibilidade destes subsidiarem processos de registro de produtos tópicos no Brasil. Objetiva-se também, propor um protocolo experimental pormenorizado para estudos de permeação/retenção cutânea visando auxiliar nos testes de equivalência/bioequivalência farmacêutica de formulações dermatológicas.

## **2. A pele humana**

A pele, além de ser o maior órgão do corpo humano em extensão e em peso é também uma barreira protetora contra ataques físicos, químicos, microbiológicos e de raios ultravioletas, mantém a temperatura corporal, impede a perda de água, além de possuir funções sensoriais (calor, frio, pressão, dor e tato) (Hadgraft *et al*, 2005). Sua composição e espessura variam de acordo com a região do corpo. Devido a sua grande área superficial, pode tornar-se importante porta de entrada de substâncias, em algumas situações de exposição (WHO, 2006).

A pele consiste, entre outras camadas, de epiderme e mais internamente a derme. A epiderme é composta por 5 ou 6 camadas de células queratinizadas, lipídeos e colesterol (Hadgraft *et al*, 2005). O estrato córneo é a camada mais externa da epiderme constituída de células que perderam sua atividade metabólica.

Com espessura de 10 a 15  $\mu\text{m}$ , o estrato córneo é o principal responsável pela função barreira que a pele exerce devido, especialmente, ao arranjo estrutural da matriz lipídica intercelular formada por bicamadas de lipídios que circundam os corneócitos (Godin & Toiutou, 2007). Os componentes lipídicos encontrados na camada intercelular são ceramidas, colesterol, ácidos graxos e esfingolipídios (Moser *et al*, 2001).

A derme contém vasos sanguíneos, linfáticos, terminações nervosas, glândulas sudoríparas e sebáceas e folículos capilares (Moser *et al*, 2001). É o principal suporte nutricional para a epiderme avascular, fornece flexibilidade, atua como uma barreira contra infecções e funciona como um reservatório de água (WHO, 2006).

Entre outras características, a variação da permeabilidade da pele pode ser influenciada por: diferença de espécies, idade, sexo, raça, condições da pele, temperatura e fluxo sanguíneo e hidratação. Além disso, características físico-químicas da molécula como: tamanho, solubilidade e ionização têm uma enorme contribuição na permeabilidade do fármaco (WHO, 2006).

### **3. Rotas de entradas de fármacos através da pele**

A permeação de fármacos através da pele ocorre, inicialmente, pelo estrato córneo. Uma vez atravessado o estrato córneo, a molécula pode permear para camadas mais profundas da epiderme e atingir a derme. Se o fármaco atingir a camada vascularizada da derme, torna-se disponível para ser absorvido pela circulação geral (Ansel; Popovich; Allen, 2007).

O principal transporte de substâncias através do estrato córneo ocorre por difusão para o interior das camadas da pele. Existem três rotas pelas quais uma substância pode penetrar o estrato córneo: difusão através das células (penetração transcelular), difusão

entre as células (penetração intercelular) e por difusão através dos folículos pilosos, glândulas sudoríparas e sebáceas, e anexos pilosebáceos – penetração transanexal (Ansel; Popovich; Allen, 2000).

Sob condições normais a rota de entrada através da penetração transanexal não é muito significativa, ao contrário das rotas transcelular e intercelular que são responsáveis pela maior parte da penetração face a sua grande área superficial. Em 2003, Yamashita e Hashida descrevem a via intercelular como a principal via de penetração de fármacos através do estrato córneo e os apêndices como principais contribuintes para o início da permeação cutânea embora, a diferença de penetração entre as rotas transcelular e intercelular seja de difícil identificação (Hadgraft, 2001; Yamashita & Hashida, 2003).

#### **4. Produtos farmacêuticos de uso tópico dermatológicos**

Medicamentos tópicos têm sido usados há centenas de anos, porém, apenas a partir da década de 60 ocorreu um avanço na compreensão de seu mecanismo de ação (Hadgraft *et al.*, 2005).

Nos últimos anos tem crescido o interesse em medicamentos de aplicação cutânea devido as suas vantagens como, por exemplo, a possibilidade de terapia sistêmica evitando efeito de metabolismo de primeira passagem e minimizando efeitos adversos (Wagner *et al.*, 2001, Henning *et al.*, 2009).

Produtos administrados na pele podem ser divididos em duas categorias: os de efeito local e os de efeito sistêmico.

Produtos de ação local incluem aqueles que têm por função agir no estrato córneo, na epiderme e na derme, ou seja, liberam o fármaco na pele para o tratamento de alterações cutâneas, sendo a pele o órgão-alvo. Produtos que possuem esse tipo de ação são

geralmente de consistência semi-sólida e são representados por pomadas, cremes e géis (USP, 2006; Ansel; Popovich; Allen, 2007).

Dentre os produtos de aplicação na pele para efeito sistêmico, o exemplo mais comum são os sistemas transdérmicos. Um produto transdérmico libera o fármaco através da pele e este deve sofrer absorção para a circulação geral a fim de se obter efeitos sistêmicos. Assim, a pele não é o órgão alvo e sim apenas uma via de ingresso (Ansel; Popovich; Allen, 2007).

A administração transdérmica de fármacos ainda tem muitas limitações, entre elas, o estrato córneo e a sua função barreira. Devido a isso, ainda há um pequeno número de fármacos que sofrem absorção percutânea “completa” e, para que haja eficácia terapêutica a dose diária necessária deve ser de poucos miligramas (Bach & Lippold, 1997).

Segundo Alberti e colaboradores, a eficácia de uma formulação dermatológica depende da disponibilidade do fármaco no local de ação, ou seja, que ele seja liberado em concentrações adequadas no local, no caso a pele, para que ocorra efeito farmacológico (Alberti *et al.*, 2001). Assim, para que um fármaco que se encontra em uma formulação dermatológica torne-se disponível no local de ação, este deve em primeira instância sofrer liberação ou cedência, esta por sua vez dependerá do veículo utilizado e do modo de preparo da formulação. Após a liberação, a penetração através do estrato córneo irá determinar a disponibilidade local do fármaco (Bemvindo, 2006).

Vários métodos *in vivo* e *in vitro* têm sido desenvolvidos para avaliar a absorção percutânea de fármacos de semi-sólidos. Porém, devido à dificuldade de se realizar experimentos *in vivo*, prefere-se experimentos *in vitro* que empregam pele animal ou humana (denominados, por vezes, de experimentos *ex vivo*), com a vantagem de maior

controle e reprodução dos parâmetros de avaliação e possibilidade de correlação *in vitro/in vivo* (Tanojo *et al*, 1996).

Recentemente, a publicação da RDC 48/09, pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA – apontou situações em que deveriam ser realizados testes de permeação cutânea para produtos semi-sólidos, o que tem causado discussões e controvérsias na comunidade farmacêutica. Segundo esta Resolução, deve-se apresentar resultados comparativos entre a taxa de permeação cutânea da condição anterior registrada e da nova condição de manufatura do produto, sempre que houver alteração ou inclusão no local de fabricação do medicamento, mudanças relacionadas ao processo de produção impactem no sistema de liberação do fármaco, alteração ou inclusão de equipamento com diferente desenho ou princípio de funcionamento, alterações nos excipientes, na rota de síntese ou local de fabricação do fármaco, inclusão de nova concentração e forma farmacêutica. Algumas dessas exigências podem ser consideradas, de certa forma, equivocadas, como, por exemplo, a alteração do local de fabricação não deveria implicar alteração maior ou diferença substancial na qualidade do produto farmacêutico.

Considerando que produtos semi-sólidos de ação tópica são produtos isentos de testes de biodisponibilidade no Brasil, segundo a RDC 897/03, talvez seja esse o motivo pelo qual a ANVISA tende a aumentar exigências, incluindo testes de permeação cutânea, que até então costumam ser mais utilizados em pesquisa acadêmica ou na fase de desenvolvimento do produto, para justificar alterações na produção de medicamentos semi-sólidos dermatológicos.

## 5. Pele humana x Pele animal para estudos de permeação cutânea

Estudos de permeação cutânea *in vitro* ou mais corretamente *ex vivo* realizados com células de difusão podem utilizar tanto pele humana quanto pele animal. A pele humana deve ser preferida sempre que disponível, na falta desta, deve-se utilizar membranas animais (Henning *et al.* 2009).

Touitou e colaboradores (2007) sugerem uma escala de modelo animal, que pode ser utilizada em substituição a pele humana para avaliar a permeação percutânea de fármacos, que inclui: primata, rato, porco, porco da índia e cobra.

Entre os tipos de pele citadas, a que mais se aproxima, fisiologicamente, da pele humana é a pele suína. Para Sartorelli e colaboradores (2000) a pele suína é mais recomendada devido sua similaridade à pele humana e a facilidade de obtenção.

Para Sekkat e colaboradores (2002), a espessura da epiderme, a composição lipídica e a permeabilidade a diversos compostos são similaridades significantes que aproximam a pele suína da humana.

Schmook e colaboradores (2001), em estudo de comparação de pele humana e animal (porco e rato), testando quatro diferentes fármacos com polaridades diferentes, concluíram que a diferença na penetração entre a pele de porco e humana depende do composto, fluxo e de sua concentração na pele. Indicam a pele suína como apropriada para estudos de penetração *in vitro* em substituição a pele humana, mas reforçam que não deve-se generalizar a todos os fármacos.

Barbero e Frash (2009), através de uma revisão quantitativa de comparação da permeabilidade da pele humana e de porco, para diferentes fármacos, também concluem que a pele suína é um bom modelo para avaliar a permeabilidade em estudos *in vitro*, em substituição a pele humana. Os autores obtiveram o coeficiente de correlação de

Pearson de 0,88 ao correlacionar coeficientes de permeabilidade *in vitro* obtidos através de pele suína e de pele humana.

Mesmo que a pele animal seja um bom substituto para a pele humana em estudos de permeação, é necessário levar em consideração que a pele animal é mais permeável que a pele humana, de forma que os resultados devem ser avaliados com cuidado para que não haja uma superestimação na absorção percutânea dos compostos na pele humana (Henning *et al.*, 2008).

## **6. Terminologia envolvida**

A penetração cutânea pode ser definida como a capacidade do fármaco atravessar a barreira do estrato córneo para as camadas do interior da pele. O fármaco pode atravessar a epiderme e chegar à derme, podendo ser absorvido pelos vasos sanguíneos ali existentes. A permeação cutânea envolve a penetração cutânea e a absorção dos fármacos pela circulação sanguínea (WHO, 2006). Se todos esses processos ocorrerem, pode-se dizer, então, que o fármaco sofreu absorção percutânea.

Para medida da permeação utiliza-se método *in vitro* por células de difusão, pois estes são considerados os que melhor mimetizam a absorção percutânea *in vivo* (Tanojo *et al.*, 1996).

Devido ao crescente interesse dos estudos de permeação cutânea, várias guias têm sido estabelecidas no intuito de gerar protocolos para que os estudos sejam realizados de maneira correta, de forma que consiga obter uma boa correlação *in vitro/in vivo* (Hadgraft, 2001; Henning *et al.*, 2009). Entretanto, esses guias, oficiais ou não, para experimentos de difusão *in vitro* e *in vivo* resultam de diferentes estudos e muitas vezes são inconsistentes e controversos (Henning *et al.* 2009).



Um exemplo de inconsistência envolve a terminologia, ou seja, a denominação de absorção percutânea, penetração e permeação por essas guias. Há uma gama de nomenclaturas que, na maioria das vezes, são sinônimas e dificultam o discernimento entre um conceito e outro como, por exemplo, a absorção percutânea ou *percutaneous absorption* também chamada de *dermal absorption* e *percutaneous penetration* em guias como WHO (2006), OECD (2004), SCCP (2006) e o próprio Dermal Absorption (2005). A penetração por sua vez, é sinônimo de retenção cutânea e o processo de liberação pode ser também chamado de cedência.

## **7. Testes *in vitro* para formas farmacêuticas semi-sólidas**

Métodos *in vitro* são designados para avaliar a penetração e a subsequente permeação de fármacos através da pele (Hadgraft, 2001). Segundo Godin & Touitou (2007), testes *in vitro* podem refletir dados de biodisponibilidade requeridos para provar que um novo produto é equivalente ao referênci. Isso torna estes testes mais requisitados para avaliar propriedades de penetração de fármacos na pele e seleção de medicamentos para aplicação dérmica ou transdérmica (Schmook *et al.*, 2001).

De acordo com o *Guidance Document on Dermal Absorption* (2004), o aumento do número de estudos *in vitro* para fins de registro de produtos se deve, principalmente, ao fato que métodos *in vitro* possuem um bom prognóstico de correlação *in vivo* para absorção percutânea. Portanto, o método pode consistentemente relacionar dados *in vitro* (ou *ex vivo*) e *in vivo*, diminuindo e economizando no processo de desenvolvimento de medicamentos, além de minimizar o número de estudos em humanos (Godin & Touitou 2007). Segundo a OECD (2004), métodos *in vitro* podem medir a difusão de fármacos através da pele para um reservatório de fluido, podendo

utilizar, ou não, pele. Se pele for utilizada, é possível verificar simultaneamente a difusão e o metabolismo da mesma.

O método *in vitro* mais utilizado para determinação da absorção percutânea é o sistema de células de difusão de Franz (Smith, 1992). O sistema de células de difusão proposto por Franz em 1975, consiste de um compartimento doador e outro receptor, separados pela amostra de membrana (Hadgraft, 2005; WHO, 2006; OECD, 2004; Moser *et al.*, 2001). Assim, conforme o tipo de membrana utilizada pode-se dividir os testes *in vitro* em duas categorias: testes de liberação e permeação em membrana sintética e testes *ex vivo* de permeação ou retenção utilizando membrana biológica, seja ela humana ou animal.

As membranas sintéticas são preconizadas pela FDA para testes de liberação de formas farmacêuticas semi-sólidas *in vitro*. Esta membrana não é propriamente uma barreira para a difusão do fármaco, mas sim um suporte para o produto teste e se encontra em constante contato com o meio receptor (USP, 2006). Entre os tipos de membranas sintéticas, as membranas de acetato de celulose são as mais utilizadas (Hadgraft *et al.* 2005). A membrana de silicone se mostra mais precisa e reprodutível para experimentos de liberação, já a membrana de policarbonato oferece menor barreira a difusão correspondendo em uma maior variação a cada período de tempo amostral (Smith, 1992).

O teste de liberação *in vitro*, sozinho, não deve ser aplicado na avaliação de formulações dermatológicas porque, o objetivo do teste não é necessariamente mimetizar o comportamento *in vivo*, e sim avaliar indicadores de desempenho da formulação, ou seja, partição ou cedência do veículo para o fluido receptor (BemVindo, 2006).

Outro método *in vitro* para avaliação da penetração cutânea superficial é o tape-stripping do estrato córneo. A técnica consiste em fazer sucessivas remoções do estrato

córneo com fita adesiva na área exposta à formulação. É um método simples, barato e menos invasivo, podendo ser utilizado também em experimentos *in vivo* (WHO, 2006).

## **8. Fatores que influenciam o estudo de permeação *in vitro***

Os dados apresentados a seguir são revisões dos guias Dermal Absorption Environmental Health Criteria 235 (WHO, 2006), OECD/OCDE Guideline for the testing of chemicals 428: Skin absorption: in vitro method (2004), SCCP em Basic criteria for the in vitro assessment of dermal absorption of cosmetic ingredients (2006), Topical and Transdermal Drug Products (USP, 2009), EC Guidance on Dermal Absorption (2004), Guidance for Industry Nonsterile Semisolid Dosage Forms SUPACSS (FDA, 1997).

### **8.1 Células de difusão**

As células de difusão vertical são utilizadas para medir a difusão de substâncias químicas através de membranas. Essas células consistem de dois compartimentos sendo um o compartimento doador e outro o compartimento receptor. Entre os compartimentos se deposita a membrana. De acordo com os modelos de células, o compartimento doador pode ser aberto ou fechado, sendo o compartimento fechado mais vantajoso devido à possibilidade do uso de dose infinita.

As células de difusão podem ser classificadas como estáticas ou de fluxo. Nas células de difusão estáticas o volume do fluido receptor é mantido constante (geralmente  $\geq 10$  mL) e a troca do meio é feita somente quando o fluido receptor é repostado no momento da

amostragem. Já as células de fluxo, são caracterizadas pela contínua reposição do fluido.

O modelo de célula mais utilizado para avaliar a permeação de produtos semi-sólidos é a célula de difusão de Franz. O modelo é simples e a amostragem pode ser feita manualmente.

## **8.2 Membranas**

Pode-se utilizar membrana sintética, animal e humana para avaliação da permeação *in vitro*. A escolha do tipo de membrana vai depender do objetivo do teste. Quando se tratar de membrana biológica a pele humana é preferida e na ausência desta, a pele suína é a primeira escolha. A membrana deve estar íntegra e possuir o mínimo de vasos sanguíneos e gorduras.

A membrana pode ser usada em sua totalidade de espessura, ou seja, contendo o estrato córneo, epiderme e derme, ou pode ter a derme retirada parcial ou totalmente. Para pele suína é indicado usar a membrana íntegra devido à dificuldade de retirar a derme e permanecer com a pele intacta. A área mínima de membrana aceita para os testes de permeação é de  $0.64 \text{ cm}^2$ . As membranas podem ser armazenadas por um período de um ano quando sob refrigeração de  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  e envoltas em papel alumínio.

## **8.3 Temperatura**

Sabendo que a permeabilidade é temperatura-dependente, a temperatura da pele deve permanecer a  $32 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ , pois essa temperatura corresponde à temperatura superficial da pele humana. Alguns pesquisadores utilizam a temperatura de  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , mas não a

relacionam ao tipo de célula e sim a temperatura corporal. Nos guias oficiais, para os estudos *in vitro*, a temperatura preconizada é de 32 °C. Assim, deve-se considerar que diferentes modelos de células de difusão possam necessitar de temperaturas diferentes para que se mantenha a temperatura da pele a 32 °C.

#### **8.4 Fluido receptor**

O fluido receptor utilizado não deve afetar a integridade da barreira da pele. Normalmente são indicadas como fluido receptor soluções salinas normais ou isotônicas para fármacos que são solúveis em água. Já para fármacos lipossolúveis uma mistura de etanol:água (50:50) pode ser utilizada.

#### **8.5 Duração do experimento e amostragem de tempo**

O tempo de exposição vai depender das condições de uso do medicamento. Um período de 24 h é normalmente requerido para adequada caracterização da absorção. Para que não ocorra deteriorização das amostras de pele esse tempo não é, normalmente, excedido. Entretanto, a duração pode variar de alguns minutos para produtos enxaguáveis (alguns cosméticos), a um máximo de 24 h para produtos medicamentosos que devem permanecer em contato com a pele, sendo o mais usual o período de 6-8 h.

#### **8.6 Coleta de dados**

A coleta de dados pode ser feita através da avaliação dos seguintes parâmetros: através do estrato córneo por tape stripping, da epiderme sem o estrato córneo, da epiderme com o estrato córneo, da derme e do fluido receptor.

O modo como o pesquisador coleta seus dados depende do objetivo de seu experimento, de modo que, se o objetivo for verificar a retenção cutânea, as camadas da pele devem receber especial atenção, já para permeação o fluido receptor deve ser avaliado.

## **9. Exemplo de estudo**

### **9.1. Experimental: materiais e métodos**

Creme e Gel ambos contendo maleato de dexclorfeniramina – DXPM – a 1%, substância química de referência maleato de dexclorfeniramina, agitador de tubos tipo Vórtex Fanem 251; agitador magnético multipontos com sistema de aquecimento de água circulante acoplado Dist; banho térmico e agitador magnético Velp Scientific – ARE; banho de ultrassom USC 5000 (Unique); Células de Franz Hanson modelo standard 7 mL; manta térmica Velp Scientifica - ARE; filtro de membrana em PVDF 0,45 µm (Millipore); ácido fosfórico 85% (Nuclear1); acetonitrila CLAE (Tedia Brazil); fosfato de potássio monobásico (Nuclear); orelhas de suínos obtidas da Cooperativa dos Suinocultores do Caí Superior (Harmonia, RS).

#### *Preparo da pele suína*

Após o recebimento, as orelhas foram lavadas em água corrente e embaladas individualmente em papel filme e alumínio, respectivamente. Na véspera dos experimentos, as orelhas foram transferidas para refrigerador para descongelar. A pele da parte externa das orelhas foi cuidadosamente descolada com bisturi e o excesso de gordura subcutânea foi retirado com auxílio de tesoura e pinça. Foram cortados segmentos circulares de aproximadamente 3 cm de diâmetro (área efetiva para contato

com formulação é de 1,77 cm<sup>2</sup>) com o cuidado de não utilizar as partes com vasos sanguíneos e marcação.

#### *Condições Cromatográficas*

O cromatógrafo a líquido utilizado foi da marca Shimadzu modelo Class VP, detector UV-VIS SPDM-10AUP, auto-amostrador SIL-10ADVP. As amostras foram analisadas empregando coluna de troca iônica (catiônica) a temperatura ambiente e um volume de injeção de 10 µL. A fase móvel utilizada foi uma mistura de acetonitrila – tampão fosfato pH 3.0. O cromatógrafo operou num fluxo de 2,0 mL/min e a detecção UV foi a 262 nm.

#### *Separação das camadas da pele para validação do método analítico*

Para a validação das condições de extração, foram cortados segmentos circulares de 1,5 cm de diâmetro (1,77 cm<sup>2</sup>) de pele suína, com o cuidado de não utilizar as partes com vasos sanguíneos e marcação. Para separar a epiderme da derme, os segmentos de pele foram submersos em água MilliQ a 60 °C por 45 segundos, e, logo após, a epiderme foi descolada com auxílio do bisturi. A derme foi seccionada em pequenas partes com tesoura e as camadas assim separadas foram transferidas para tubos de ensaio para posterior contaminação e extração (validação e ensaio).

#### *Procedimento de Extração*

O ciclo de extração do fármaco das camadas da pele foi realizado adicionando-se 3,0 mL de acetonitrila: água (70:30) – solvente extrator – a cada tubo de ensaio e levando-se ao ultra-som por 5 minutos, seguido de homogeneização do material por meio de

trituração por 5 minutos, sendo o processo repetido por mais 2 vezes, totalizando 30 minutos de extração por tubo.

#### *Validação do Método Analítico*

O método cromatográfico para análise de DXPM nas camadas da pele foi validado quanto aos seguintes parâmetros: especificidade; linearidade; precisão (intra e inter-dias), exatidão (intra e inter-dias) e limite de quantificação.

A especificidade foi realizada na matriz biológica epiderme e derme e no fluido receptor em contato com a derme para verificação de possíveis interferentes. Segmentos circulares de pele suína foram cortadas ( $1,77 \text{ cm}^2$ ) em seguida separaram-se as camadas epiderme e derme e adicionou-se o fluido extrator (acetonitrila/água) submetendo-as ao processo de extração. Ao final as amostras foram filtradas para vials e levadas para análise no cromatógrafo.

Para avaliação da linearidade, em 3 diferentes dias, foram preparadas soluções de concentrações 5; 25; 50; 75; 100; 150; 200  $\mu\text{g/mL}$  submetidas à leitura no cromatógrafo líquido, em duplicata. A equação da reta e o coeficiente de correlação ( $r$ ) e de determinação ( $R^2$ ) foram determinados por regressão linear e a significância do intercepto foi avaliada (software Excel<sup>®</sup>, Microsoft).

Para a determinação da exatidão (recuperação), amostras de derme e epiderme, devidamente separadas, foram contaminadas com o fármaco em 3 níveis de quantidade conhecidos, baixo, médio e alto que corresponderam, após adição do solvente extrator, a 25, 50 e 100  $\mu\text{g/mL}$  para derme e 8,3; 16,6 e 33,3  $\mu\text{g/mL}$  para epiderme. Cada nível foi preparado em triplicata, em dois dias diferentes.



A precisão do ensaio foi realizada juntamente com o ensaio de exatidão nas duas principais camadas da pele, analisando-se os resultados obtidos a partir das seis determinações. Objetivou-se avaliar a precisão intra-dia e inter-dia.

O limite de quantificação foi estimado com base nos parâmetros das curvas padrão obtidas, sendo o desvio padrão determinado a partir dos valores do intercepto (ICH, 2005; Ribani *et al.*, 2004).

#### *Estudo de Permeação/retenção*

O estudo foi realizado utilizando células de difusão tipo Franz com 1,77 cm<sup>2</sup> de área efetiva para liberação. O compartimento receptor foi preenchido com o meio receptor – tampão fosfato pH 3.0 - degaseificado por sonicação. A pele suína foi disposta na célula entre o compartimento doador e receptor, evitando a formação de bolhas. Acima da pele foi colocado um anel de teflon, de 150 mm de diâmetro interno, que teve seu orifício totalmente preenchido pela formulação em estudo, resultando em aproximadamente 0,2 g de cada formulação (2 mg de DXPM). A formulação foi ocluída por disco de acrílico e o sistema foi fechado com uma garra metálica. O compartimento receptor foi mantido sob agitação (500 rpm) por meio de pequena barra magnética. As células foram mantidas a 32 °C pela circulação de água termostaticada pela camisa dupla das mesmas.

Foram tomadas manualmente alíquotas do compartimento receptor em períodos de tempo pré-definidos: 1, 2, 4, 6 e 8 horas, simultaneamente à reposição de solução receptora.

Os experimentos foram realizados em 3 períodos semanais com alternância de dias para as formulações – um dia para o creme e outro para o gel – de forma que cada formulação teve 3 dias diferentes de análise. A cada análise eram utilizadas 6 células. O

placebo do gel foi aplicado em uma célula, nos dias em que o experimento era conduzido com o gel, para controle confirmatório da especificidade. Assim, foram totalizadas 18 réplicas para a formulação creme e 15 réplicas para a formulação gel. O tempo total de ensaio foi de 8 horas seguindo as recomendações da World Health Organization - Environmental Health Criteria 235 - Dermal Absorption (WHO, 2006).

Ao final do tempo estabelecido, (8 h), as peles foram retiradas das células de difusão e a formulação remanescente foi removida da superfície do tecido com auxílio de pequena espátula e algodão umedecido em água destilada.

Os segmentos de peles foram recortados adequadamente em concordância com a área de 1,77 cm<sup>2</sup> em contato com a formulação. Após procedeu-se a separação das camadas: epiderme e derme com auxílio de bisturi, e estas foram reduzidas a fragmentos, pesadas e transferidas para tubos de ensaio distintos e submetidos ao procedimento de extração descrito anteriormente. Ao final deste procedimento, as amostras filtradas para vials, foram levadas ao equipamento para quantificação da DXPM, sendo injetadas em duplicata. A cada dia de ensaio, foram preparadas curvas padrão com 3 níveis de concentração: 5, 50 e 150 µg/mL em acetonitrila:água (70:30), empregando-se a DXPM substância química de referência.

## **9.2 Resultados e discussão**

### *Validação do método analítico*

*Especificidade:* As condições analíticas empregadas permitiram a resolução adequada da DXPM dos componentes da epiderme, da derme e dos eventuais interferentes difundidos para o fluido receptor, conforme pode ser observado nos cromatogramas.

Figura 1

Em concordância com os resultados obtidos, o método analítico foi considerado específico para a determinação da DXPM, uma vez que se mostrou ausente de interferentes provenientes da matriz biológica (epiderme e derme) e dos fluidos receptores em contato com a pele nas células de difusão por um período de oito horas.

*Linearidade:* O método analítico proporcionou linearidade de resposta da área em função da concentração para as soluções da DXPM na faixa de concentração de 5 – 200 µg/mL. O cálculo da regressão linear gerou uma equação da reta e coeficiente de correlação linear ( $R^2$ ), para cada dia de análise, cujos valores médios são:  $3318,3 \pm 7,35$  para a inclinação,  $1774,23 \pm 655,26$  para o intercepto e coeficiente de correlação linear médio de  $0,9998 \pm 0,000058$ . O valor determinado para o limite de quantificação, em concentração, foi de 2 µg/mL.

*Exatidão (recuperação) e precisão:* Na Tabela 1 podem ser observados os resultados de recuperação obtidos para DXPM extraída da epiderme e da derme. Os valores encontram-se dentro da faixa preconizada pela RDC 899 da ANVISA (Brasil, 2003) para ensaios bioanalíticos, a qual recomenda faixa de 80 a 120% para a recuperação do analito da matriz biológica. Desse modo, a exatidão do método apresentou-se adequada.

Tabela 1

Os valores de DPR para repetibilidade (precisão intra-dia) e para a precisão intermediária (inter-dia) são apresentados na Tabela 2, para cada nível de fármaco adicionado à matriz. Os valores de DPR obtidos tanto para repetibilidade quanto para precisão intermediária foram considerados satisfatórios para método bioanalítico (< 15%, Shah *et al.*, 1992; ANVISA, 2003), caracterizando boa precisão do mesmo para os objetivos do estudo.

Tabela 2

Dessa forma, o método desenvolvido para extração e quantificação de DXPM das camadas de pele suína, se mostrou-se seletivo, linear, exato e preciso e, portanto, adequado para o emprego em estudos de penetração cutânea.

#### *Estudo de Permeação/Retenção*

Os resultados referentes à retenção do fármaco na pele suína, foram quantificados através da separação das camadas da pele como recomendado por Touitou e colaboradores (1998), onde a separação das camadas para o procedimento de extração aumenta, nitidamente, a performance desta técnica. Assim, os resultados obtidos da retenção do fármaco nas camadas da pele são, aqui, apresentados de 2 maneiras:  $\mu\text{g}$  do fármaco bruto em cada camada e  $\mu\text{g}$  de fármaco por  $\text{mg}$  de tecido.

Na Figura 2, estão apresentados os resultados médios expressos como  $\mu\text{g}$  de DXPM bruta em cada camada da pele suína. A soma desses valores expressaria o quantitativo de DXPM como um todo na pele total, em uma área de  $1,77 \text{ cm}^2$ . A normalização pela área resultaria em  $74,14 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  de fármaco retido na pele para o gel e  $15,35 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  para o creme.

#### Figura 2

Considerando que os pesos das duas principais camadas da pele são muito diferenciados, normalizou-se as quantidades brutas pela massa obtida em cada camada, as quais foram pesadas previamente à extração, conforme descrito em 9.1. Para a epiderme obteve-se um valor médio do peso de  $87,21 \pm 19,81 \text{ mg}$  para o creme e  $74,34 \pm 18,07 \text{ mg}$  para o gel e, para a derme os valores foram de  $305,85 \pm 80,73 \text{ mg}$  e  $261,45 \pm 75,92 \text{ mg}$  para as formulações creme e gel, respectivamente. Na Figura 3, estão apresentados os resultados médios, expressos em  $\mu\text{g}$  de fármaco por  $\text{mg}$  de tecido,

obtidos para a DXPM quantificada em cada uma das duas principais camadas da pele, a partir das duas formulações, nos diferentes dias de estudo.

### Figura 3

A análise estatística não paramétrica foi realizada através do teste de Mann-Whitney para os valores da epiderme e derme, tanto na quantidade bruta quanto na quantidade normalizada pelo peso do tecido, indica diferença significativa ao nível de 0,1% ( $p < 0,001$ ) entre as quantidades de DXPM nas distintas camadas provenientes das duas formulações.

Na figura 4, são apresentados valores médios de fármaco quantificado no fluido receptor (quantidade permeada). Em ambas formulações o fármaco começa a ser detectado e quantificado a partir do tempo 4 h no compartimento receptor. Pode-se, também, observar que o gel promoveu maior permeação do fármaco através da pele suína, quando comparado com o creme.

### Figura 4

Análise estatística entre as quantidades permeadas em 6 e 8 h, através do teste de Mann-Whitney (dados não se ajustam à distribuição normal), indicou haver diferença estatística significativa para as medidas (para 6 h:  $p < 0,001$ ; e para 8 h:  $p = 0,025$ ), para as duas formulações.

Outros dados referentes à permeação como fluxo no Steady State, lag time não são aqui considerados, pois a principal avaliação das formulações testadas foi a retenção, uma vez que não houve permeação apreciável.

## 10. Conclusões

Estudos de permeação/retenção cutânea *in vitro* tem se mostrado uma importante ferramenta para avaliação de formulações semi-sólidas no que se refere a verificação da liberação, retenção e permeação do fármaco contido nestas formulações. Para que estes estudos sejam confiáveis, deve se desenvolver e validar a etapa bioanalítica para que se possua um método seletivo e exato para a quantificação do fármaco na pele. A origem e o preparo das peles também devem ser considerados, pois a pele necessita estar em boas condições para que se possam fornecer resultados fidedignos. A célula de difusão vertical tem consolidado seu uso e constitui um bom modelo experimental para avaliação de comparação de formulações semi-sólidas. No que se refere à realização de estudos bioanalíticos empregando permeação cutânea na indústria farmacêutica nacional, estes deveriam ser restringidos a casos especiais de alterações que resultem em potenciais modificações na formulação para comparação da homogeneidade inter-lotes e no desenvolvimento de novas formulações, tendo em vista sua laboriosidade. Na parte experimental, os resultados demonstram que estes estudos podem ser utilizados na comparação de diferentes formulações, uma vez que, é visível a diferença de retenção e permeação do fármaco entre as formulações testadas.

## Referências

- Alberti I, Kalia YN, Naik A, Guy RH. Assessment and Prediction of the Cutaneous Bioavailability of Topical Terbinafine, *In Vivo*, in Man. *Pharmaceutical Research*. 18 (10): 1472-1475, 2001.
- Allen LV, Popovich NG, Ansel HC. Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos. Porto Alegre: Artmed, 2007, cap. 10, p. 301-313.
- Baby AR, Haroutiounian-Filho CA, Sarruf FD, Tavante-Júnior CR, Pinto CASO, Zague V, Arêas EPG, Kaneko TM, Velasco VMR. Estabilidade e estudo de penetração cutânea *in vitro* da rutina veiculada em uma emulsão cosmética através de um modelo de biomembrana alternativo. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas* 44 (2): 233-248, 2008.
- Bach M, Lippold BC. Percutaneous penetration enhancement and its quantification. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 46: 1–13, 1998.
- Barbero AM, Fransch HF. Pig and guinea pig skin as surrogates for human *in vitro* penetration studies: A quantitative review. *Toxicology in Vitro* 23: 1–13, 2009.
- Beer AM, Junginger HE, Lukanov J, Sagorchev P. Evaluation of the permeation of peat substances through human skin *in vitro*. *International Journal of Pharmaceutics* 253: 169–175, 2003.
- Bemvindo CS. Estudo Comparativo da Liberação e Penetração Cutânea de Nitrato de Miconazol de Emulsões Tópicas Comerciais [Dissertação]. Rio de Janeiro: Faculdade de Farmácia, UFRJ; 2006.
- Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 48 de 6 de outubro de 2009. Dispõe sobre a realização de alteração, inclusão, suspensão, reativação, e cancelamento pós-registro de medicamentos e dá outras providências.
- European Commission. Guidance Document on Dermal Absorption, 2004.
- European Commission. Scientific Committee on Consumer Products(SCCP). Basic criteria for the *in vitro* assessment of dermal absorption of cosmetic ingredients. 2006.
- FDA. Guidance for industry Nonsterile Semisolid Dosage Forms (SUPACSS). 1997.
- Franz TJ. Percutaneous absorption on the relevance *in vitro* data. *The journal of investigative dermatology*, 64(3):190-195, 1975.
- Gray GM, Yardley HJ. Different populations of pig epidermal cells: isolation and lipid composition. *Journal of Lipid Research* 16: 441-447, 1975.
- Godin B, Touitou E. Transdermal skin delivery: Predictions for humans from *in vivo*, *ex vivo* and animal models. *Advanced Drug Delivery Reviews* 59: 1152-1161, 2007.

Hadgraft J, Lane ME. Skin permeation: The years of enlightenment. *International Journal of Pharmaceutics* 305: 2-12, 2005.

Hadgraft J. Skin, the final frontier. *International Journal of Pharmaceutics* 224: 1-18, 2001.

Henning A, Schaefer UF, Neumann D. Potential pitfalls in skin permeation experiments: Influence of experimental factors and subsequent data evaluation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 72: 324–331, 2009.

Moser K, Kriwet K, Naik A, Kalia YN, Guy RH. Passive skin penetration enhancement and its quantification *in vitro*. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 52: 103-112, 2001.

OECD. Test Guideline 428: Skin absorption: *in vitro* Method. OECD, Paris; 2004.

Pershing LK, Corlett J, Jorgensen C. *In vivo* pharmacokinetics and pharmacodynamics of topical ketoconazole and miconazole in human stratum corneum. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 38, n. 1, p. 90-95, 1994.

Sartorelli P, Andersen HR, Angerer J, Corish J, Drexler H, Göen T, Griffin P, Hotchkiss SAM, Larese F, Montomoli L, Perkins J, Schmelz M, Van De Sandt J, Williams F. Percutaneous penetration studies for risk assessment. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 8: 133-152, 2000.

Sekkat N, Kalia YN, Guy RH. Biophysical Study of Porcine Ear Skin *In Vivo* and its Comparison to Human Skin *In Vivo*. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 91 (11): 2376-2381, 2002.

Schmook FP, Meingassner JG, Billich A. Comparison of human skin or epidermis models with human and animal skin in *in-vitro* percutaneous absorption. *International Journal of Pharmaceutics* 215: 51–56, 2001.

Shah VP, Flynn GL, Guy RH, Maibach HI, Schaefer H, Skelly JP, Wester RC, Yacobi A. *In Vivo* percutaneous penetration/absorption. *Pharmaceutical Research* 8 (8): 1071-1075, 1991.

Smith EW, Haigh JM. *In vitro* diffusion cell design and validation. II. Temperature, agitation and membrane effects on betamethasone 17-valerate permeation. *Acta Pharm. Nord.* 4 (3): 171-178, 1992.

Storpirtis S, Gonçalves JE, Chiann C, Gai MN. *Biofarmacotécnica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009, cap. 20, p. 212-219.

Tanojo H, Roemelé PEH, van Veen GH, Stieltjes H, Jungmger HE, Boddé HE. New design of a flow-through permeation cell for studying *in vitro* permeation studies across biological membranes. *Journal of Controlled Release* 45: 41-47, 1997.

Touitou E, Meidan VM, Horwitz E. Methods for quantitative determination of drug localized in the skin. *Journal of Controlled Release* 56: 7-21, 1998.



USP. Topical and Transdermal Drug Products. 35(3): 750-764, 2009.

Wagner H, Kostka KH, Lehr CM, Schaefer UF. Interrelation of permeation and penetration parameters obtained from in vitro experiments with human skin and skin equivalents. *Journal of Controlled Release* 75: 283–295, 2001.

World Health Organization. Dermal absorption, 2005.

World Health Organization. Environmental Health Criteria 235 Dermal absorption, 2006.

Yamashita F, Hashida M. Mechanistic and empirical modeling of skin permeation of drugs. *Advanced Drug Delivery Reviews*: 55:1185–1199, 2003.

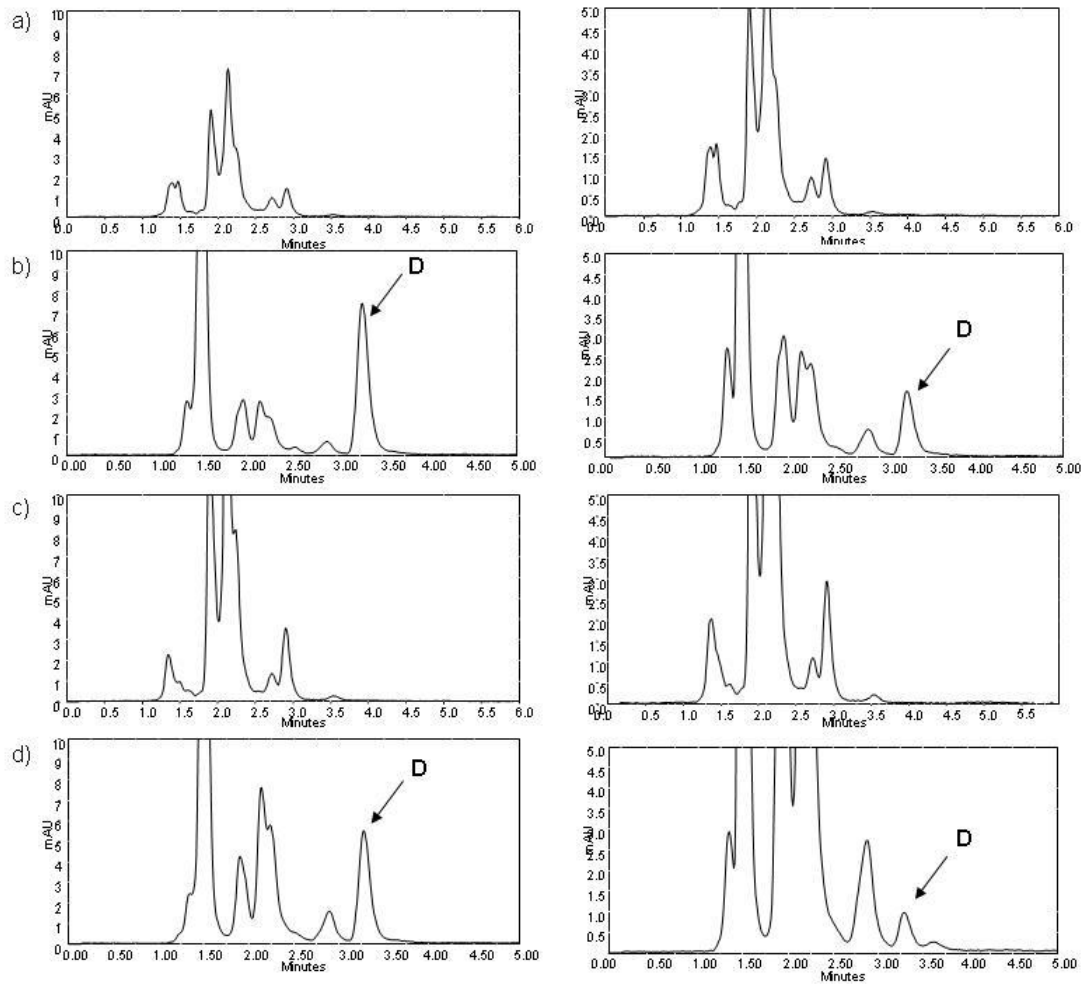


Figura 1. Cromatogramas referentes ao fármaco DXPM indicado pela letra D. As figuras a esquerda referem-se a formulação gel e a direita a formulação creme. a) branco da epiderme; b) DXPM extraída da epiderme; c) branco da derme; d) DXPM extraída da derme.

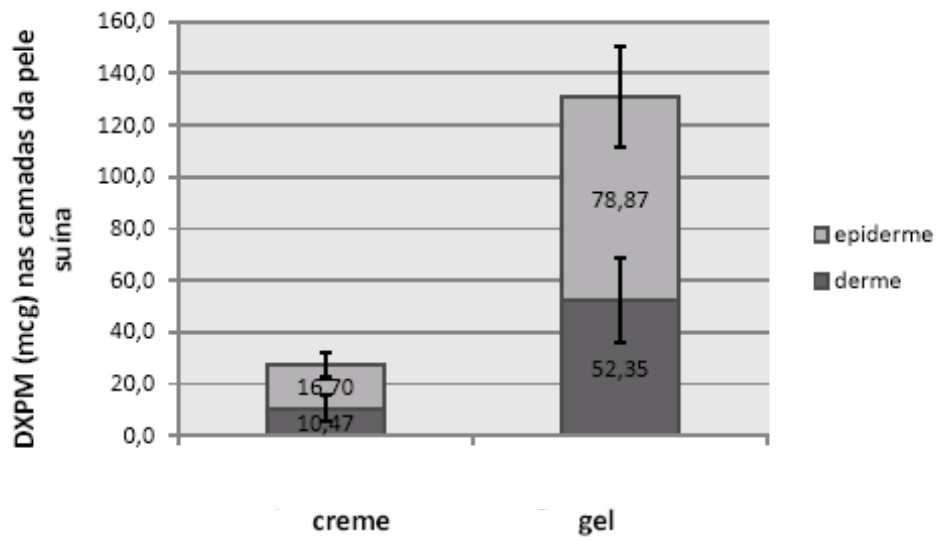


Figura 2. Representação gráfica da quantidade de DXPM (microgramas) nas camadas da pele suína (em 1,77 cm<sup>2</sup>) a partir das formulações creme e gel , após 8 horas de contato; n = 18 para creme e n= 15 para gel; as barras indicam o desvio-padrão obtido.

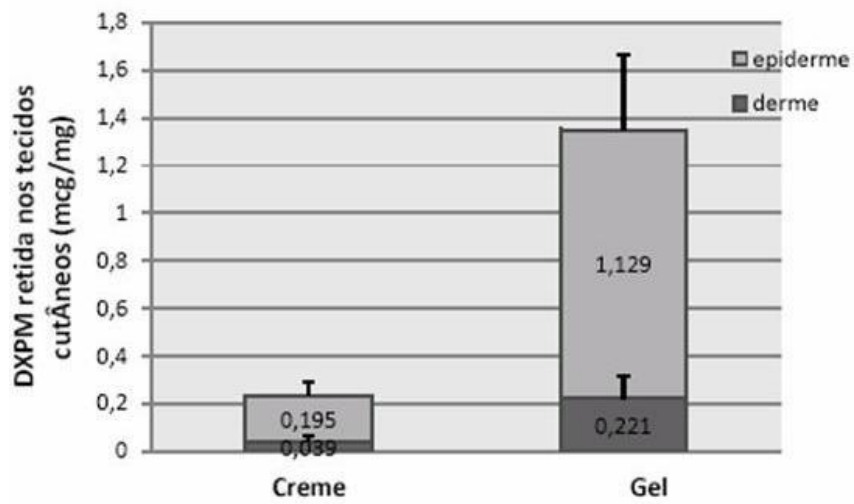


Figura 3. Representação gráfica da quantidade de DXPM ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  de tecido) nas camadas da pele suína (em  $1,77\text{ cm}^2$ ) a partir das formulações em estudo, após 8 horas de contato;  $n = 18$  para creme 15 para gel; as barras indicam o desvio-padrão obtido.

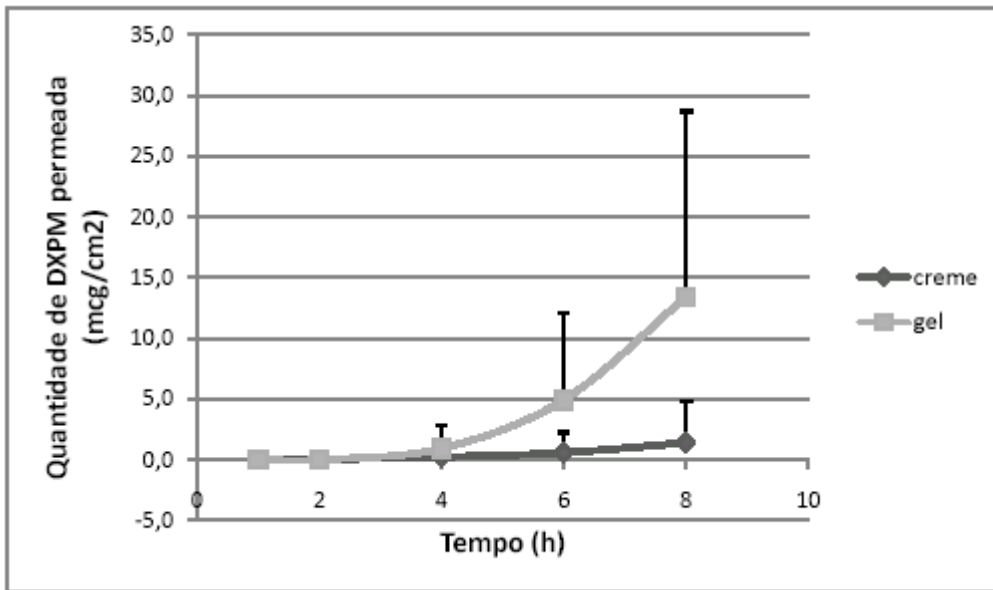


Figura 4. Representação gráfica da quantidade de DXPM permeada através de pele suína, in vitro, das formulações Creme Referência e Gel Teste ao longo de 8 h de estudo (as barras representam o desvio padrão).

**ANEXOS**

## **ANEXO I**

**Proposta de protocolo para estudos de permeação e/ou retenção de fármacos em pele suína**

# **PROPOSTA DE PROTOCOLO PARA ESTUDOS DE PERMEAÇÃO E/OU RETENÇÃO DE FÁRMACOS EM PELE SUÍNA**

## **1. Aquisição da pele**

Obter orelhas suínas de abatedouros regularmente fiscalizados pelo Ministério da Agricultura. Solicitar que o material seja seccionado logo após o sacrifício dos animais e antes do banho de escaldo a que são submetidos na linha de abate. As orelhas devem ser de suínos de até 6 meses de idade, e mantidas sob refrigeração comum até a chegada ao laboratório

## **2. Armazenamento das orelhas e/ou membranas**

As orelhas devem ser lavadas em água corrente, secas com papel absorvente e a pele da parte externa da orelha deveria ser descolada no mesmo dia do abate, de preferência., Cortar a pele em discos do tamanho que serão utilizadas durante os experimentos, embalar em filme de PVC e, posteriormente, em alumínio, retirando ar do interno. Quando não for possível a retirada da pele imediatamente após o recebimento, as orelhas devem ser embaladas individualmente em filme de PVC ou sacos de PE para alimentos e posteriormente em alumínio, para não aderirem umas nas outras. Após esse processo, devem ser armazenadas e congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$ , por, no máximo, 6 meses. O descongelamento deve ser lento e as peles ou orelhas não devem ser imersas em água para acelerar o processo.



### 3. Retirada da pele da orelha

A retirada da pele deve ser feita com auxílio de bisturi e pinça. Primeiro faz-se uma secção a cerca de 2 cm da borda da orelha, após inicia-se a retirada pela parte mais pontiaguda da mesma. Com cuidado, passa-se o bisturi, entre a pele e a cartilagem, observando para que não sejam retirados gorduras e cartilagens, até o final da secção.

### 4. Preparo das amostras de pele

Depois de retirada a pele da orelha, esta deve ser reduzida a menor tamanho resultando nas membranas que serão utilizadas nas células de difusão. Utilizar tesoura cirúrgica de ponta fina e arredondada e auxílio de um molde. As membranas devem possuir um tamanho adequado para o modelo de célula utilizado, ou seja, devem ter uma circunferência que abranja todo o compartimento superior de modo que fique aderida na célula durante todo o experimento. Para o procedimento de validação, as peles devem ser cortadas de acordo com a área de contato com a formulação. A pele pode ser imersa rapidamente em solução salina ou salina tamponada, e o excesso de salina retirado com papel absorvente para favorecer o procedimento de corte, reduzindo a aderência e o enrolamento natural do segmento de pele.

### 5. Separação das principais camadas da pele para validação

Para separar a epiderme da derme, os segmentos de pele são imersos em em água destilada a 60°C por 45 segundos para facilitar a separação das camadas com auxílio de pinça e bisturi.

## 6. Separação das camadas da pele após experimento

Terminado o experimento, as membranas devem ser retiradas das células de Franz, obedecendo a sua numeração. O excesso de formulação deve ser removido suavemente com auxílio de espátula e, em seguida, com pelo menos 2 chumaços de algodão umedecido em água. Após, separam-se as camadas com auxílio de bisturi e pinça sem submetê-las ao processo de imersão descrito no item anterior.

## 7. Extração do fármaco da pele

Para extração do fármaco, deve-se selecionar o fluido extrator de acordo com a solubilidade do fármaco. Adicionar quantidade previamente determinada (entre 1 e 10 mL) às amostras de pele separadas e submetê-las à condição de extração, que pode compreender homogeneização ou trituração do tecido, aquecimento, sonicação ou agitação tipo vórtex. Os processos podem ser únicos ou mistos e empregados em um ou mais ciclos. O tempo para cada operação deve ser previamente definido e validado sendo utilizado igualmente em todos os processos.

## 8. Validando o parâmetro de exatidão

Para verificar a exatidão (recuperação), deve-se previamente definir as concentrações que serão adicionadas nas camadas da pele. Primeiramente submetem-se as peles ao processo de separação para validação. Após, cada camada é contaminada com alguns microlitros de solução padrão com concentração adequada para fornecer determinada

massa de fármaco que impregnará o tecido cutâneo. Deixa-se evaporar o solvente e em seguida adiciona-se fluido extrator e submete-se ao processo de extração.

#### 9. Validando o parâmetro de especificidade

Para verificar a especificidade do método analítico, as amostras de pele devem ser cortadas no tamanho da área em contato com a formulação. Devem-se separar as camadas da pele, adicionar fluido extrator e em seguida submetê-las ao processo de extração, sem haver a contaminação das matrizes com o fármaco em estudo. Para avaliar a especificidade do fluido receptor em contato com as membranas. Na especificidade do fluido receptor as membranas não devem receber a formulação.

#### 10. Preparo da curva padrão

A cada experimento deve ser preparada uma curva padrão com, no mínimo três pontos, para posterior quantificação do fármaco extraído e permeado.

#### 11. Montagem das células de difusão tipo Hanson

As células devem ser montadas individualmente, obedecendo a seguinte ordem:

- acoplar a célula no suporte da plataforma de agitação magnética multipontos;
- introduzir o magneto e em seguida a hélice no compartimento inferior;
- colocar todas as membranas, tendo o cuidado para que estas fiquem bem aderidas nas bordas da célula, de modo que, não se retraiam para o compartimento receptor;
- em seguida, colocar o anel de teflon em todas as células;

- adicionar o produto a ser testado e, a partir desse momento, inicia-se a contagem do tempo;
- concluir a montagem das células com o disco de acrílico e fixar o conjunto com a garra metálica;
- adicionar a cada célula o fluido receptor com auxílio de seringa, cuidando para que não fiquem bolhas, principalmente, na interface da membrana e fluido.

#### 12. Velocidade de agitação do fluido receptor

A velocidade preconizada é de 500rpm.

#### 13. Temperatura do sistema de termostatização das células de Franz.

A temperatura do banho deve ser adequada de modo que a temperatura da pele em contato com o compartimento doador permaneça a 32°C, para isso deve-se avaliar o modelo de célula de difusão utilizado.

#### 14. Fluido Receptor

O fluido receptor deve ser degaseificado (ultra-som ou outro procedimento). Os fluidos mais utilizados são soluções salinas de preferência pH fisiológico, mas no caso de substâncias lipofílicas pode-se utilizar uma mistura de água:etanol (50:50).

#### 15. Tempo de retirada de amostras

O tempo total do experimento não deve ultrapassar 24h. Os tempos de coletas mais usuais são, a cada hora, durante 10 a 12 horas de ensaio.

#### 16. Coleta de dados

A coleta de dados pode ser feita da seguinte maneira: através da separação e quantificação individual de fármaco das camadas da pele e da quantificação da quantidade de fármaco permeada para o fluido receptor. O resultado do permeado é dado em  $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$  e os resultados da retenção podem ser apresentados de três diferentes formas:  $\mu\text{g}$  de fármaco/mg de tecido para cada camada,  $\mu\text{g}$  de fármaco/mg de tecido para a soma das camadas,  $\mu\text{g}$  de fármaco/ $\text{cm}^2$  de tecido.