

Maria João de Jesus Lopes Ferreira

# ESTUDO NÃO INVASIVO DA PERMEAÇÃO DE RODAMINA B EM PELE ATRAVÉS DO MÉTODO DE FLUORESCÊNCIA

Mestrado em Química  
Departamento de Química  
FCTUC

Setembro de 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA



Maria João de Jesus Lopes Ferreira

**Estudo não invasivo da permeação de rodamina B em  
pele através do método de fluorescência**

Dissertação apresentada para provas de Mestrado em Química

Área de especialização em Química Avançada e Industrial

**Orientador:**

Doutor Carlos Serpa

**Co-Orientador:**

Doutor Fábio Schaberle

**Setembro, 2015**

Universidade de Coimbra



## Agradecimentos

Com o finalizar da presente dissertação, que, embora seja um trabalho individual pela sua finalidade académica, há diversos contributos que não podem deixar de ser distinguidos, pois muitas foram as pessoas que me apoiaram e incentivaram, razão pela qual expresso os meus sinceros agradecimentos:

Ao Doutor Carlos Serpa, agradeço-lhe a orientação, ensinamento, ajuda e todo o apoio que sempre demonstrou ao longo destes anos da minha formação como mestre.

Ao Doutor Fábio Schaberle, agradeço-te por toda a ajuda e disponibilidade que sempre ofereceste. Muito obrigada pela compreensão e incentivo, pelos puxões de orelhas que tão importantes foram no meu crescimento e desenvolvimento científico. Se sou a química que sou hoje, em grande parte devo-o a ti.

À Doutora Cláudia Silva, ao Luís Rocha e ao Hélder Soares, pelos ensinamentos, conselhos e disponibilidade em ajudar e esclarecer as mais pequenas questões.

À Angela Correia, Gonçalo Sá e Rita Domingues, pela disponibilidade, instrução, auxílio e incentivo.

Aos meus pais e irmã, agradeço-vos a oportunidade e todos os sacrifícios que fizeram para que este meu sonho se tornasse possível. Obrigada pelo apoio, compreensão e amor com que sempre me presentearam. Sem vocês nada disto seria possível. Um muito obrigada.

Ao meu namorado, a ti João, agradeço por caminhares sempre a meu lado, apoiando me em todos os momentos, por muito difíceis que fossem. Obrigada pela amizade e pelo amor, mas, sobretudo obrigada por toda a paciência que sempre tiveste para comigo.

Aos meus amigos em particular às minhas meninas, agradeço-vos todo o apoio, incentivo e desencaminhamento que também se mostrou fundamental nos momentos em que foi necessário desanuviar a cabeça. Obrigada por toda a vivência e amizade conquistada ao longo destes anos. Que esta amizade persista eternamente.

Despeço-me agora de Coimbra, com um sentimento de saudade e de recordação dos momentos mais belos da minha vida.

## Índice

Resumo.....	v
Abstract.....	vi
Abreviaturas.....	vii
Índice de Figuras.....	viii
Índice de Tabelas.....	xi
<b>Capítulo I – Introdução</b>	
1. Pele e a sua estrutura.....	2
1.1. Epiderme.....	4
1.2. Derme.....	6
1.3. Hipoderme.....	7
2. Difusão de fármacos.....	7
3. Entrega transdérmica.....	8
3.1. Vantagens e Desvantagens.....	9
4. Lei de Fick.....	10
5. Estudos de difusão em pele.....	11
5.1. Células de Franz.....	12
5.2. Meio Receptor.....	13
5.3. Cálculo do fluxo.....	13
6. Formulações tópicas.....	14
6.1. Rodamina B.....	15
6.2. Promotores de absorção.....	18
6.2.1. Azone.....	19
6.3. Polímero gelificante.....	20
6.3.1. Carbopol.....	21
6.3.2. Agente neutralizante.....	21
7. Remoção do gel da pele.....	22
7.1. Tape striping.....	22
7.2. Algodão e etanol.....	23
7.3. Algodão e água.....	23

**Capítulo II – Material, Métodos e Técnicas Instrumentais**

1. Material.....	25
1.1. Reagentes.....	25
1.2. Equipamentos.....	25
2. Métodos.....	26
2.1. Preparação das formulações de rodamina B.....	26
2.2. Preparação da pele de leitão.....	27
2.3. Soluções padrão.....	27
2.4. Preparação das lâminas de pele.....	27
2.5. Extração.....	29
2.6. Estudos de difusão in vivo.....	30
2.7. Quantificação de rodamina B.....	30
2.8. Análise dos dados dos estudos de permeação.....	30
3. Técnicas instrumentais.....	31
3.1. Espectroscopia de absorção.....	31
3.2. Fluorescência.....	32
3.3. Microscopia de fluorescência.....	32
3.4. Leitor de microplacas.....	32

**Capítulo III – Resultados e Discussão**

1. Definição do gel.....	34
2. Estudo exploratório do gel e do aparelho.....	34
3. Otimização do método.....	35
3.1. Otimização do tempo de exposição do gel na pele.....	35
3.2. Otimização do método de remoção do excesso de gel na pele.....	38
3.3. Otimização do tempo de integração.....	41
4. Determinação da quantidade que permeou.....	45
5. Células de Franz.....	49
5.1. Membranas de celulose.....	49
6. Microscopia de fluorescência.....	52
7. Comparação dos três métodos em pele.....	54
8. Determinação dos limites da técnica.....	55

**Capítulo IV – Conclusão**

1. Conclusão.....	59
-------------------	----

1.1. Perspectivas Futuras.....61

**Capítulo V – Bibliografía**

1. Bibliografía.....63



## Resumo

A utilização de técnicas de fluorescência tem aumentado como uma ferramenta de diagnóstico não invasiva, sendo o exemplo com maior impacto a imagiologia de fluorescência. Apesar da utilidade desta técnica ainda não temos disponível metodologias que permitam estudos farmacodinâmicos *in vivo*. Em muitas circunstâncias a quantificação ou quantificação relativa de um fluoróforo ao penetrar na pele poderia ser empregue com vantagem neste tipo de estudos. Para esta finalidade podem ser utilizadas fibras ópticas especialmente conectadas para excitar e recolher fluorescência, permitindo medidas não invasivas.

O presente estudo tem como objectivo otimizar o método de fluorescência usando fibras ópticas e fontes de luz LED para recolher a fluorescência na pele produzida pela permeação de um fluoróforo.

Este estudo iniciou-se com a preparação de géis de rodamina B e posterior medição da permeação do fluoróforo na pele de porco *ex vivo*. A fluorescência será medida e o resultado comparado com outros métodos invasivos para de forma a validá-lo. Os métodos comparativos foram biópsia e extração para quantificação e células de Franz, que nos dão informações sobre a quantidade de composto activo que permeia a pele. Também se avaliou a profundidade de penetração pelo método de microscopia de fluorescência.

Durante este estudo, definiu-se o comprimento de onda de excitação do fluoróforo de modo a que a luz de excitação não interfira com a luz de emissão de fluorescência, de modo a obter uma banda bem definida. Estabeleceu-se uma correlação de quantificação entre a extração, a fluorescência na pele e as células de Franz. Este método revelou-se muito promissor para quantificar a permeação de formulações em estudos com outras moléculas, que possam ser utilizadas em estudos de farmacocinética *in vivo*.

## Abstract

The use of fluorescence techniques has increased as a noninvasive diagnostic tool, with the sample having the largest impact fluorescence imaging. Despite the usefulness of this technique we have still not available methodologies for pharmacodynamic studies *in vivo*. In many instances the quantification or relative quantification of a fluorophore to penetrate the skin could be advantageously employed in such studies. For this purpose optical fibers may be used especially connected to excite and collect fluorescence, allowing noninvasive measures.

This study is aimed to optimize the fluorescence method using optical fiber and LED light sources to collect the fluorescence in the skin produced by the permeation of a fluorophore.

This study began with the preparation of rhodamine B gels and subsequent measurement of the fluorophore permeation in *ex vivo* pig skin. The fluorescence is measured and the results compared to other invasive methods in order to validate it. The comparative methods were biopsy and extraction for quantification and Franz cells, which give us information about the amount of active compound which permeates the skin. It also assessed the depth of penetration by fluorescence microscopy method.

During this study, was defined the excitation wavelength of the fluorophore so that the excitation light does not interfere with the fluorescence emission light in order to obtain a well-defined band. Would also establish a correlation of quantification between the extraction, fluorescence in skin and Franz cells. This method proved to be very promising to quantify the permeation formulations, studies with other molecules that can be used in pharmacokinetic studies *in vivo*.

## Abreviaturas

- A - Azone
- API - *Active Pharmaceutical Ingredients*
- Rh B – Rodamina B
- SC – *Stratum corneum* ou camada córnea
- TEA – Trietanolamina
- $\phi_F$  – Rendimento Quântico de Fluorescência
- $\lambda_{ex}$  – Comprimento de onda de excitação
- $\lambda_{em}$  – Comprimento de onda de emissão

## Índice de figuras

### *Capítulo I- Introdução*

<b>Figura 1.</b> Representação esquemática de um corte transversal através da pele humana, exibindo as diferentes camadas de células.....	3
<b>Figura 2.</b> Esquematização do processo de diferenciação que ocorre na epiderme.....	5
<b>Figura 3.</b> Esquema das três possíveis vias de difusão de fármacos na pele.....	8
<b>Figura 4.</b> Esquema de uma célula de difusão de Franz.....	12
<b>Figura 5.</b> Estrutura química da rodamina B.....	15
<b>Figura 6.</b> Esquema da profundidade de penetração da luz na pele por comprimento de onda em cada camada.....	17
<b>Figura 7.</b> Gráficos de absorção e de fluorescência da rodamina B em etanol.....	18
<b>Figura 8.</b> Ação dos promotores de absorção no domínio lipídico intercelular bem organizado do SC.....	19
<b>Figura 9.</b> Estrutura química da azone.....	20
<b>Figura 10.</b> Estrutura química da TEA.....	22

### *Capítulo II- Material, Métodos e Técnicas Instrumentais*

<b>Figura 11.</b> Aparelho portátil de medir a fluorescência.....	32
---	----

### *Capítulo III- Resultados e Discussão*

<b>Figura 12.</b> Gráfico da intensidade de fluorescência do gel de 1,5% de rodamina B em função de vários tempos de integração.....	35
<b>Figura 13.</b> Gráficos da intensidade de fluorescência dos três géis de rodamina B em três tempos de exposição em pele de leitão.....	37
<b>Figura 14.</b> Gráficos da intensidade de fluorescência do gel de 1% num tempo de incubação de 60 minutos com remoção do excesso de gel com tape striping.....	38
<b>Figura 15.</b> Gráficos da intensidade de fluorescência do gel de 1% num tempo de incubação de 60 minutos com remoção do excesso de gel com algodão embebido em água.....	39

<b>Figura 16.</b> Gráficos da intensidade de fluorescência do gel de 1% num tempo de incubação de 60 minutos com remoção do excesso de gel com algodão e etanol.....	39
<b>Figura 17.</b> Gráficos da intensidade de fluorescência em função da concentração dos três géis.....	42
<b>Figura 18.</b> Gráficos da intensidade de fluorescência em função do tempo de integração dos três géis.....	43
<b>Figura 19.</b> Gráfico da intensidade de fluorescência em função da concentração de rodamina B em cada gel.....	44
<b>Figura 20.</b> Gráfico da média da intensidade de fluorescência das três repetições de cada um dos três géis.....	45
<b>Figura 21.</b> Gráfico da média da intensidade de fluorescência das três repetições de cada um dos três géis com erro. $\lambda = 585\text{nm}$ .....	46
<b>Figura 22.</b> Curva de calibração e respectiva tabela.....	46
<b>Figura 23.</b> Gráfico da intensidade de fluorescência em função da concentração de rodamina B.....	48
<b>Figura 24.</b> Gráfico da intensidade de fluorescência em função da quantidade de rodamina B que permeou a pele com respectivos erros.....	48
<b>Figura 25.</b> Gráfico representativo do perfil de libertação da rodamina B para a membrana de celulose de cada um dos três géis com diferentes concentrações de API durante 6 horas.....	50
<b>Figura 26.</b> Gráfico da quantidade de rodamina B que permeou a pele na extração e que foi libertada nas células de Franz.....	52
<b>Figura 27.</b> Imagens obtidas através do microscópio de fluorescência.....	53
<b>Figura 28.</b> Gráfico da intensidade de fluorescência para cada um dos géis de acordo com os resultados obtidos na microscopia de fluorescência com respectivos erros.....	54
<b>Figura 29.</b> Gráfico da intensidade de fluorescência do método não invasivo, da quantidade de rodamina B que permeou a pele e da intensidade de fluorescência medida através da microscopia de fluorescência para cada gel.....	55

**Figura 30.** Gráfico da intensidade de fluorescência do gel de 0,1% num tempo de integração de 200ms para diferentes tempos de incubação.....56

**Figura 31.** Gráfico da intensidade de fluorescência do gel de 0,1% pelo tempo de incubação, num tempo de integração de 200ms.....56

**Índice de tabelas***Capítulo II – Material, Métodos e Técnicas Instrumentais*

<b>Tabela 1.</b> Constituição dos géis de rodamina B desenvolvidos.....	26
---	----

*Capítulo III- Resultados e Discussão*

<b>Tabela 2.</b> Intensidade de fluorescência medida a partir da biopsia e extração de cada um dos três métodos.....	40
--	----

<b>Tabela 3.</b> Critérios para a escolha do melhor método de remoção do excesso de gel da pele.....	41
--	----

<b>Tabela 4.</b> Valores obtidos pela média das três repetições de cada gel para: a intensidade de fluorescência; concentração de rodamina B obtidos através da extracção em etanol; quantidade de rodamina B.....	47
--	----

<b>Tabela 5.</b> Valores de fluxo obtidos através das células de Franz.....	51
---	----





# Capítulo I

## *Introdução*

## 1. Pele e a sua estrutura

A pele é um órgão vital, pois garante o equilíbrio com o meio externo através de relações homeostáticas de trocas de substâncias fundamentais para o corpo humano [1]. É o maior órgão do corpo humano, tendo um peso total estimado de 5 kg, e uma superfície de cerca de 2 m<sup>2</sup> para seres humanos adultos [2].

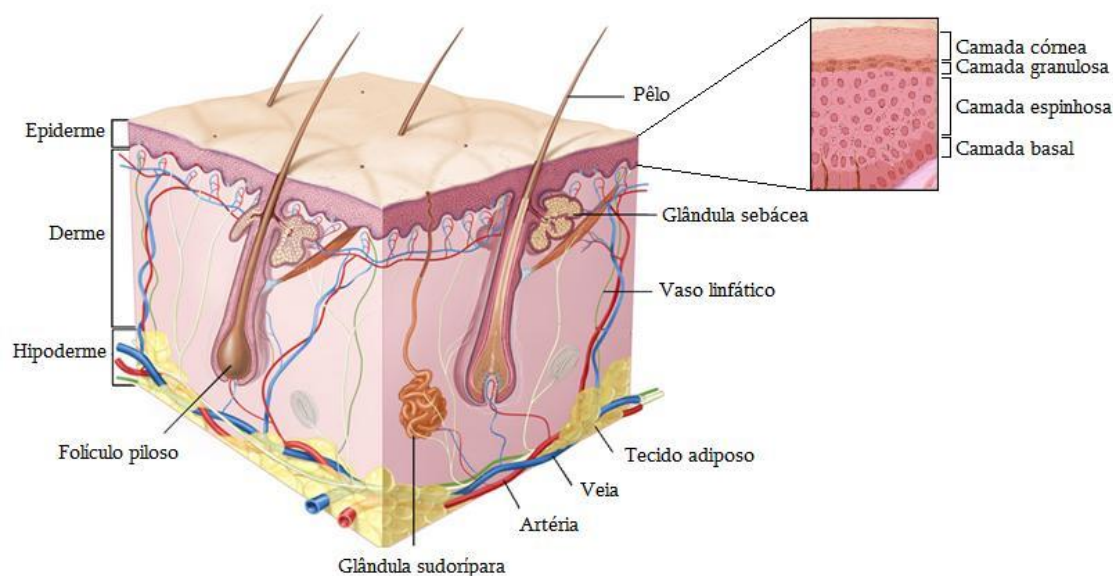
Muitas das funções da pele permitem clarificar a sua importância como essencial para a sobrevivência dos mamíferos, em particular dos seres humanos, num ambiente relativamente hostil.

A pele presente no corpo humano funciona como um revestimento externo do corpo e exerce variadas e importantes funções tais como a função protectora, que se baseia na sua propriedade de barreira, que permite a sobrevivência dos seres humanos num ambiente de temperatura e teor de água variáveis, assim como na presença de bactérias, fungos e radiação; por outro lado, a pele é também responsável pela manutenção do calor corporal (acção termorreguladora), da pressão arterial e das funções excretoras, sendo por isso considerado o principal agente homeopático. Por último, a pele é o maior órgão sensorial, responsável pela recepção de estímulos exteriores, tais como tácteis, dolorosos e térmicos. Para garantir que todas estas funções são executadas a pele necessita de ser robusta e ao mesmo tempo flexível. Sendo a pele uma barreira por excelência, não é contudo um órgão isolado, e encontra-se associada a muitos sistemas de órgãos, nomeadamente o sistema músculo-esquelético, neurológico, circulatório, endócrino e imunitário [3].

A anatomia da pele é bastante complexa, tendo como principais camadas a epiderme, a derme e a hipoderme (camada subcutânea de gordura) [4]. Para além disso, existem diversos apêndices associados a estas camadas, tais como folículos pilosos, unhas, glândulas sebáceas e sudoríparas, como está representado na figura 1.

A propriedade de barreira da pele consiste na resistência, até certo ponto, à passagem de microorganismos, substâncias químicas e agentes físicos nocivos para o interior do organismo, assim como contraria as perdas excessivas de líquidos e outras substâncias do corpo e ajuda igualmente na manutenção do meio interno. Esta função barreira, exercida pelo SC (*stratum corneum* ou camada córnea) é proporcionada tanto pela constituição das diferentes camadas cutâneas como pelo manto gordo que reveste a sua superfície, essencialmente formado pelas secreções produzidas pelas glândulas sudoríparas e sebáceas situadas na profundidade da pele. A primeira barreira corresponde precisamente a esta

membrana gorda que, por um lado, impede a passagem da água e, por outro lado, exerce um efeito anti-séptico que dificulta a aglomeração de microorganismos. Não obstante, a superfície da pele é permanentemente habitada por milhões de micróbios por centímetro quadrado, sobretudo bactérias e fungos microscópicos que encontram na superfície da pele condições favoráveis para se alimentarem e sobreviverem. Contudo, em condições normais, são microorganismos não patogênicos, ou seja, a sua existência acaba por ser benéfica, já que impedem a união e aglomeração de outros microorganismos perigosos. Já a derme é responsável pela nutrição sanguínea da epiderme e funciona como segunda linha de protecção contra invasões de microorganismos. A regulação homeostática, isto é, o ajuste do equilíbrio do corpo de modo a manter o ambiente interno constante, é assegurada pela camada subcutânea de gordura (hipoderme) [3]. Considera-se que um organismo está em homeostasia quando, por exemplo, a temperatura é estável.



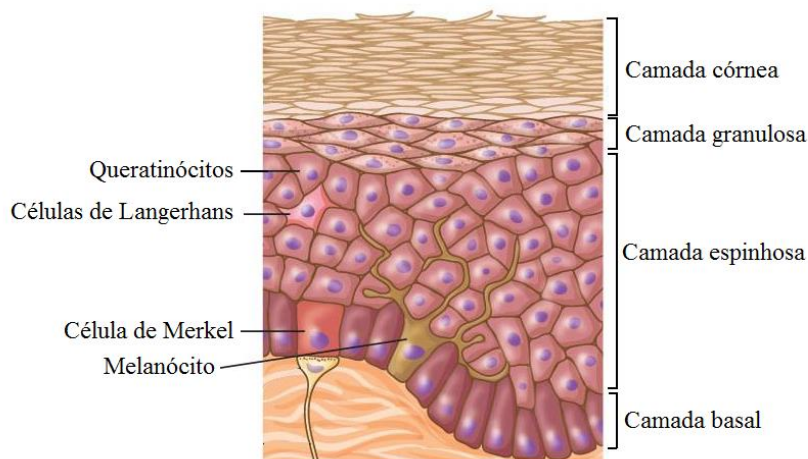
**Figura 1.** Representação esquemática de um corte transversal através da pele humana, exibindo as diferentes camadas de células. Adaptado de [5].

### 1.1. Ediperme

A epiderme é um epitélio pavimentoso estratificado, não vascularizado sobre uma membrana basal, que pode ser subdividida em quatro camadas celulares distintas: a camada córnea; camada granulosa; camada espinhosa e camada basal [6]. É uma camada em contínua renovação, estratificada e cornificada que se situa na zona de contacto com o exterior. Tipicamente a sua espessura varia entre 50-100  $\mu\text{m}$  [7].

A epiderme é constituída por várias camadas de células em diferentes níveis de diferenciação [8] (Figura 2). Estas células da epiderme resultam da diferenciação de uma camada de células mitóticas que se encontram na camada basal. Nesta camada encontram-se melanócitos – responsáveis pela produção de melanina, células de Langerhans – células dendríticas que possuem um papel fundamental na função imunitária, células de Merkel – receptores mecânicos tácteis que se unem aos queratinócitos através dos desmossomas e queratinócitos - células estaminais, metabolicamente activas que têm capacidade de se dividir e produzir novas células, atingindo o estágio final na camada córnea [3]. Na camada basal as células encontram-se pouco diferenciadas e apresentam forma cúbica, multiplicando-se incessantemente. A camada espinhosa é constituída por células mais achatadas, mais queratinizadas que na camada basal. Esta camada está localizada no seguimento da camada basal com queratinócitos com núcleo, que não se dividem, apenas produzem queratina. As células da camada granulosa são morfológicamente mais planas que as suas precursoras, podendo ainda verificar-se a presença de núcleo. Estas células produzem alto teor em queratina, assim como polissacarídeos, glicoproteínas e lípidos [9]. A camada córnea é a camada mais externa da epiderme, constituída por células mortas, sem núcleo e com enorme quantidade de filamentos, nomeadamente de uma proteína altamente insolúvel, a queratina.

À medida que se avança até à superfície da pele, o processo de diferenciação nas camadas da epiderme resulta na transformação das células em corneócitos. As mudanças celulares decorrentes incluem extrusão de corpos lamelares, perda de núcleo e aumento de queratina até se obter a camada córnea totalmente formada [10].



**Figura 2.** Esquematização do processo de diferenciação que ocorre na epiderme, iniciando-se na camada basal e terminando na camada córnea. Adaptado de [9].

A epiderme encontra-se diferenciada por duas zonas, a epiderme viável, constituída pelas camadas epidérmicas inferiores e a epiderme inviável, composta pelas células do SC [11]. A camada córnea, também designada por estrato córneo, é a camada mais externa da epiderme, apresentando uma espessura média de 10-20  $\mu\text{m}$ . Normalmente esta camada é constituída por 15 a 25 camadas de queratinócitos, podendo atingir as 100 camadas na palma das mãos e dos pés [12]. Estas células (queratinócitos) encontram-se envoltas num meio extracelular rico em lípidos, e nesta camada são designadas de corneócitos, devido à sua composição interna ser maioritariamente queratina e lípidos. Possuem forma achatada e encontram-se sobrepostos alternadamente.

A matriz extracelular assegura a coesão e adesão entre os corneócitos. Os lípidos desta região são sintetizados nas camadas superiores da epiderme viável e representam o único caminho contínuo para moléculas de reduzida baixa molecular, desde a superfície da pele até à base do SC. Enquanto as membranas biológicas típicas são maioritariamente constituídas por fosfolípidos, os lípidos presentes no SC são compostos na sua maioria por ceramidas, ácidos gordos e colesterol. Estes lípidos encontram-se organizados em bicamadas multilamelares, o que sugere existir uma via de difusão na pele de elevada lipofilicidade, que poderá explicar a menor permeabilidade desta membrana à água, quando comparando com outras membranas biológicas [13].

Nestas estruturas multilamelares, há alternância entre os domínios hidrofílicos e lipofílicos, dificultando a passagem de fármacos por esta camada. No entanto os compostos lipofílicos

atravessam mais facilmente o SC quando comparando com os compostos hidrofílicos, em que a via folicular pode constituir uma alternativa [14].

A camada basal localiza-se entre a epiderme e a derme, e é anteceda pela membrana basal, formada basicamente por colagénio, é semipermeável permitindo a passagem de metabolitos e oxigénio entre as duas camadas da pele [15].

## 1.2. Derme

A derme é a segunda camada da pele, um tecido conjuntivo que sustenta a epiderme e está ligada pela membrana basal. Esta camada dérmica apresenta uma espessura variável entre 1 a 4 mm, sendo a camada mais densa da pele [11]. As poucas células que estão presentes nesta camada são os fibroblastos, células chave da síntese de fibras proteicas, como o colagénio e elastina, principal responsável pela elasticidade da pele, componentes maioritários da derme. Estes dois constituintes formam uma matriz que rodeia as células e as estruturas dérmicas [3]. Na derme encontram-se ainda os vasos sanguíneos – responsáveis pelo transporte de nutrientes e pela termorregulação corporal, assim como pela absorção de substâncias que ultrapassam o SC; os vasos linfáticos – indispensáveis na absorção transdérmica de sistemas coloidais e as terminações nervosas – apresentam apenas funções de integração e coordenação do órgão sensorial. A derme, para além de dar auxílio ao sistema imunológico da epiderme, também desempenha um importante papel na regulação da temperatura, pressão e dor.

A derme é formada por duas camadas de limites pouco visíveis: camada papilar e camada reticular. Na camada papilar estão presentes fibras de colagénio que têm como principal função unir e fortalecer os tecidos, proporcionando o suporte que a pele necessita, isto para além de facilitarem a nutrição das células da epiderme, através dos vasos sanguíneos presentes na camada reticular da derme. A camada reticular, assim como a camada papilar, possuem fibras do sistema elástico, responsáveis, em parte, pela elasticidade da pele. Nesta camada encontram-se ainda, como já referido, vasos sanguíneos, nervos, folículos pilosos, glândulas sebáceas e glândulas sudoríparas [16].

### 1.3. Hipoderme

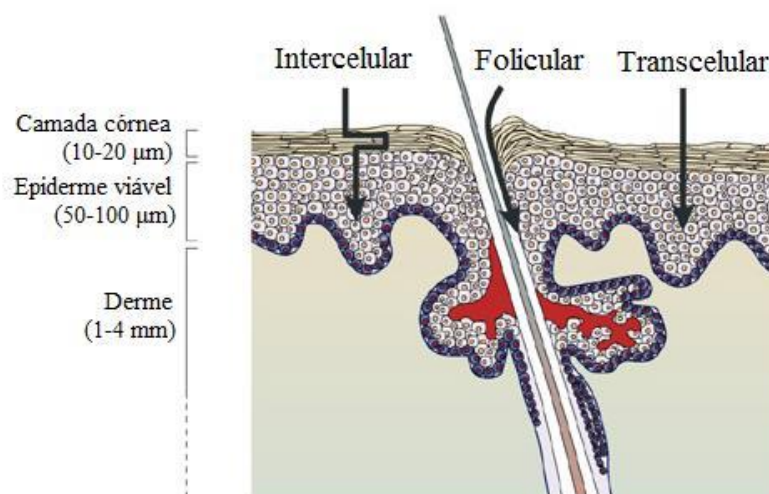
Sob a derme reticular encontra-se a hipoderme – tecido adiposo subcutâneo, a camada mais profunda da pele, que pode ter uma espessura até vários milímetros [11]. Esta camada é constituída por uma rede de células de gordura (possivelmente 50% da gordura corporal) organizadas em lóbulos e conectada à derme através de fibras de colagénio e de elastina. Também fazem parte da sua constituição fibroblastos e macrófagos. Uma das principais funções da hipoderme é transportar os sistemas nervoso e vascular através da pele. No entanto esta camada da pele tem ainda como funções o armazenamento de energia, e o encargo da ligação entre a pele as estruturas subjacentes, tais como o músculo e o osso [3].

## 2. Difusão de fármacos

A difusão de um fármaco através de uma estrutura biológica, como por exemplo uma membrana biológica, é um fenómeno complexo. Esta complexidade deve-se a três factores, sendo eles a natureza não homogénea da membrana lipídica; a taxa de difusão e a solubilidade dos fármacos, uma vez que a solubilidade é fortemente dependente do local de passagem através da membrana. Estes problemas são particularmente agravados em estruturas com uma espessura considerável, como é o caso da pele humana, em que a grande heterogeneidade provoca o transporte através de diferentes vias simultâneas [17].

Os fármacos aplicados na superfície da pele podem permeá-la através da camada superior da epiderme, o SC, ou através de apêndices, como os folículos pilosos e as glândulas sudoríparas [11]. Sendo assim, a difusão de fármacos e outros solutos pela pele pode-se processar por três vias: transfolicular, transcelular e intercelular – figura 3.

A permeação através do SC faz-se essencialmente por difusão passiva (a favor do gradiente de concentração), tanto por via intercelular – via restrita à matriz lipídica, como por via transcelular – através tanto dos corneócitos como dos lípidos da matriz. A permeação ao longo dessas duas vias é portanto dependente da afinidade de um fármaco com ambientes lipídicos, com o ambiente interno do corneócitos e com sua capacidade de permear a parede celular dos corneócitos [11]. A permeação por via folicular ocorre pelos apêndices da pele, mas, no entanto, estes ocupam apenas 0,1% da superfície da pele, o que representa uma diminuta contribuição para a difusão de fármacos [19].



**Figura 3.** Esquema das três possíveis vias de difusão de fármacos na pele. Adaptado de [18].

A difusão de fármacos através da pele favorece a via intercelular, em vez da via transcelular, uma vez que esta última é altamente inacessível a grande parte das moléculas devido ao preenchimento dos corneócitos com queratina. No entanto o movimento de fármacos de maiores dimensões é limitado, uma vez que os espaços livres na estrutura lipídica são inferiores a 50 Å [19].

Deste modo, conclui-se que as três vias garantem a absorção de fármacos na pele, mas esta é condicionada pela função barreira do SC, pelas propriedades morfológicas da pele e pelas características físico-químicas das moléculas, tais como peso molecular, solubilidade e capacidade de criarem ligações de hidrogénio.

### 3. Entrega transdérmica

A entrega transdérmica de fármacos tem dado um importante contributo à medicina, mas, no entanto, ainda é necessário explorar todo o seu potencial para poder competir com as típicas vias de administração, a administração oral de fármacos e as injecções hipodérmicas [20].

A administração transdérmica de fármacos é um fenómeno bastante dificultado, devido à complexidade estrutural da pele. Por um lado, o SC é altamente lipofílico e impermeável para a maioria dos fármacos, representando uma eficaz barreira percutânea, por outro lado



a epiderme viável é predominantemente constituída por um meio aquoso através do qual a permeação dos fármacos é relativamente facilitada [21].

A via transdérmica consiste na aplicação de uma forma farmacêutica sobre a pele com a consequente libertação do fármaco contido nessa forma. Após a permeação cutânea este fármaco pode atingir regiões mais profundas, os tecidos subjacentes ou mesmo a corrente sanguínea para uma acção sistémica [22].

A absorção transdérmica corresponde à entrega de um fármaco na pele e o seu transporte através da corrente sanguínea. Este é um processo que pode ser resumido em três passos: inicialmente ocorre libertação do fármaco a partir da formulação seguida de difusão através do SC; o segundo passo consiste na fragmentação do fármaco a partir do SC até à epiderme viável; por último, ocorre difusão através da epiderme viável e consequente entrada no sistema circulatório [17].

### **3.1. Vantagens e Desvantagens**

A entrega de fármacos para o sistema circulatório através da pele oferece vantagens em relação a outros tipos de administração, uma vez que pode aumentar os benefícios clínicos assim como melhorar a aceitação pelo paciente [23]. A pele representa assim uma área de superfície para absorção de fármacos prontamente acessível com determinadas características: minimiza o primeiro impacto do metabolismo enzimático no fígado; evita dificuldades provocadas pelo pH gastrointestinal, atividade enzimática, interações medicamentosas e alimentares, bebidas e medicamentos administrados por via oral; proporciona uma absorção contínua durante longos períodos de tempo; permite a redução dos efeitos secundários nocivos devido à menor dose administrada; permite uma rápida interrupção da terapêutica, com a sua remoção [24].

No entanto, a administração de fármacos através de entrega transdérmica apresenta também desvantagens, que, em comparação com as suas vantagens, são muito reduzidas, o que torna este sistema bastante viável: a via transdérmica é inadequada para fármacos que provocam irritação ou sensibilização da pele; as doenças cutâneas podem afectar os perfis de distribuição dos fármacos comparativamente com os outros métodos de administração de fármacos, a entrega transdérmica provoca um atraso no início da acção; a difusão através da pele é limitada para moléculas com massa molecular superior a 500 Da; a taxa de

permeação dos fármacos difere consoante o sítio a aplicação assim como do género e da idade de quem a recebe [22].

#### 4. Primeira lei de difusão de Fick

Quando uma formulação tópica é aplicada na superfície da pele, o princípio activo (fármaco) migra para a camada mais interna através do SC e ao longo da epiderme [25]. A permeação do fármaco obedece à primeira lei de Fick (equação 1), onde o fluxo de estado estacionário (J) se relaciona com o coeficiente de difusão do fármaco na camada (D), com a concentração de fármaco contida na formulação que se assume constante ( $C_0$ ), com o coeficiente de partição do fármaco entre a formulação e a camada córnea (P) e com a espessura do caminho de difusão na pele (h):

$$J = \frac{DC_0P}{h} \quad (\text{equação 1})$$

Este modelo permite calcular o fluxo de massa (J) através da pele. Esse valor é dado pelo declive da recta que representa a quantidade de composto permeado *versus* o tempo, e é expresso em  $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ , habitualmente.

Tendo em conta a equação anterior, o fármaco deve possuir determinadas características de modo a que a difusão seja facilitada: diminuta massa molecular (<500 Da) de modo a que o coeficiente de difusão seja elevado, uma vez que quanto menor é a massa, maior é a mobilidade; solubilidade intermédia em água e óleo para que haja elevada permeação (SC oleoso, epiderme viável aquosa); ponto de ebulição baixo de modo a garantir solubilidade na formulação [26].

Um dos factores limitantes desta lei da difusão relaciona-se com o coeficiente de partição (P), sendo que a sua maximização pressupõe que a concentração inicial de composto que permeou o SC seja elevada. No entanto, se o fármaco apresentar um coeficiente de partição baixo (aproximadamente zero) a tendência será permanecer na formulação, visto a pele ser predominantemente lipofílica. Neste caso o fármaco dificilmente poderá ser utilizado em

aplicações transdérmicas com uso em humanos, a não ser que se apliquem métodos que perturbem a função barreira da pele [27].

## 5. Estudos de difusão em pele

No que respeita à libertação de fármacos e à sua penetração nas camadas da pele após a aplicação tópica, é necessário realizar estudos que caracterizem o processo de difusão e permeação de fármacos após a aplicação tópica [28].

A difusão é, por definição, o movimento aleatório das moléculas através de um domínio impulsionado por um gradiente de concentração, de elevada para baixa concentração [29]. A difusão *in vivo* de um permeador é geralmente passiva, partindo de um veículo no compartimento dador através de uma membrana artificial ou biológica para um compartimento receptor. O permeador é definido como as espécies moleculares que se deslocam através do tecido/membrana. O termo permeação descreve primeiramente o movimento do permeador através da membrana que compreende a saída para a membrana, seguidamente da difusão através da membrana. A penetração compreende a entrada de composto numa determinada camada [30].

Designa-se por fluxo a quantidade de fármaco que permeia uma membrana por unidade de área e por unidade de tempo [31]. A acumulação do fármaco determina a quantidade do permeador que atravessa uma membrana num determinado período de tempo, expresso em unidades de massa/área. A propriedade do permeador que calcula a facilidade com que este permeia uma membrana é expressa em unidades de área/hora, e é designada como difusividade [30].

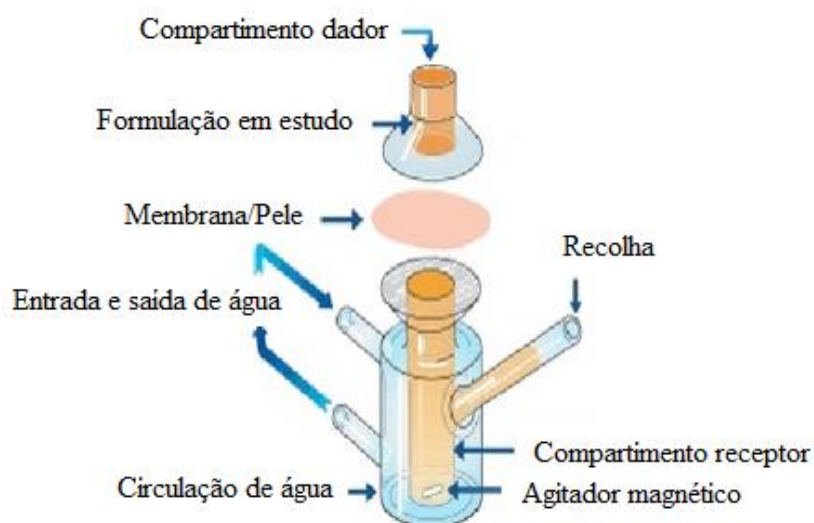
Qualquer fármaco aplicado num tecido ou numa membrana artificial apresenta um tempo de latência (*lag time*), isto é, uma diferença de tempo entre o início da sua aplicação e o momento em que o seu efeito se torna perceptível. Durante este tempo a taxa de permeação através da membrana encontra-se a aumentar. É atingido o equilíbrio quando há um movimento inalterável e constante do permeador através da membrana. O tempo necessário para atingir esse estado de equilíbrio depende de vários factores, tais como: as propriedades físico-químicas do fármaco; permeabilidade da membrana ou do tecido em estudo; o fluxo do fármaco [32].

Adicionalmente, a função barreira da pele não permite correlacionar directamente a permeabilidade do fármaco com a espessura do tecido, uma vez que há vários factores implicados, tais como a variabilidade da espessura da pele ao longo do corpo e o género/raça. Deste modo, o mesmo composto pode ter fluxos e quantidades acumuladas diferentes consoante a região do corpo [30].

### 5.1. Células de Franz

Os estudos de difusão em pele exigem a avaliação dos fenómenos que ocorrem entre a aplicação da formulação tópica e a difusão do fármaco através do tecido. O método usado para estes testes recorre à utilização de células de difusão de Franz, cuja maior vantagem é a aplicabilidade da primeira lei de difusão de Fick [33].

A célula vertical de Franz é composta por um compartimento dador e outro receptor, que é preenchido com uma solução receptora. Entre estes dois compartimentos é colocada a membrana, que pode ser de acetato de celulose ou biológica, como pele humana ou pele de porco. Esta célula encontra-se representada na figura 4. O sistema de linhas de Franz utilizado é composto por seis células individuais ligadas a um banho termostaticado a  $37\pm 0,1^\circ\text{C}$ , que se encontra sob agitação magnética constante durante um período de 7 horas para um perfil cinético de libertação, no que diz respeito as membranas e de 24 horas para um perfil cinético de permeação no caso da pele [28].



**Figura 4.** Esquema de uma célula de difusão de Franz. Adaptado de [28].

As células de Franz permitem avaliar a absorção do composto numa membrana, a sua permeabilidade e, conseqüentemente, o fluxo através dessa membrana e a quantidade que se acumulou após um determinado período de tempo [30].

## 5.2. Meio Receptor

A selecção de uma solução receptora depende da natureza do fármaco e do tipo de célula de difusão usada. A solubilidade do fármaco deve ser tomada em consideração, de modo a se encontrar na forma requerida na formulação tópica colocada no compartimento dador, assim como deve ser entregue uma determinada quantidade no compartimento receptor.

São comuns receptores aquosos quando os permeadores são moderadamente hidrofílicos e lipofílicos, e, de acordo com o tipo de permeador, variam os tipos de receptor. Visto isto, para um permeador ionizável deve ser utilizado um tampão fosfato salino (PBS, pH 7,4), enquanto que para um permeador não ionizável deve-se adicionar um solubilizante ao meio receptor de modo a permitir uma posterior quantificação. Para permeadores mais lipofílicos ou com baixa solubilidade aquosa os agentes solubilizantes que se adicionam podem ser agentes tensioactivos, proteínas, como albumina bovina e sistemas de solventes orgânicos, tal como etanol/água. Estes solubilizantes podem provocar danos na barreira ou alterações no tecido quando ocorre a penetração do fármaco, podendo alterar os resultados de permeabilidade [30].

## 5.3. Cálculo do fluxo

O fluxo (J) é a quantidade permeada a atravessar a membrana por unidade de tempo. Esta quantidade é dada em unidades de massa/área/hora. Se o permeador for aplicado numa dose finita, o fluxo pode ser calculado através da seguinte equação:

$$J = \frac{Q}{A * t} \quad (\text{equação 2})$$

onde  $Q$  corresponde à quantidade de composto que atravessa a membrana durante um determinado tempo  $t$ ;  $A$  diz respeito à área de membrana exposta (em  $\text{cm}^2$ ). O fluxo é dado em quantidade/ $\text{cm}^2$ /hora [30].

## 6. Formulações tópicas

Sistemas de entrega transdérmica de fármacos são uma fonte de interesse constante devido às vantagens que proporcionam em superar muitos inconvenientes associados a outros modos de administração de fármaco, isto é, via oral ou intravenosa [34].

Os sistemas tradicionais de entrega de fármacos através da pele consistem na utilização de cremes, géis ou loções para tratar desordens de pele ou sintomas de dor local. O seu sucesso relaciona-se principalmente com a sua capacidade de promover a entrega localmente.

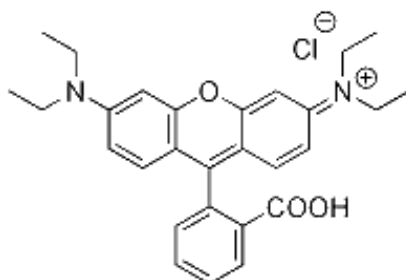
A constituição destas formulações pode conter múltiplos excipientes ou sistemas mono ou multifásicos de forma a obter uma mistura final homogénea. Excipientes, anteriormente vistos como meras substâncias capazes de facilitar a administração e proteger o fármaco, são considerados, nos dias atuais, como constituintes essenciais, que garantem o desempenho do medicamento e otimizam a obtenção do efeito terapêutico. A natureza dos excipientes determina o comportamento da formulação e a sua modulação, respeitando a lipofilicidade ou hidrofiliicidade, deve ser realizada de modo a maximizar o fluxo da difusão passiva.

Géis são sistemas semi-sólidos que compreendem pequenas quantidades de sólido dispersas em quantidades relativamente grandes de líquido. São descritos como redes tridimensionais de polímeros lineares que podem absorver grandes quantidades de água, permanecendo insolúveis e mantendo a sua estrutura tridimensional. Esta insolubilidade da rede polimérica deve-se à presença de ligações entre as cadeias de polímero [35].

Os excipientes das formulações dos géis utilizados em entrega transdérmica englobam, entre outros, um polímero, um promotor e um agente neutralizante.

### 6.1. Rodamina B

A rodamina B (Rh B) apresenta forma molecular  $C_{28}H_{31}N_2O_3Cl$  e peso molecular 479,02 g/mol [36]. A estrutura química desta molécula pode ser vista na figura 5.



**Figura 5.** Estrutura química da rodamina B [36].

A rodamina B foi a molécula escolhida para integrar nas formulações como composto activo. Ao longo desta dissertação poderei chamá-la de API (Active Pharmaceutical Ingredients) mas, no entanto, este deve ser considerado um modelo de API.

O API utilizado nas formulações usadas em entrega transdérmica tem de deter determinadas características, tais como solubilidade entre 1 e 5%, log P entre 1 e 3, baixa massa molecular e não deve conter cargas.

A solubilidade é uma propriedade físico-química intrínseca dos fármacos e representa uma das características fundamentais que é preciso considerar [37]. Uma substância é considerada como muito solúvel se obtiver valores de solubilidade menores do que 1 ml/g; muito solúvel se tiver valores de 1 a 10 ml/g; pouco solúvel se esses valores estiverem entre 100 e 1000 ml/g, por exemplo [38].

O coeficiente de partição óleo-água (P) é definido como a relação das concentrações da substância em óleo e em água, isto é a concentração da substância na fase orgânica/concentração da substância na fase aquosa. Os valores normalmente são tabelados como log P. Sendo assim, se log P de uma substância for 0, então  $P = 1$  e, portanto, tem igual afinidade por ambas as fases. Se  $\log P < 0$  então  $P < 1$  e a tendência é da substância se dissolver preferencialmente na fase aquosa e, portanto, quanto menor o log P, mais hidrofílica é. Por outro lado, se  $\log P > 0$ , então  $P > 1$  e a afinidade da substância é maior pela fase orgânica e, então, quanto maior for o log P, mais hidrofóbica é [39]. Para um fármaco, o ideal é o log P estar compreendido entre 1 e 3 de modo a manter a

lipossolubilidade máxima, isto é, a facilidade com que o fármaco permeia uma membrana biológica [40]. É o coeficiente de partição que permite avaliar a lipossolubilidade do fármaco (assim como a hidrossolubilidade) que, quanto maior, maior é o seu coeficiente de partição e mais rápida será a sua difusão. O log P ideal deve estar compreendido entre 1 e 3 uma vez que um coeficiente de partição muito elevado ou muito baixo pode constituir um obstáculo à difusão do fármaco [40]. A Rh B apresenta  $\log P = 2,74$  [41].

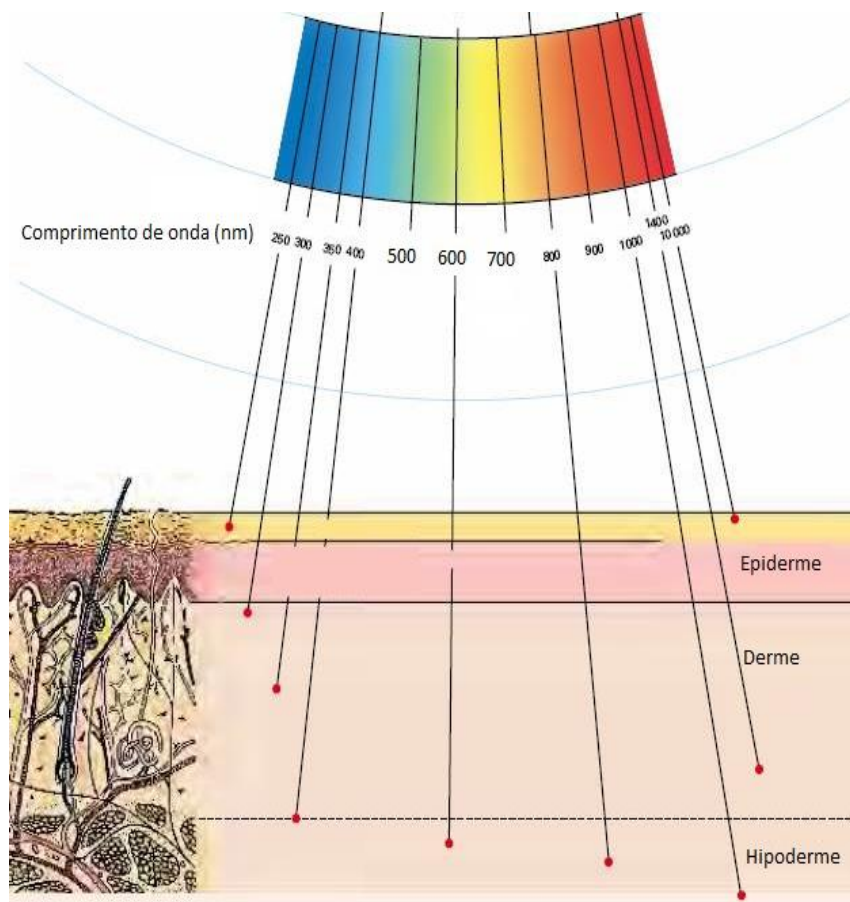
A massa molecular do fármaco deve ser inferior a 500g/mol, uma vez que baixa MM facilita a passagem da molécula através da pele.

Outra característica ligada ao fármaco que pode afectar a absorção do fármaco é a carga eléctrica, pois moléculas com carga eléctrica tendem a permear mais dificilmente, seja por atracção ou repulsão com a carga existente na membrana. Assim, o ideal é que o fármaco não possua carga eléctrica no momento da sua absorção [42] e, de facto, a rodamina B é um composto que apresenta carga total zero.

Para além destas características, a molécula escolhida deverá ter comprimento de onda de emissão a partir de cerca de 600nm, uma vez que a penetração da luz a partir desse comprimento de onda é muito maior que antes desse valor [43], como se pode verificar na figura 6. Uma questão importante a ter na escolha do API é o seu espectro de absorção, isto porque a banda mais intensa tem de se localizar a 50nm de distância do comprimento de onda do LED, de modo a não haver influência da luz do LED na recolha de fluorescência. No entanto, como só há quatro LEDs disponíveis no nosso laboratório, de 415nm, 470nm, 505 nm e 650nm, a escolha do API tornou-se mais limitada.

Entre os candidatos estavam os fluoróforos a tiacarbocianina, a fluoresceína, a rodamina B e a oxazina 1. A tiacarbocianina tem a desvantagem de apresentar um rendimento quântico de fluorescência extremamente baixo ( $\Phi_F = 5\%$ ) [45]. A fluoresceína, apesar de ter um bom rendimento quântico de fluorescência e massa molecular inferior a 500 Da, apresenta uma banda de absorção a cerca de 500nm [46], não havendo por isso um LED no nosso laboratório que possa ser utilizado, devido ao motivo explicado em cima. A oxazina 1 tem como principal impedimento, assim como a tiacarbocianina, um rendimento quântico de fluorescência extremamente baixo ( $\Phi_F = 11\%$ ) [47].



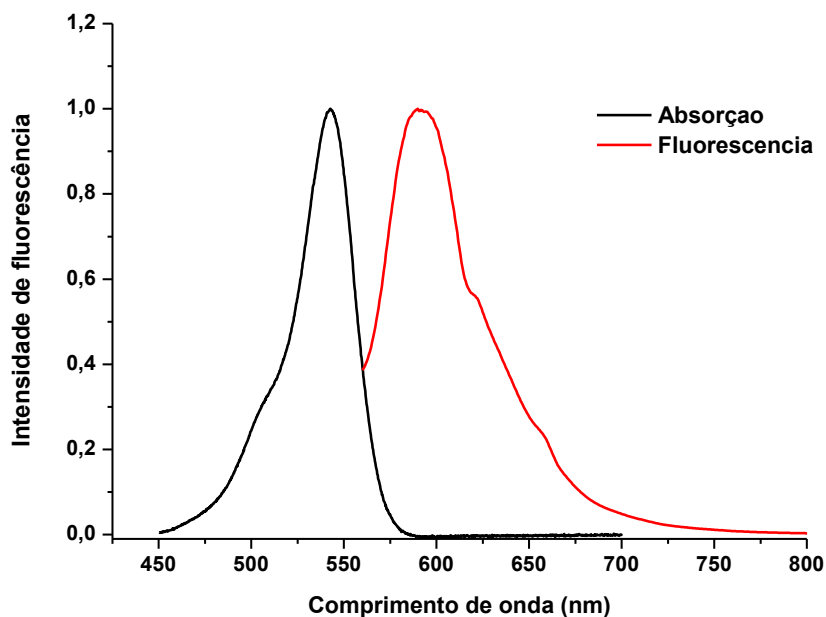


**Figura 6.** Esquema da profundidade de penetração da luz na pele por comprimento de onda em cada camada [44].

Optou-se então pela rodamina B, pois é o fluoróforo que reúne as melhores características, de acordo com as características de um API ideal.

A rodamina B apresenta o seu máximo de absorção a cerca de 550nm, como se pode observar na figura 7, e, sendo assim, utilizou-se o LED de 505nm.

Relativamente à escolha do solvente, foi feita entre a água e o etanol, pois a Rh B é muito solúvel em ambos [48]. A escolha baseou-se então na comparação dos rendimentos quânticos de fluorescência. A Rh B em etanol apresenta  $\phi_F$  que varia entre 49% e 68% [36] enquanto que em água,  $\phi_F = 31%$  [49]. Com base neste resultado concluiu-se que o solvente mais adequado a ser utilizado neste estudo seria o etanol.



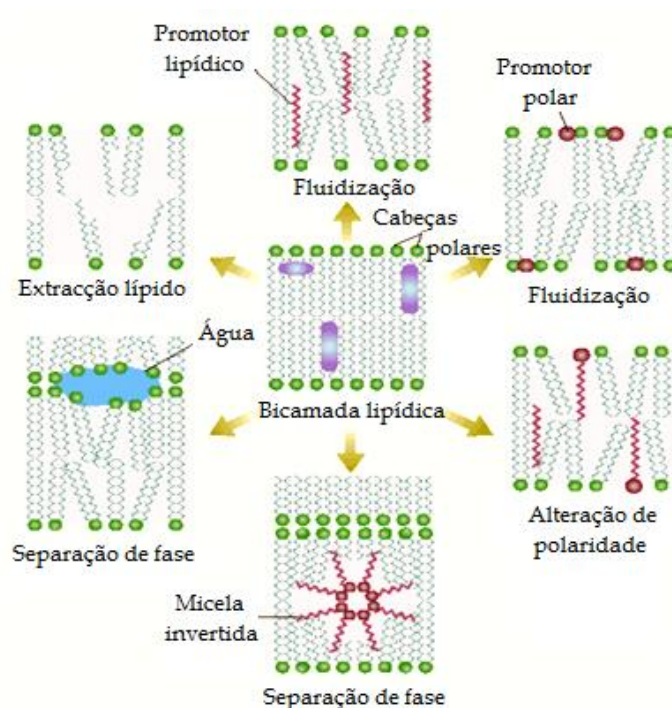
**Figura 7.** Gráficos da rodamina B em etanol: a preto o de absorção; a vermelho o de fluorescência, com tempo de integração de 200ms e utilizando um LED de 505nm

## 6.2. Promotor de absorção

Os critérios a considerar num procedimento de entrega transdérmica de um fármaco passam pelo criterioso balanço entre as propriedades físico-químicas do SC e desse fármaco. Como o SC é a principal barreira à difusão do fármaco pela pele, é necessário promover a permeação de fármacos através da pele, alterando reversivelmente a sua barreira.

Promotores de absorção são compostos químicos farmacologicamente inativos, mas que podem permear ou interagir com os constituintes do SC, quando incorporados numa formulação tópica, diminuindo a resistência da pele à difusão do fármaco.

Um promotor de absorção deve incrementar a actividade termodinâmica do fármaco, resultando daí um aumento do seu fluxo. A acção dos promotores incide nos espaços intercelulares das bicamadas lipídicas do SC, que, ao se intercalarem nestes, impulsionam a formação de microcavidades e, por conseguinte, aumentam o espaço disponível à permeação de fármacos. No entanto, esta acção é reversível. A diminuição da compactação dos lípidos resulta no incremento da fluidez da membrana. A figura 8 ilustra os possíveis mecanismos de acção dos promotores de absorção no domínio lipídico intercelular do SC [50].



**Figura 8.** Acção dos promotores de absorção no domínio lipídico intercelular bem organizado do SC. Adaptado de [51].

A utilização de promotores de absorção representa um dos métodos passivos mais utilizados, uma vez que existem inúmeras moléculas projectadas para este fim.

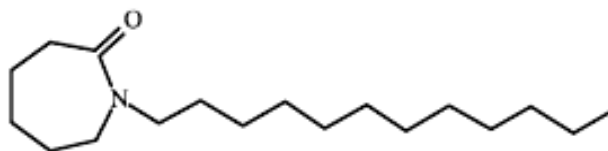
O promotor ideal será aquele que apresenta as seguintes características: não-tóxico; de acção imediata; não-irritante; não-alérgico; química e fisicamente compatível com o fármaco e excipientes; após a sua acção, o SC deve recuperar integralmente a sua barreira; aceitável cosmeticamente; inodoro; incolor; acessível; com boas propriedades solventes [50].

A escolha do promotor de absorção para este estudo recaiu sobre a sua utilização preferencial actual na cosmética.

### 6.2.1. Azone

A azone (A) foi a primeira molécula a ser desenvolvida especificamente como promotor de absorção. Quimicamente é considerada uma amida cíclica. A figura 9 ilustra a estrutura

química desta molécula [53]. É um composto solúvel na maior parte dos solventes orgânicos e apresenta baixa irritação, assim como muito baixa toxicidade. Estas propriedades tornam a azone num promotor de absorção desejado.



**Figura 9.** Estrutura química da azone [52].

Tal como acontece com outros promotores de absorção, a eficácia da azone é fortemente dependente da concentração. Surpreendentemente a azone é mais eficaz em baixas concentrações, sendo empregue geralmente entre 1% e 3% [52]. Possui ainda um  $\log P = 6,60$  [53]. As características estruturais da molécula de azone permitem que ela interaja directamente com o domínio lipídico do SC, produzindo um ambiente mais fluido, resultando numa maior penetração na pele [53].

### 6.3. Polímero gelificante

Um gel é descrito como uma rede tridimensional de polímeros lineares que podem absorver grandes quantidades de água, enquanto permanecem insolúveis e mantêm a sua estrutura tridimensional [54]. Esta insolubilidade da rede polimérica deve-se à presença de ligações cruzadas entre as cadeias de polímero [55].

Os polímeros são macromoléculas de elevado peso molecular que possuem uma estrutura em rede de cadeiras muito ou pouco densa, consoante a sua natureza. O tipo de polímero utilizado na formulação pode influenciar a estabilidade física do produto, assim como o seu comportamento sobre a pele [56].

### 6.3.1. Carbopol

O carbopol representa uma classe de polímeros derivados do ácido acrílico com uma massa molecular elevada. Têm sido amplamente usados na preparação de formulações sólidas e semi-sólidas, como géis, desempenhando o papel de agentes gelificantes. Estes polímeros, em particular, dispersam em água, resultando no seu inchamento até 1000 vezes comparativamente ao volume inicial e na neutralização do sistema [57]. Este processo permite a ionização dos grupos carboxílicos e, conseqüentemente, a formação de um gel muito viscoso [58].

Os polímeros de carbopol devem ser neutralizados de forma a atingir o máximo de viscosidade possível. Polímeros não neutralizados têm um gama de pH entre 2.5 – 3.5, enquanto que quando se adiciona um agente neutralizante alcança-se um pH entre 6.5 – 7.0. A viscosidade dos polímeros começa a diminuir a partir de pH 9 devido a repulsões electrostáticas causadas pelo excesso de eletrólitos.

O Carbopol 940, o utilizado neste estudo, é um polímero, que no seu estado normal se apresenta na forma de pó branco. Devido à sua solubilidade e à não reactividade com os restantes componentes da formulação, é muito utilizado na indústria cosmética e farmacêutica.

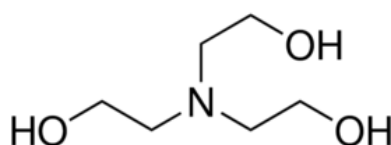
A maioria dos polímeros de carbopol têm solubilidade limitada em água, pelo que é necessário deixar hidratar algumas horas. No entanto, quando no meio há muita água e etanol, no qual os carbómeros são muito mais solúveis, não são necessárias 24h de hidratação.

### 6.3.2. Agente neutralizante

O carbopol é um polímero aniónico ácido que quando disperso em água apresenta uma estrutura enrolada. Assim, para obter o seu efeito gelificante é necessário convertê-lo num sal através da adição de um agente neutralizante.

A trietanolamina (TEA) é uma base comum, exemplo de um agente neutralizante que pode ser utilizado para provocar o desenrolamento do polímero devido à expansão das suas caudas. A sua estrutura está representada na figura 10.

Existe uma relação apropriada para utilizar os vários agentes neutralizantes com os polímeros de carbopol. É uma relação aplicável a todos os polímeros de carbopol uma vez que todos eles têm massa molecular equivalente ( $76\text{g/mol} \pm 4$ ). Para a obtenção de um gel utiliza-se o carbómero e TEA na proporção de 1/1,5 [59].



**Figura 10** – Estrutura química da TEA [60].

## 7. Remoção do gel na pele

O estudo da fluorescência em pele requer uma limpeza total da sua superfície, isto porque após a aplicação de um gel este não permeia totalmente a pele, pois parte dele persiste na sua superfície. É então necessário remover esse gel que não permeou a pele, e para isso existem vários métodos. Nesta dissertação foram estudados três: remoção por tape striping; remoção com algodão embebido em etanol; remoção com algodão embebido em água.

### 7.1. Tape striping

O método de tape striping, também designado por dermatofarmacocinético (DPK) é uma técnica que tem sido considerada útil em investigações dermatológicas por ser uma técnica selectiva para remover o SC, apesar de por vezes ser exaustiva [61].

Neste método é aplicada fita-cola na pele, na área que se quer remover, esfrega-se suavemente para assegurar que há adesão, e depois puxa-se num movimento rápido e contínuo [62]. A fita cola utilizada é de polipropileno, uma vez que é mais eficiente que a de celofane [61]. Sucessivos tape stripings removem camadas de corneócitos, e estudos

efectuados concluíram que são necessários 30 tape stripings para remover todo o SC [62]. Para além de um método de limpeza, o tape striping dá também a informação se um determinado composto permeou a pele para além do SC.

### **7.2. Algodão e etanol**

A remoção do excesso de gel com algodão embebido em etanol puro é um método eficaz de limpeza. No entanto tem a desvantagem do etanol ser um promotor de absorção, podendo esta limpeza promover indesejadamente o fármaco para o interior da pele.

### **7.3. Algodão e água**

A utilização de algodão embebido em água desionizada para limpar a superfície da pele é uma técnica muito eficiente e que não apresenta desvantagens.

# **Capítulo II**

*Material, Métodos e Técnicas  
instrumentais*



## 1. Material

### 1.1. Reagentes

- Água Mili-Q
- Azone (Sigma Aldrich®)
- Carbopol 940 (Sigma Aldrich®)
- Etanol (99%) (Panreac®)
- Pastilhas PBS (pH=7,4) (Sigma Aldrich®)
- Rodamina B (Sigma Aldrich®)
- Trietanolamina (Panreac®)
- Membranas de Celulose (Spectrum®)

### 1.2. Equipamentos

- Espectrofotômetro de UV-Visível Shimadzu UV-2100, usando uma célula de 1cm de percurso óptico;
- Aparelho portátil para medir fluorescência: Avantes sensline AvaSpec-ULS-TEC; Fibra Avantes FCR-UV 200/600-2-IND; LED Avantes Avalight-LED-505nm;
- Criostato Leica CM3050 S;
- Leitor de microplacas Biotek Synergy HT;
- Células de difusão de Franz verticais, com 12 mL de capacidade no compartimento receptor e 1,77cm<sup>2</sup> de área de contacto (PermeGear®);
- Banho de água termostatizado Bandelin Sonorex, TK 52;
- Microscópio de fluorescência Olympus CKX41;
- Centrifugadora Selecta centro8-B
- Trituradora Ystral® D-79282 Ballrechten-Dottingen

## 2. Métodos

### 2.1. Preparação das formulações de rodamina B

Foram desenvolvidas três formulações com a mesma constituição, onde apenas varia a percentagem de API modelo (composto activo, a rodamina B) e, conseqüentemente, varia também a percentagem de água e etanol aumentando ou diminuindo sempre na mesma proporção (tabela 1), de forma a poder comparar a influência da concentração de API na permeação na pele.

A preparação das formulações realizou-se em dois passos. Primeiramente começou-se por pesar a rodamina B, cujo frasco se encontra protegido com papel de prata, para evitar a degradação do composto por parte da luz. De seguida transferiu-se a rodamina B cuidadosamente para o frasco. Pesou-se o etanol directamente no frasco, utilizando uma micropipeta. Agitou-se continuamente o frasco de forma a dissolver toda a rodamina B. Para isso, levou-se ao ultra sons durante 30 segundos para garantir a total dissolução do composto activo. Em segundo lugar começou-se por colocar a quantidade de água desionizada pretendida num frasco. Pesou-se o carbopol directamente no frasco e agitou-se. Com a ajuda de uma micropipeta, pipetou-se o agente neutralizante (TEA) para o interior do frasco e mexeu-se intensivamente com uma espátula, até a mistura ficar homogénea e, mais tarde, juntou-se ao produto desenvolvido no primeiro passo.

**Tabela 1** - Constituição dos géis de rodamina B desenvolvidos.

Composição do gel	(%m/m)		
	Gel 1	Gel 2	Gel 3
API	1,00%	0,50%	1,50%
Etanol	12,25%	12,50%	12,00%
Água desionizada	82,25%	82,50%	82,00%
Promotor	2,00%	2,00%	2,00%
Polímero	1,00%	1,00%	1,00%
Agente neutralizante	1,50%	1,50%	1,50%

De forma a obter valores reais, todas as medidas foram efectuadas por pesagem, excepto a água. Sendo assim, para 3g, o gel 1 vai conter 0.030g de rodamina B, 0.367g de etanol, 2467 µl de água, 0.060g de azone, 0.030g de carbopol e 0.045g de TEA; o gel 2 0.015g de rodamina B, 0.375g de etanol, 2475 µl de água, 0.060g de azone, 0.030g de carbopol e 0.045g de TEA; o gel 3 0.045g de rodamina B, 0.360g de etanol, 2460 µl de água, 0.060g de azone, 0.030g de carbopol e 0.045g de TEA.

No final, para evitar a degradação do polímero, os géis são mantidos a 4°C.

### **2.2. Preparação da pele de leitão**

A pele para os ensaios foi obtida a partir de um leitão.

Para os ensaios que envolveram a medição de fluorescência e a biópsia, a pele que se encontrava congelada deixou-se à temperatura ambiente durante duas horas antes de se começar a utilizar. Após esse tempo, com o auxílio de uma tesoura cortaram-se os pêlos o máximo possível, uma vez que estes espalham a luz na detecção da fluorescência. Terminada esta tarefa seguiu-se o corte da pele em pequenos quadrados com espessura de cerca 3mm. Seguidamente, cada um desses quadrados foi marcado com fita isoladora de forma a limitar a área da pele que estaria em contacto com o gel, cerca de 4cm<sup>2</sup>. Por último, foram aplicados os géis sobre essa superfície marcada, de uma forma uniforme, e, posteriormente, mediu-se a intensidade de fluorescência e fez-se a biópsia.

### **2.3. Soluções padrão**

Foram preparadas duas soluções padrão distintas: a primeira para ser usada na análise de resultados obtidos na extração; a segunda para a análise dos resultados obtidos a partir das células de Franz em membranas de celulose.

As soluções padrão de rodamina B utilizadas para a análise dos resultados da extração foram obtidas a partir da diluição com etanol da solução mãe com concentração 1E-6 M, até uma concentração de 1E-7 M, num total de 5 diluições.

Para a análise dos resultados obtidos nas células de Franz as soluções padrão de rodamina B foram obtidas a partir da diluição com PBS da solução mãe com concentração  $9E-6$  M até  $7E-7$  M, num total de 10 diluições.

### **2.4. Preparação das lâminas de pele**

A pele de porco tem de ser trabalhada antes de ser utilizada na microscopia de fluorescência. Para isso, inicialmente colocou-se a formulação na área limitada da pele e deixou-se permear de acordo com o tempo de incubação pré-definido. De seguida, removeu-se o excesso que permanece à superfície, de acordo com o que foi definido antes, de modo a não comprometer a precisão e a exactidão.

A fase seguinte consistiu em fazer uma biópsia na zona central onde a formulação esteve em contacto com a pele. A biópsia foi efectuada com um instrumento chamado punção que foi aplicado na pele e exercida pressão para baixo, num movimento rotatório para que o instrumento penetre na pele. Após isso, o instrumento foi retirado e a amostra cuidadosamente puxada e cortada com uma tesoura na base. Foi necessário ter cuidado para que o tecido não se deformasse nem a base se separasse. Isto deu origem a uma amostra cilíndrica com um diâmetro de 4 mm, de acordo com o diâmetro do instrumento utilizado. A etapa seguinte foi executada no criostato que se encontra na Faculdade de Medicina. O criostato consiste num equipamento preparado para cortes de tecidos congelados, que podem estar impregnados em diferentes meios, com avanço automático e regulável do bloco de acordo com a espessura desejada, e faca imóvel. Após o ajuste de determinadas funções do criostato, como a temperatura ( $-20^{\circ}\text{C}$  para amostras de pele suína) e orientação do local onde vai estar a pele, colocou-se a cola (resina solúvel em água que forma um polímero sólido quando congelado) no suporte apropriado para a amostra que existe no interior do criostato. Após isto, e com ajuda de uma pinça, colocou-se a amostra de tecido previamente cortada na superfície da cola que se colocou no suporte apropriado. O tecido tem de ficar colocado numa posição que permita a superfície da pele fique de lado, de modo a que a pele seja cortada numa posição em que se consiga ver todas as camadas. Para finalizar, colocou-se novamente cola de modo a que toda a pele se encontre totalmente coberta. O suporte é depois colocado dentro do criostato, que deverá manter uma temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$ , congelando quase imediatamente a cola e o tecido.

Quando se encontraram congelados, fatiou-se cuidadosamente a pele e, com a ajuda de um pincel, colocou-se a amostra obtida na lâmina que, como se encontrava à temperatura ambiente (quente em relação ao interior do criostato) a cola derreteu e aderiu imediatamente à lâmina. Procedeu-se de igual forma até a lâmina estar cheia, o que equivale a cerca de 8 amostras de tecido.

Para terminar, e estando a lâmina cheia com as amostras, colocou-se um meio de montagem para a fluorescência nos espaços vazios da lâmina, e colocou-se uma nova lâmina por cima, de forma a conservar as amostras para serem posteriormente estudadas no microscópio de fluorescência.

Estas amostras, até ao seu estudo, encontram-se congeladas de modo a preservar as mesmas.

### **2.5. Extração**

A extração foi antecedida por uma nova biópsia, que já foi descrita anteriormente. Sendo assim, e a partir do momento em que se tem a amostra de tecido proveniente da biópsia, cortou-se essa amostra em 4 partes iguais. Para iniciar a extração, colocaram-se esses pedaços num eppendorf no qual se adicionou 1 ml de etanol. Com o auxílio da trituradora triturou-se tudo durante 3 minutos. Após esse tempo transferiu-se o conteúdo do eppendorf para um tubo de falcon e adicionaram-se 2 ml de etanol. Levou-se ao ultrasons durante 30 minutos. Passado esse tempo os pedaços de pele encontravam-se totalmente desfeitos. Então, nessa altura, centrifugou-se o conteúdo do tubo de falcon durante 3 minutos numa rotação de 150 mil rpm. A inevitabilidade de levar a amostra à centrífuga baseia-se na necessidade de separar as diferentes fases (sólida e líquida) da amostra. No entanto, para se fazer essa separação é imperativo colocar na centrífuga dois tubos de ensaio com peso idêntico em posições opostas para contrabalançar o peso. Por último, e de modo a obter valores quantitativos da quantidade de API que permeou a pele, com o auxílio de uma micropipeta pipetaram-se 200 µl para uma placa de 96 poços, que posteriormente foram medidos no leitor de microplacas.

## 2.6. Estudos de Difusão *in Vitro*

Os estudos *in vitro* foram efectuados ao longo de um período de 6 horas, em células de Franz verticais, com uma área de difusão de  $1,77 \text{ cm}^2$ , um compartimento receptor de 12 mL preenchido com solução de PBS (pH = 7,4) e mantidas a  $37^\circ\text{C} \pm 0,1$ , com agitação constante a 600 rpm.

A aplicação do gel consiste em depositar 0,2 mL da formulação com uma seringa em cada compartimento dador e de seguida isolar com parafilme de modo a não haver evaporação. Utilizaram-se membranas de celulose com um diâmetro de 33 mm, que, antes de serem colocadas entre o compartimento dador e o compartimento receptor são colocadas em água durante meia hora de modo a obterem equilíbrio.

Em tempos pré definidos (0h, 1h, 2h, 3h, 4h, 5h, 6h) retiram-se 300  $\mu\text{L}$  do compartimento receptor com uma pipeta de Pasteur previamente marcada, que são imediatamente substituídos com 300  $\mu\text{L}$  de uma solução de PBS, igualmente através de uma pipeta de Pasteur.

Após efectuadas todas as recolhas, as amostras são armazenadas no frigorífico e posteriormente analisadas por fluorescência no leitor de microplacas.

## 2.7. Quantificação da rodamina B

Para determinar a quantidade de rodamina B foi utilizado um método, a extracção e duas condições, pele de porco e membrana de celulose.

## 2.8. Análise dos dados dos estudos de permeação

O cálculo do fluxo da rodamina B ( $J$ ,  $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ ) retira-se a partir do declive da porção linear do gráfico da quantidade cumulativa de fármaco permeada em função do tempo.

### **3. Técnicas instrumentais**

Várias foram as técnicas utilizadas ao longo deste estudo.

#### **3.1. Espectroscopia de absorção**

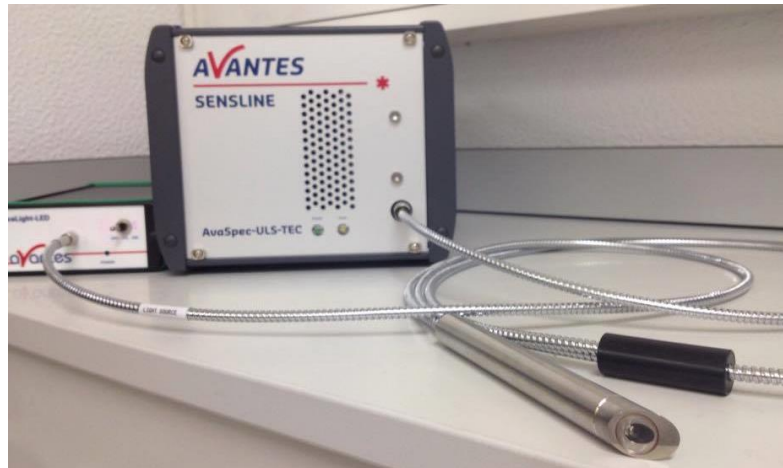
Os espectros de absorção foram registados por um espectrofotómetro de UV-Visível Shimadzu UV-2100, usando uma célula de 1cm de percurso óptico em comprimentos de onda entre 400 e 700 nm.

#### **3.2. Fluorescência**

A fluorescência foi registada por um aparelho portátil composto por: um detector que consiste em fotodíodos de vários comprimentos de onda que geram um sinal eléctrico quando recebem luz; pela fibra óptica através da qual é emitida a luz de excitação e recolhida a intensidade de fluorescência; por um LED de 505 nm, compatível com a fluorescência da Rh B que emite a cerca de 550 nm. Este aparelho portátil encontra-se na figura 11.

Nesta técnica, uma luz de excitação é emitida pela mesma fibra onde a intensidade de fluorescência é recolhida. Após isso, obtém-se um espectro da intensidade de fluorescência pelo comprimento de onda.

Todas as experiências que envolveram a medição de fluorescência recorrendo a este método foram efectuadas de igual forma, isto é, numa sala escura sem luz natural ou artificial, de forma a não haver interferência de outra fonte luminosa capaz de alterar os resultados.



**Figura 11** – Aparelho portátil de medir a fluorescência composto pelo detector, LED de 505 nm e a fibra óptica.

### 3.3. Microscopia de fluorescência

Através da microscopia de fluorescência conseguiu-se visualizar a quantidade de API que permeou no interior da pele. Esta observação foi feita através do microscópio de fluorescência Olympus CKX41, em que se fez incidir uma fonte luminosa entre 480 e 550 nm sob as lâminas onde se encontravam as amostras de pele (preparadas segundo descrito anteriormente), num tempo de integração de 500 ms.

### 3.4. Leitor de microplacas

As amostras obtidas após a biópsia e posterior extração foram medidas no leitor de microplacas. Aqui foram lidas as amostras num  $\lambda_{ex}=508\text{nm}$  e  $\lambda_{em}=590\text{nm}$ , a uma temperatura de  $28^{\circ}\text{C}$ , num tempo de integração de 35 ms. Esta técnica revelou informação acerca da intensidade de fluorescência da rodamina B que permeou a pele.



# **Capítulo III**

## ***Resultados e Discussão***

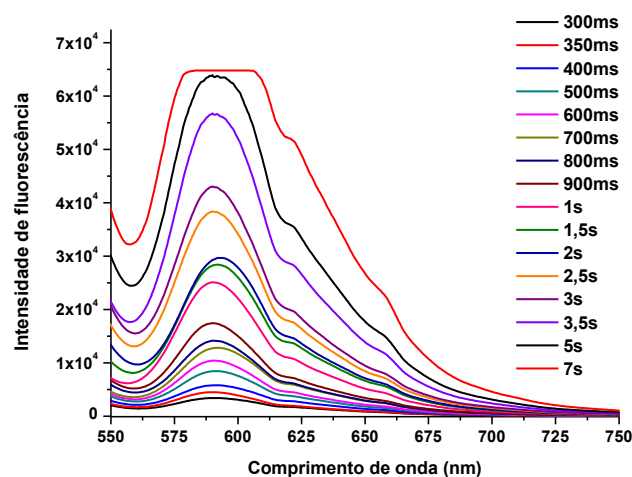
## 1. Definição do gel

A constituição dos géis utilizados neste estudo, isto é, a percentagem de cada componente na mistura, baseou-se na constituição dos géis desenvolvidos no projecto do ano passado, onde foram estudados e elaborados vários géis de modo a obter um gel otimizado. No entanto, uma vez que a rodamina B possui um rendimento quântico de fluorescência muito elevado, comparando com o composto activo utilizado anteriormente, a sua percentagem no gel é menor, variando de 0,5 a 1,5% (anteriormente 5%), reajustando-se a percentagem total aumentando a percentagem de água e etanol. O promotor, assim como o polímero, foram elegidos por actualmente serem os mais utilizados em cosméticos, sendo portanto aprovando o seu uso em humanos. Contudo, verificou-se que este novo polímero, o carbopol, não concedia consistência ao gel, que se mantinha líquido e heterogéneo. Foi então necessário adicionar um agente neutralizante, TEA, obtendo-se então um gel viscoso e homogéneo.

## 2. Estudo exploratório do gel e do aparelho

De modo a compreender o comportamento do gel a nível de fluorescência, espalhou-se um pouco do mesmo numa lâmina de vidro e mediu-se a intensidade de fluorescência ao longo de vários tempos de integração diferentes, utilizando para tal o aparelho portátil de medir a fluorescência e o LED de 505nm. Este estudo foi feito para o gel que apresenta 1,5% de concentração de rodamina B, o gel mais concentrado, escolhido aleatoriamente. Os resultados obtidos encontram-se no gráfico da figura 12.

Como se verifica através da observação do gráfico presente na figura 12, e como era espectável, à medida que o tempo de integração aumenta, aumenta também a intensidade de fluorescência, até se obter saturação para um tempo de integração de 7s.



**Figura 12**– Gráfico da intensidade de fluorescência do gel de 1,5% de rodamina B em função de vários tempos de integração (300ms a 7s). Este estudo foi feito numa lâmina de vidro utilizando um LED de 505nm.

### 3. Optimização do método

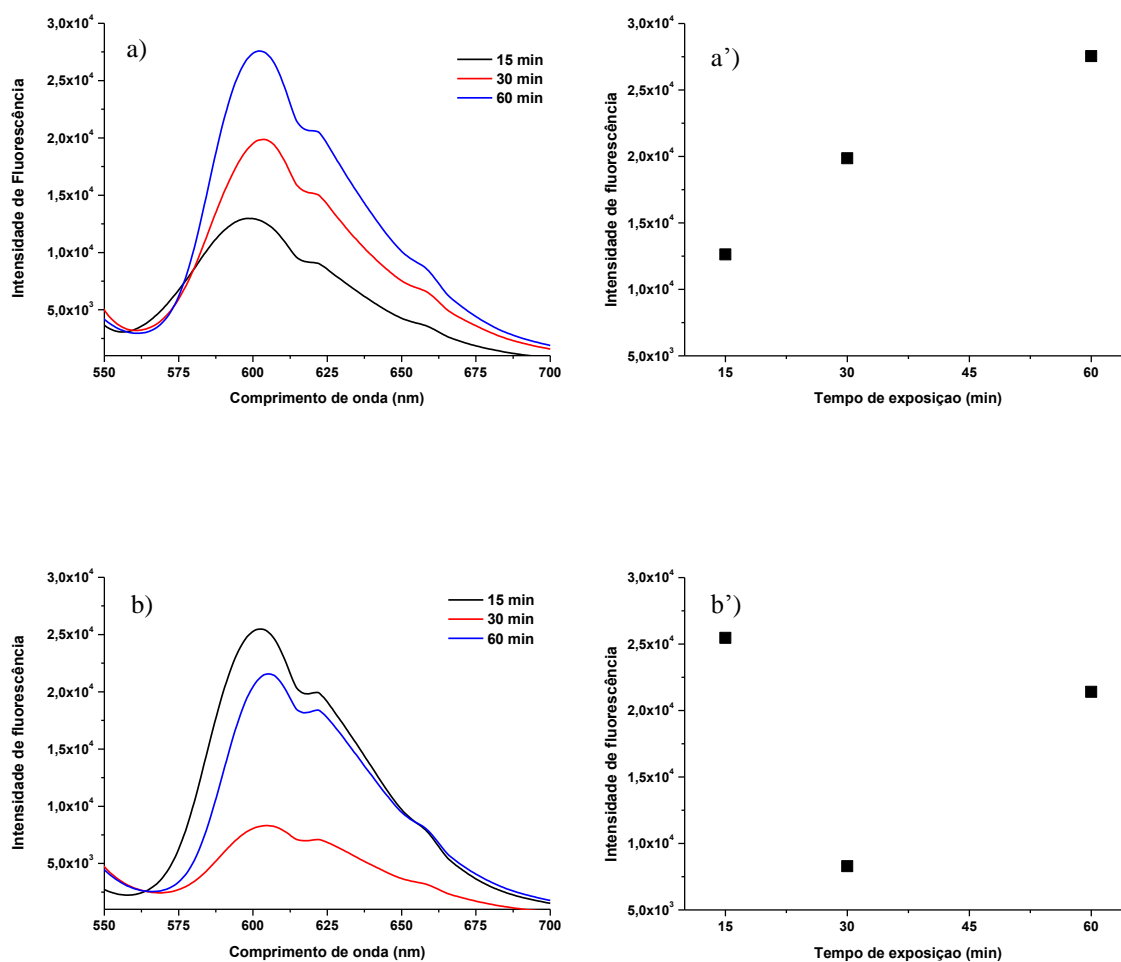
Foi necessário otimizar determinados parâmetros antes de se iniciarem os testes em pele de porco, de modo a obter melhores resultados. O primeiro parâmetro a otimizar foi o tempo de exposição do gel na pele, ou seja, definiu-se o melhor tempo para o qual o gel está em contacto com a pele, de forma a proporcionar máxima permeação. Estando este parâmetro definido, optimizou-se o método de remoção do excesso de gel, isto é, o gel que não permeou a pele. Por fim, optimizou-se o tempo de integração, isto é, o tempo que demora a recolha de fluorescência do composto, isto porque a intensidade de fluorescência e o próprio sinal obtido, variam com este parâmetro.

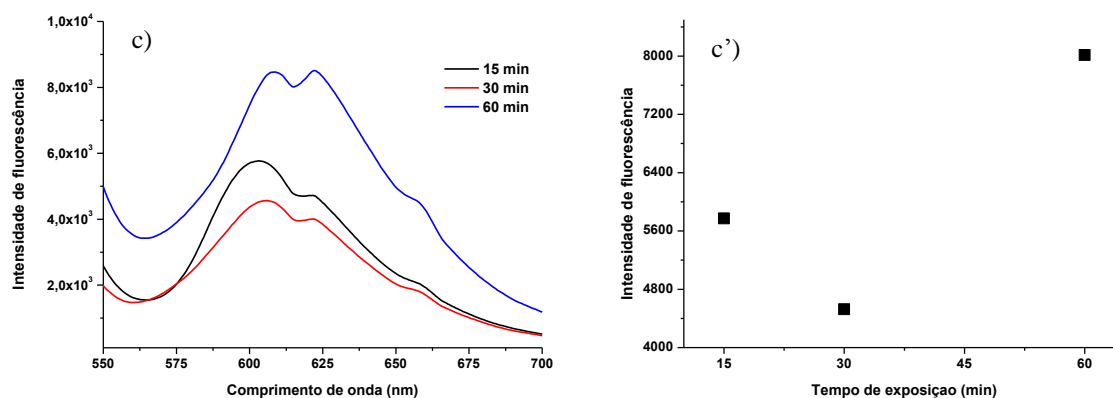
Definido o tempo de exposição do gel na pele, o método de remoção do excesso de gel na pele e o tempo de integração, seguem-se os testes com as três formulações desenvolvidas.

#### 3.1. Optimização do tempo de exposição do gel na pele

De modo a otimizar o tempo de exposição do gel na pele, também designado tempo de incubação, expôs-se cada um dos géis em pele de porco previamente preparada, em tempos de incubação de 15, 30 e 60 minutos. Passado esse tempo de exposição, a superfície da pele

foi limpa com uma espátula e, recorrendo ao aparelho portátil, mediu-se a fluorescência de cada um dos nove pedaços de pele, variando o tempo de integração de modo a observar a influência do mesmo na intensidade da fluorescência. Essa variação foi feita entre 100 e 350ms (numa variação de 50 ms). Os resultados obtidos para cada gel nos três tempos de incubação estão representados nos gráficos da figura 13, num tempo de integração de 200ms. Foi este o tempo de integração escolhido para esta optimização (escolha feita entre os seis tempos de integração usados), visto ser um tempo intermédio. No entanto, esta escolha não é relevante, uma vez que neste ponto o que se pretende comparar são os tempos de incubação do gel na pele.





**Figura 13.** Gráficos da intensidade de fluorescência dos três géis de rodamina B em três tempos de exposição em pele de leitão, 15, 30 e 60 minutos: a) e a') gel de 0,5%; b) e b') gel de 1%; c) e c') gel de 1,5%. Os valores foram obtidos num tempo de integração de 200ms e, nos gráficos da direita, com  $\lambda=603\text{nm}$ .

Analisando os gráficos a), b) e c), da figura 13, conclui-se que o melhor tempo de exposição, isto é, aquele que garante máxima intensidade de fluorescência na maioria dos casos são 60 minutos. Sendo assim, as próximas etapas serão efectuadas usando tempo de incubação do gel na pele de 60 minutos.

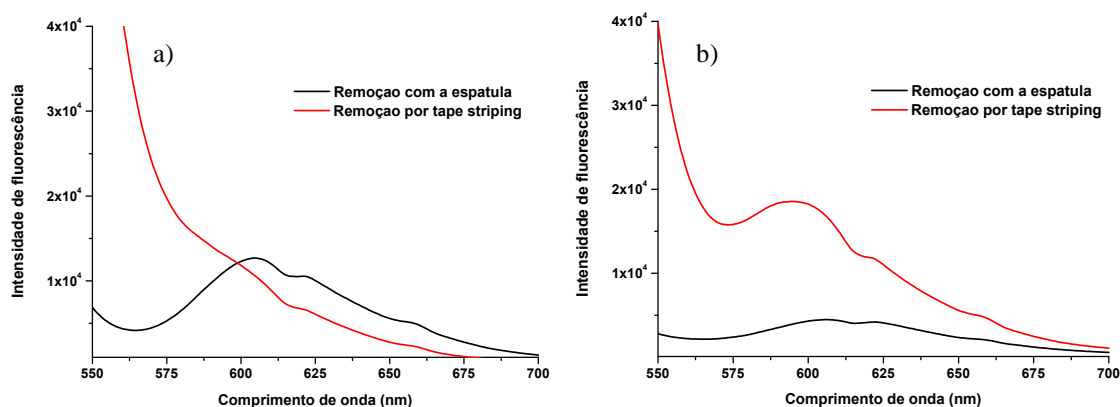
Relativamente à observação do gráfico a') da figura 13, que representa a intensidade de fluorescência do gel menos concentrado (0,5% de rodamina B) em função do tempo de exposição do gel na pele (e a  $\lambda=603\text{nm}$ ), verifica-se que à medida que se aumenta o tempo de exposição aumenta também a intensidade de fluorescência de forma linear, o que era espectável. No entanto, no gráfico b') (1% de rodamina B) e no gráfico c') (1,5% de rodamina B) o aumento do tempo de exposição deixa de implicar um aumento linear de intensidade de fluorescência para o mesmo comprimento de onda,  $\lambda=603\text{nm}$ . É possível que isto aconteça devido ao efeito de filtro interno, que consiste na atenuação da radiação devido a um excesso de concentração do fluoróforo (rodamina B).

### 3.2. Otimização do método de remoção do excesso de gel na pele

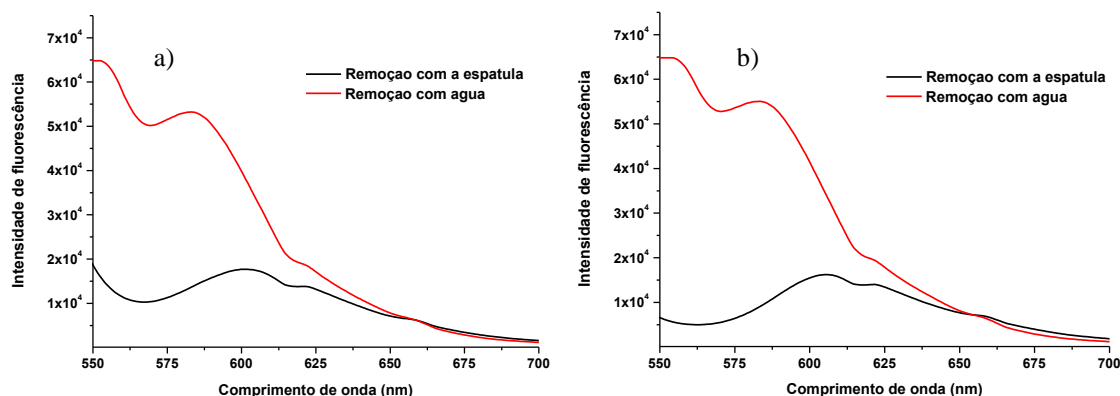
Para otimizar este parâmetro foram testados três métodos de remoção do excesso de gel na pele. Para isso, prepararam-se seis pedaços de pele, dois para cada método de remoção, de forma a poder comparar dois pedaços de pele limpos da mesma forma. Colocou-se então o gel na pele, que, após contacto com a pele durante o tempo de incubação pré definido, se limpou. Para otimizar este ponto utilizou-se apenas o gel de 1%. Bastava um gel para efectuar estas experiências e nesse caso optou-se pelo gel de concentração intermédia. Inicialmente retirou-se o excesso de gel com uma espátula de forma a não haver muito espalhamento. Após isto, limpavam-se os dois primeiros pedaços de pele através da técnica de tape stripping, os dois seguintes com um algodão embebido em água e os últimos dois com algodão embebido em etanol.

É de salientar que até este ponto, em todos os testes efectuados a pele foi limpa apenas com uma espátula, visto a limpeza ainda não ter sido otimizada.

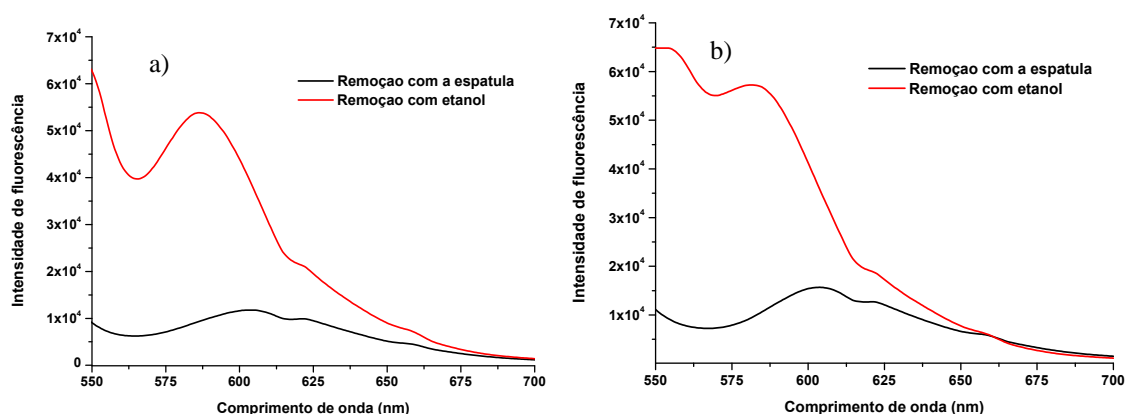
A limpeza com etanol, assim como a limpeza com água, foi feita repetidamente até que o algodão deixou de apresentar coloração, isto porque à medida que se remove o gel da pele, que apresenta coloração cor-de-rosa devido à presença de rodamina B, o algodão fica tingido com essa cor. A limpeza utilizando o método de tape stripping terminou quando a fita cola deixou de apresentar essa mesma coloração. Para isso foram necessárias cerca de 40 repetições. Os resultados obtidos encontram-se representados nas figuras 14, 15 e 16.



**Figura 14.** Gráficos da intensidade de fluorescência do gel de 1%, num tempo de incubação de 60 minutos: a) corresponde à primeira medição do primeiro pedaço de pele; b) corresponde à segunda repetição, isto é, ao segundo bocado nas mesmas condições. As medidas apresentadas foram realizadas com um tempo de integração de 200ms. A banda representada a 550nm diz respeito à luz de excitação, um LED de 505nm. Estes dados são relativos à remoção do gel recorrendo ao método de tape stripping.



**Figura 15.** Gráficos da intensidade de fluorescência do gel de 1%, num tempo de incubação de 60 minutos: a) corresponde à primeira medição do primeiro pedaço de pele; b) corresponde à segunda repetição, isto é, ao segundo bocado nas mesmas condições. As medidas apresentadas foram realizadas com um tempo de integração de 200ms. A banda representada a 550nm diz respeito à luz de excitação, um LED de 505nm. Estes dados são relativos à remoção do gel com algodão embebido em água.



**Figura 16.** Gráficos da intensidade de fluorescência do gel de 1%, num tempo de incubação de 60 minutos: a) corresponde à primeira medição do primeiro pedaço de pele; b) corresponde à segunda repetição, isto é, ao segundo bocado nas mesmas condições. As medidas apresentadas foram realizadas com um tempo de integração de 200ms. A banda representada a 550nm diz respeito à luz de excitação, um LED de 505nm. Estes dados são relativos à remoção do gel com algodão embebido em etanol.

Após análise dos resultados anteriores e de dados observados durante a experiência, a escolha do método de remoção do excesso de gel da pele baseia-se em quatro critérios. O primeiro critério consiste na observação feita no decorrer da experiência - olhando para a pele após limpeza com água e etanol, a pele apresenta a sua cor original, encontrando-se perfeitamente limpa. Após sucessivas remoções com tape striping a pele na zona dos poros

mantém-se cor-de-rosa, devido ao gel não ter sido removido na sua totalidade. Daqui concluo que o tape stripping não é um bom método de limpeza. O segundo critério tem como suporte a análise dos gráficos de fluorescência anteriores. Relativamente aos dados da remoção com água e etanol são os esperados, havendo pouca fluorescência. No entanto, os gráficos da água são mais concordantes que os do etanol, uma vez que o comportamento das curvas nas duas experiências se comportam de maneira semelhante. Relativamente ao tape stripping os dados não são conclusivos, uma vez que o comportamento das curvas nas duas experiências é totalmente distinto, concluindo assim que este método não é reproduzível. O terceiro critério assenta na convicção de que a limpeza não pode afectar o fluxo natural de permeação do fármaco na pele. Sendo assim, sabe-se que o etanol é um promotor de absorção, podendo provocar um aumento da permeação por isso mesmo. Relativamente à água e ao tape stripping não há informação que possam aumentar a permeação. O quarto e último critério baseou-se no resultado quantitativo obtido pela análise de fluorescência no leitor de microplacas, de acordo com o que já foi descrito anteriormente. Esses resultados podem ser observados na tabela 2.

**Tabela 2** – Intensidade de fluorescência medida a partir da biópsia e extração de cada um dos três métodos.

	<b>Tape Stripping</b>	<b>Água</b>	<b>Etanol</b>
<b>Amostra 1</b>	151	43	202
<b>Amostra 2</b>	48	47	233

Sendo assim, concluiu-se que os resultados do tape stripping são muito discordantes, não sendo conclusivos, enquanto que os da remoção com etanol e água são mais concordantes. No entanto, os valores do etanol são muito elevados, comparando com os restantes.

Os critérios anteriores usados na escolha do melhor método de remoção do excesso de gel da pele encontram-se resumidos na tabela 3.



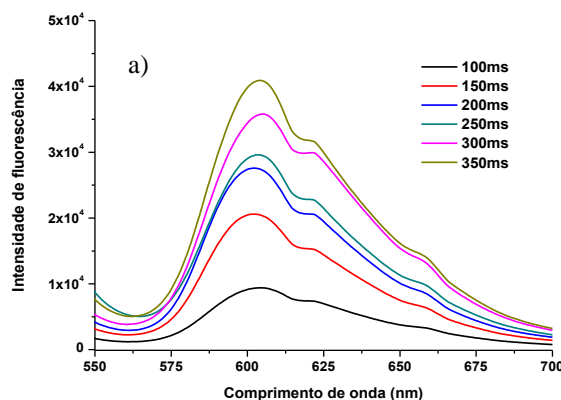
**Tabela 3** – Critérios para a escolha do melhor método de remoção do excesso de gel na pele.

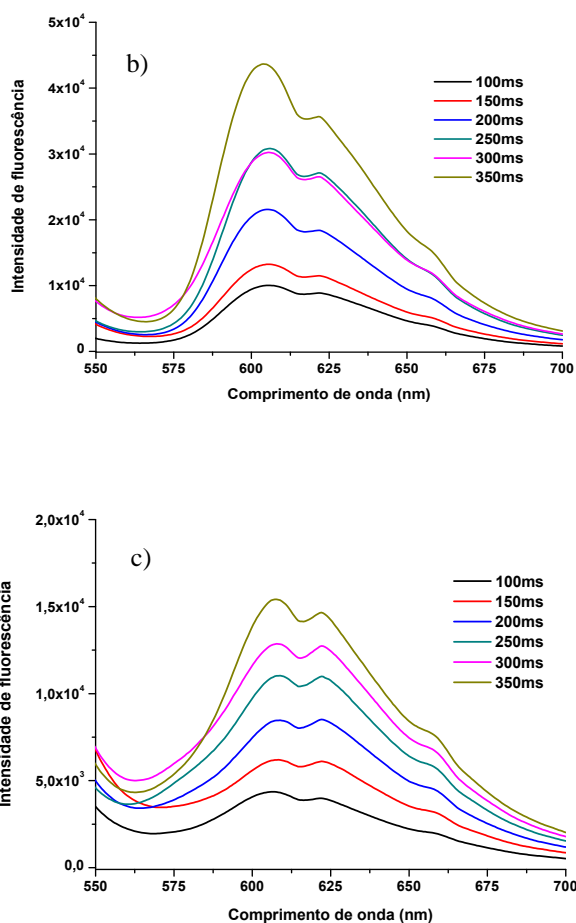
	<b>Tape Striping</b>	<b>Água</b>	<b>Etanol</b>
<b>Coloração persistente</b>	Sim em redor dos poros	Não	Não
<b>Fluorescência</b>	Dados não conclusivos	Pouca fluorescência e dados concordantes	Pouca fluorescência e dados concordantes
<b>Favorecedor da permeação</b>	Não	Não	Sim
<b>Análise quantitativa</b>	Resultados muito elevados e discordantes	Resultados concordantes	Resultados concordantes

Desta forma concluiu-se que o melhor método para remoção do excesso de gel que não permeia a pele é com algodão embebido em água.

### 3.3. Optimização do tempo de integração

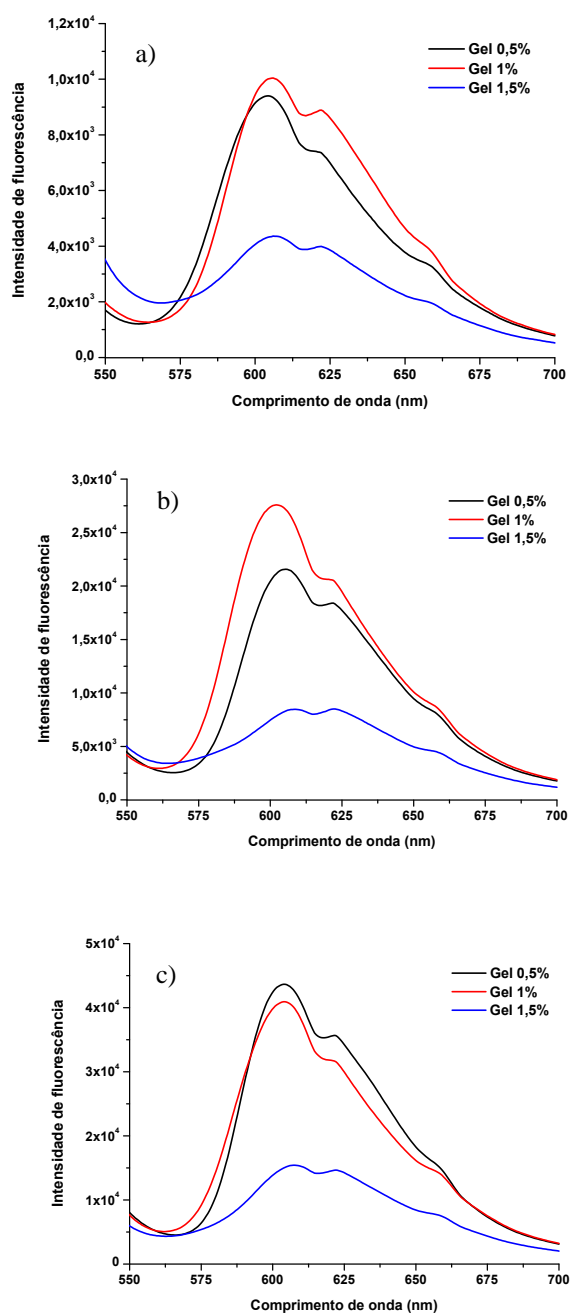
Em todas as experiências efectuadas até este ponto foram usados tempos de integração aleatórios, uma vez que os estudos em causa não dependiam directamente deste factor. De modo a optimizar o tempo de integração, aplicou-se cada uma das três formulações num pedaço de pele previamente preparado. Variou-se o tempo de integração entre 100 a 350 ms, em intervalos de 50ms. Os resultados obtidos encontram-se nos gráficos da figura 17.





**Figura 17.** Gráficos da intensidade de fluorescência em função da concentração dos três géis: a) gel 0,5%; b) gel 1%; c) gel 1,5%.

Observando os três gráficos anteriores, verifica-se que a fluorescência é visível para todos os tempos de integração, aumentando com o aumento do tempo de integração, como era de esperar. No entanto ainda não é perceptível qual o melhor tempo de integração, aquele em que se obtém melhor sinal. Visto isto, desenvolveram-se três gráficos onde se pode ver a intensidade de fluorescência de cada gel num determinado tempo de integração: 100ms, 200ms e 350ms (o menor tempo de integração, um intermédio e o maior, respectivamente). Os gráficos estão representados na figura 18.

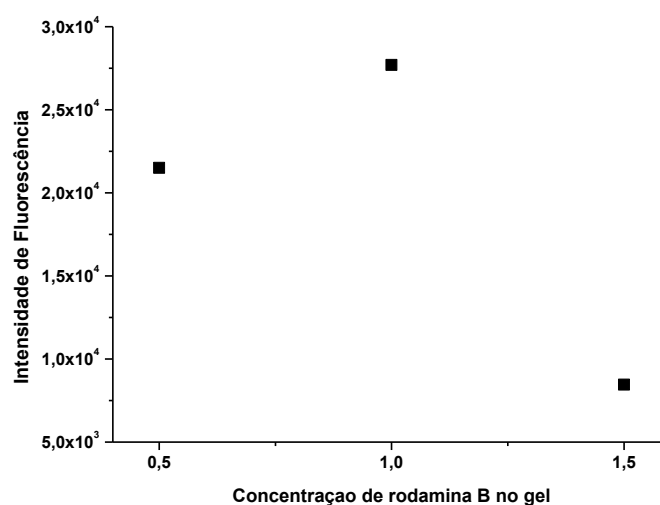


**Figura 18** - Gráficos da intensidade de fluorescência em função do tempo de integração dos três géis: a) tempo de integração de 100ms; b) tempo de integração de 200ms; c) tempo de integração de 350ms.

Analisando os gráficos da figura 18 concluiu-se, como era esperado, que o espalhamento é o mesmo para o mesmo tempo de integração. Esta informação é retirada do início do gráfico, pois as três curvas de cada um iniciam-se sensivelmente no mesmo ponto. Relativamente à intensidade de fluorescência, era espectável que aumentasse com o

aumento da concentração do gel, o que não acontece. Como já foi referido anteriormente esta não linearidade pode depender do efeito de filtro interno causado pela elevada concentração de rodamina B, visível principalmente no gel de 1,5% (o mais concentrado) pois devia apresentar maior intensidade de fluorescência o que de facto não acontece. Sendo assim decidiu-se optar pelo tempo de 200ms (gráfico b)), uma vez este tempo engloba três factores importantes: bom sinal, rapidez na medição e menor espalhamento. Isto é, apresenta um bom sinal de fluorescência com uma banda bem definida, é um sinal que se mede mais rapidamente comparando com os valores que o sucedem (250 – 350ms) e, por último, neste tempo de integração há menor espalhamento comparando com os tempos que o sucedem. Este espalhamento acontece devido à luz de excitação (LED de 505 nm) que, com o aumento do tempo de integração, aumenta o espalhamento da luz, podendo interferir na fluorescência.

De modo a perceber mais facilmente o comportamento de cada um dos três géis num tempo de integração de 200 ms, elaborou-se o gráfico representado na figura 19, que relaciona a intensidade de fluorescência de cada um dos três géis com a sua concentração em rodamina B.

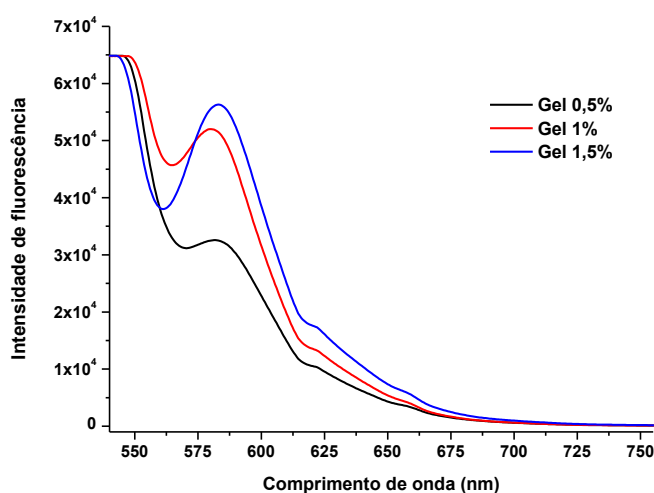


**Figura 19.** Gráfico da intensidade de fluorescência pela concentração de rodamina B em cada um dos três géis num comprimento de onda de 600 nm, num tempo de integração de 200 ms.

De acordo com a visualização deste gráfico, assim como dos anteriores, observa-se que este método apresenta limitações para grandes concentrações de API.

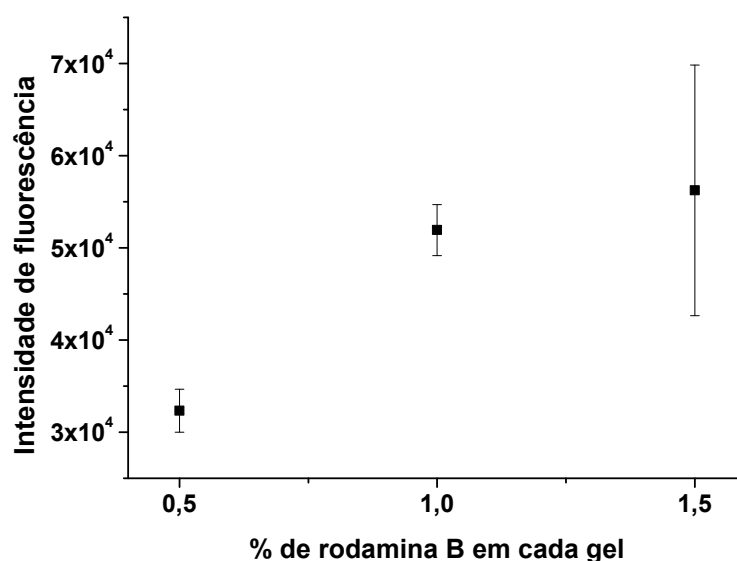
#### 4. Determinação da quantidade que permeou

Este estudo iniciou-se com a colocação de cada uma das formulações em três pedaços de pele, deixou-se permear durante 60 minutos. Após esse tempo limpou-se o excesso de gel que não permeou a pele com algodão embebido em água e mediu-se a fluorescência num tempo de integração de 200ms. O processo foi repetido para os restantes géis e os resultados obtidos encontram-se nos gráficos da figura 20.



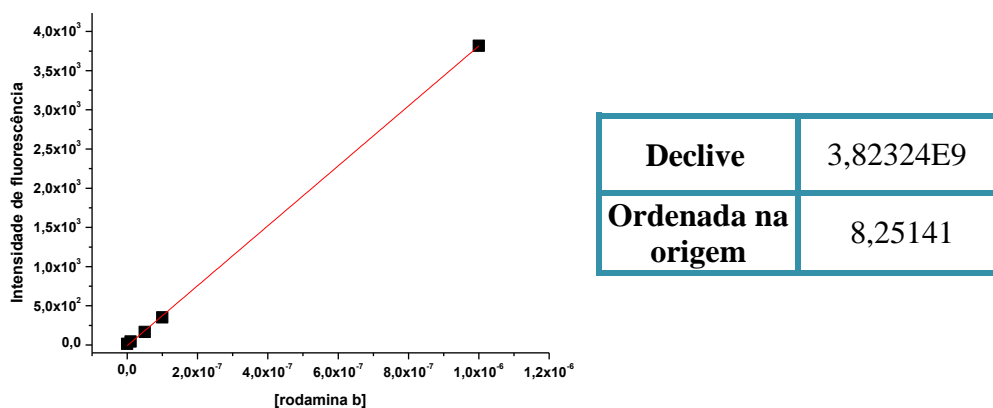
**Figura 20.** Gráficos da média da intensidade de fluorescência das três repetições de cada um dos três géis. Tempo de integração de 200ms e LED de 505 nm.

Como para cada gel foram feitas três repetições, foi necessário determinar o erro para cada um. Esse resultado pode ser visível na figura 21. De acordo com este gráfico, verifica-se que há um erro muito elevado para o gel mais concentrado, o de 1,5% de rodamina B. Este resultado pode ser explicado com o efeito de filtro interno, já referido anteriormente.



**Figura 21.** Gráfico da média da intensidade de fluorescência das três repetições de cada um dos três géis com erro.  $\lambda = 585\text{nm}$ .

Seguidamente, e de modo a determinar a concentração de rodamina B que permeou a pele foi necessário fazer uma biópsia seguida de extração, experiências efectuadas segundo o ponto 2.5. Para cada pedaço de pele efectuou-se uma biópsia, num total de 9. Os resultados foram lidos no leitor de microplacas, e, em simultâneo, leram-se também os valores de intensidade de fluorescência da curva de calibração, uma vez que foi necessário obter o valor do declive e da ordenada na origem da curva de calibração para determinar a concentração de rodamina b que permeou a pele. Essa curva encontra-se na figura 22, assim como os valores obtidos para o declive e a ordenada na origem.



**Figura 22** – Curva de calibração e respectiva tabela. Nesta tabela encontram-se os valores obtidos para o declive e para a origem.

Definidos os valores do declive e da ordenada na origem, segue-se a determinação da concentração de rodamina B que permeou a pele. Esse valor pode ser obtido a partir da equação da recta – equação (3) e, mais directamente pela equação (4).

$$Y = mx + b \quad \text{Equação (3)}$$

$$\Leftrightarrow \text{Intensidade de fluorescência} = \text{Declive} * [\text{Rodamina B}] + \text{Origem}$$

Sendo assim,

$$[\text{Rodamina B}] = \frac{\text{Intensidade de fluorescência} - \text{Origem}}{\text{Declive}} \quad \text{Equação (4)}$$

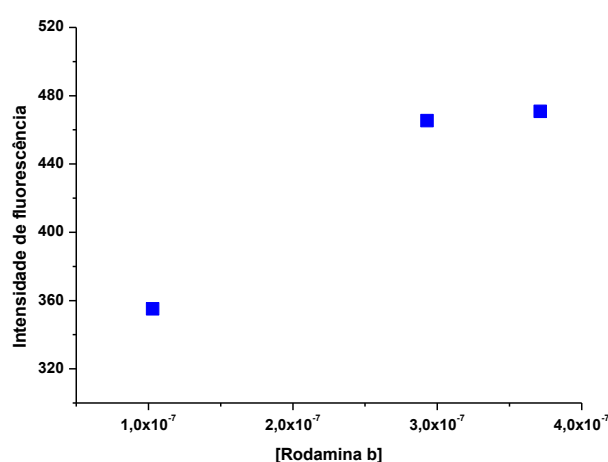
De acordo com os dados obtidos anteriormente (declive e valor na origem), e utilizando as equações (3) e (4) obtém-se o valor da concentração da rodamina que permeou a pele para cada gel. Através da concentração calculou-se a quantidade de Rh B que permeou a pele. Esses resultados e os respectivos erros das três repetições encontram-se na tabela 4.

**Tabela 4.** Valores obtidos pela média das três repetições de cada gel: a intensidade de fluorescência da extracção; a concentração de rodamina B obtida através da extracção em etanol; quantidade de rodamina B que permeou a pele ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ).

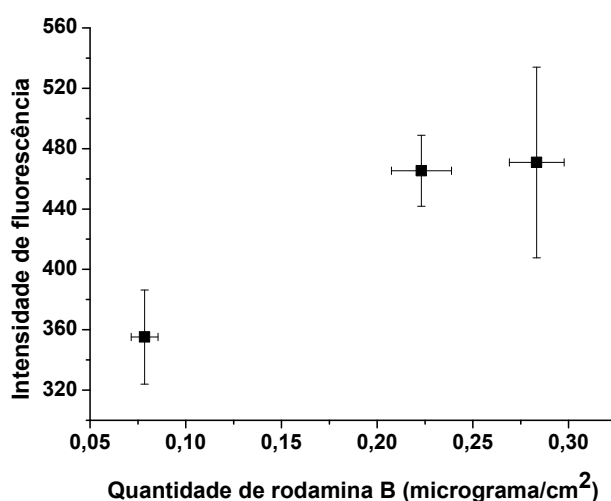
	<b>Intensidade de Fluorescência</b>	<b>[Rodamina B]</b>	<b>Quantidade de rodamina B (<math>\mu\text{g}/\text{cm}^2</math>)</b>
<b>Gel 0,5%</b>	$\bar{x} = 355,166 \pm 31,139$	$\bar{x} = 1,030\text{E-}7\text{M} \pm 9,316\text{E-}9$	$0,0785 \pm 0,007$
<b>Gel 1%</b>	$\bar{x} = 465,333 \pm 23,531$	$\bar{x} = 2,929\text{E-}7\text{M} \pm 2,052\text{E-}8$	$0,2231 \pm 0,016$
<b>Gel 1,5%</b>	$\bar{x} = 470,833 \pm 63,219$	$\bar{x} = 3,714\text{E-}7\text{M} \pm 1,882\text{E-}8$	$0,2833 \pm 0,014$

A punção com a qual se efectuou a biópsia originou pedaços de pele com área de 0,1256 cm<sup>2</sup>. Sendo assim, e recorrendo aos valores da concentração de rodamina B da tabela 4, obtém-se o valor da quantidade de rodamina B que permeou a pele, em µg/cm<sup>2</sup>, como se pode verificar também na tabela 4.

De modo a poder comparar os dados da tabela 4, intensidade de fluorescência da extracção vs. concentração de rodamina B e intensidade de fluorescência vs. quantidade de rodamina B, traçaram-se os gráficos que se encontram nas figuras 23 e 24, onde cada ponto corresponde a um gel, iniciando no de 0,5% e terminando no de 1,5%.



**Figura 23** - Gráfico da intensidade de fluorescência em função da concentração da rodamina B. Cada ponto representa um gel, iniciando-se no gel de 0,5% e terminando no de 1,5%.



**Figura 24** - Gráfico da intensidade de fluorescência em função da quantidade de rodamina B que permeou a pele. Cada ponto representa um gel, iniciando-se no gel de 0,5% e terminando no de 1,5% com respectivos erros.



De acordo com a figura 23, e como era espectável, à medida que aumenta a concentração de rodamina B no gel, aumenta também a intensidade de fluorescência, e, conseqüentemente aumenta a quantidade de rodamina B (figura 24) que permeou a pele. Através da figura 24 consegue-se concluir isso mesmo. No entanto, no caso da intensidade de fluorescência este aumento não é linear, como se verifica quando se passa do gel de 1% de API para 1,5% esse aumento é muito menor que o anterior (0,5% para 1%). Deste resultado conclui-se que a concentração de rodamina B no gel saturou, isto é, por muito que se continue a concentrar o API no gel, a intensidade de fluorescência não vai aumentar, como já foi visto anteriormente. Relativamente à quantidade de rodamina B que permeou a pele há uma linearidade no seu aumento.

Comparando os resultados obtidos pelo aparelho portátil de fluorescência (figura 13), com os obtidos na extração (tabela 4), conseguimos perceber que a intensidade de fluorescência é menor para o gel menos concentrado (0,5%), como era de esperar. Relativamente aos resultados obtidos para os dois géis mais concentrados é de notar que não há uma diferença muito grande nos valores de intensidade de fluorescência, o que pode ser justificado com o que foi dito no parágrafo anterior.

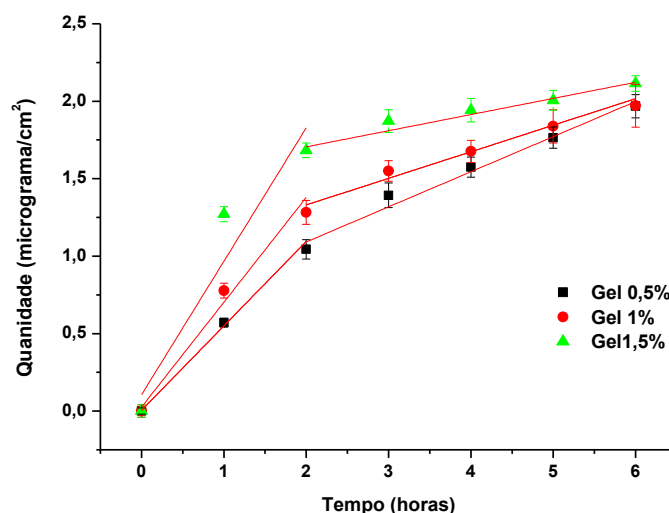
## 5. Células de Franz

Os estudos de difusão têm como objectivo calcular a quantidade de fármaco (Rh B) que se liberta da formulação de entrega. Desta forma é possível estimar a biodisponibilidade da rodamina B e, através de modelação matemática, determinar o mecanismo do perfil de libertação do fármaco.

Os métodos *in vitro*, com membranas de celulose, por exemplo, são bastante utilizados nas fases iniciais dos estudos de difusão, devido ao baixo custo, tempo e reprodutibilidade. Estes métodos precedem os estudos clínicos convencionais e dão um importante contributo para a caracterização das formulações tópicas, uma vez que recorrem a técnicas analíticas modernas que não implicam gastos económicos elevados. No entanto, estes métodos não reproduzem exactamente a difusão *in vivo*, mas, no entanto, são uma alternativa para quando se pretende otimizar a composição da formulação e estudar as interacções entre os excipientes.

### 5.1. Membranas de celulose

Neste estudo foram analisados os perfis de libertação da rodamina B das formulações contendo diferentes concentrações de fármaco (0,5%, 1% e 1,5%) num total de 6 horas. Os resultados obtidos encontram-se na figura 25.



**Figura 25** – Gráfico representativo do perfil de libertação da rodamina B para a membrana de celulose de cada um dos três géis com diferentes concentrações de API durante 6 horas.

Observando o gráfico da figura anterior, verifica-se que os três géis apresentam um comportamento semelhante, uma vez que há uma libertação inicial rápida de Rh B na primeira hora, até que esse aumento vai sendo progressivamente menor. O efeito de libertação rápida pode ser produzido por diversos efeitos, como por exemplo pelo inchamento rápido das membranas de celulose em contacto com o meio de libertação, assim como se pode dever à presença de uma elevada concentração de fármaco na superfície da membrana.

No entanto, como era espectável, quanto maior a concentração de API no gel, maior será a quantidade libertada na membrana.

Através deste gráfico pode-se determinar o fluxo de rodamina B através da membrana de celulose. De acordo com a equação 2, o fluxo (J) é determinado pelo declive da recta. No entanto, como a libertação inicial é mais rápida, concluiu-se que existem, para cada gel,

duas velocidades de fluxo, dependendo do tempo. Esses valores são apresentados na tabela 5.

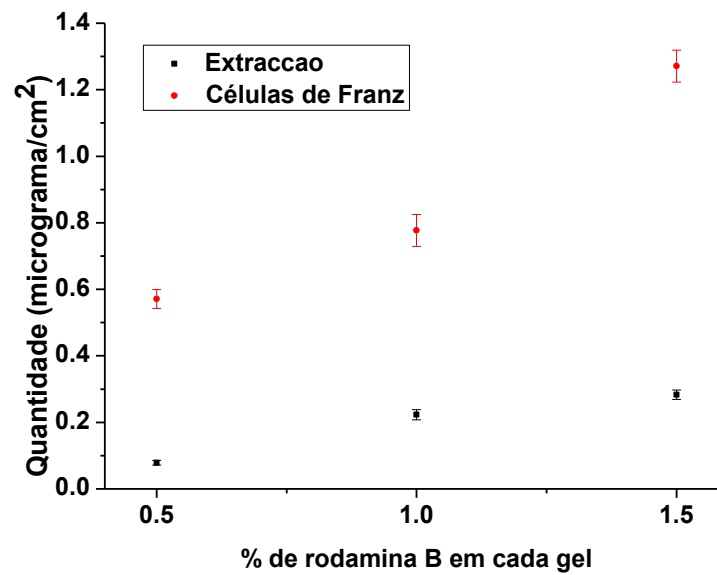
**Tabela 5.** Valores de fluxo obtidos através das células de Franz, segundo a equação do fluxo.

	<b>Fluxo (<math>\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}</math>) Tempo 1</b>	<b>Fluxo (<math>\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}</math>) Tempo 2</b>
<b>Gel 0,5%</b>	0,54	0,23
<b>Gel 1%</b>	0,68	0,17
<b>Gel 1,5%</b>	0,86	0,10

De acordo com a tabela 5 verifica-se que inicialmente (Tempo 1: das 0h às 2h de libertação) a libertação é bastante rápida, reflectindo-se no valor do fluxo. Após esse tempo (Tempo 2: das 2h as 6h) a libertação é mais lenta, reflectindo-se igualmente no valor do fluxo.

Verifica-se que inicialmente (Tempo 1) o fluxo aumenta com a concentração de rodamina B no gel, no entanto, para o Tempo 2 isso já não acontece. Conclui-se então que o aumento do fluxo não é proporcional com o aumento da concentração de rodamina B no gel, o pode acontecer devido à velocidade do Tempo 1 ser muito elevada, provocando uma lotação nos espaços disponíveis na membrana, e uma consequente diminuição na velocidade seguinte (Tempo 2) por esse mesmo motivo, os espaços já se encontrarem todos preenchidos.

De modo a comparar os dois métodos pelos quais se efectuou uma análise quantitativa, desenvolveu-se o gráfico 25, onde é visível a quantidade de API que permeou a pele (obtida pela extracção) e a quantidade libertada (nas células de Franz) de acordo com cada gel ao fim de 60 minutos.



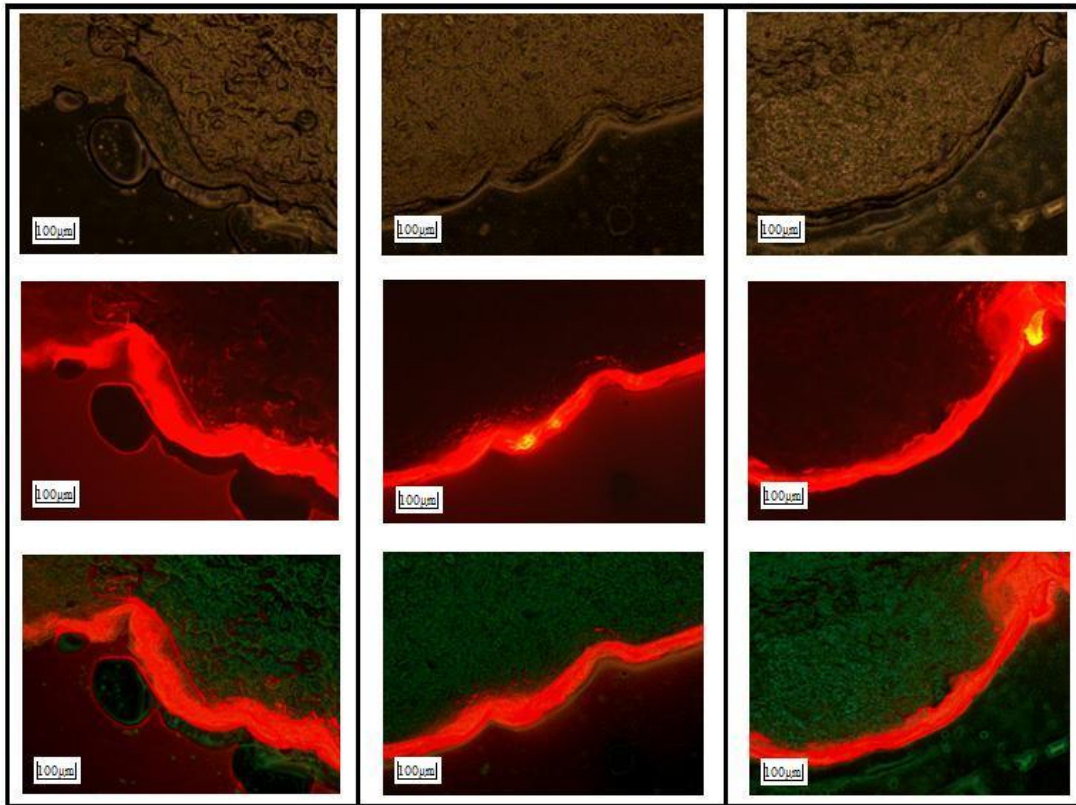
**Figura 26** – Gráfico da quantidade de rodamina B que permeou a pele (no caso da extração) e da libertação nas membranas de celulose (no caso das células de Franz) para cada gel com respectivos erros. Os dados são relativos a 1h de permeação (libertação).

Conclui-se então que para ambos os casos, um aumento da percentagem de Rh B no gel, provoca um aumento da quantidade permeada/libertada na pele/membrana. No entanto, a quantidade libertada na membrana é muito superior à que permeia a pele, uma vez que a pele é uma estrutura muito complexa no que diz respeito à permeação, inclusive o facto de não ser uma estrutura homogénea.

## 6. Microscopia de fluorescência

Através da microscopia de fluorescência analisaram-se as lâminas que foram elaboradas no criostato, como já foi referido anteriormente.

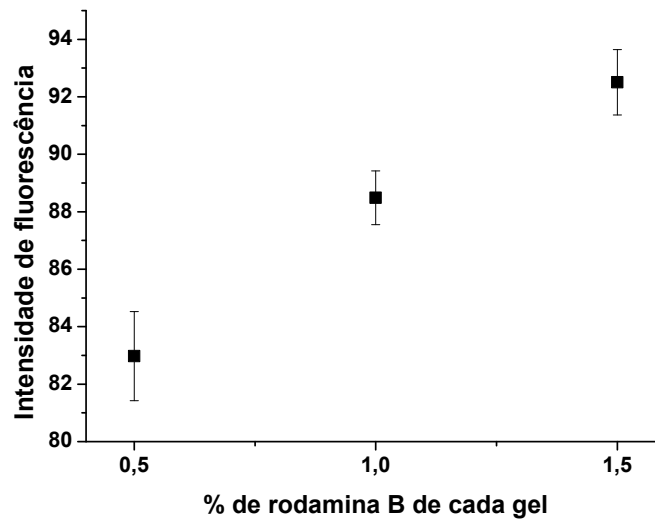
Após a análise de várias amostras de pele, foram escolhidas as melhores imagens, isto é, as imagens em que devido ao corte é facilmente visível a permeação da rodamina B na pele. Essas imagens encontram-se na figura 27.



**Figura 27** – Imagens obtidas através do microscópio de fluorescência. A primeira coluna diz respeito ao gel de 0,5%, a segunda ao de 1% e a terceira e última ao de 1,5%. A primeira fila corresponde à imagem morfológica, a segunda à fluorescência e a terceira é uma mistura das duas anteriores.

Para cada gel foram obtidas três imagens: a morfológica que está representada na primeira linha da figura 27; a de fluorescência que foi obtida com uma excitação entre 480-550nm num tempo de integração de 500ms, que se encontra na segunda linha; uma mistura das duas imagens anteriores encontra-se na última linha.

Através do uso do programa ImageJ, programa usado para o tratamento destas imagens, conseguiu-se determinar a intensidade de fluorescência de cada imagem. Para isso selecionou-se uma área de cerca de  $0,4\text{cm}^2$  da zona laranja das figuras da segunda fila (correspondentes às de fluorescência) e determinou-se essa mesma intensidade. Para cada imagem (para cada gel) foram feitas três repetições. Os resultados estão visíveis na figura 28, assim como os respectivos erros.

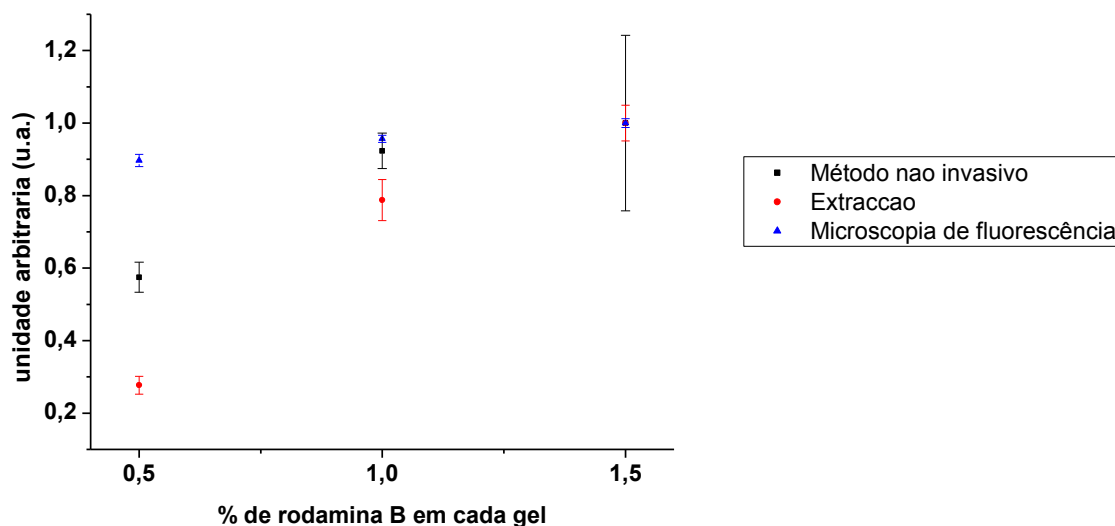


**Figura 28.** Gráfico da intensidade de fluorescência para cada um dos géis de acordo com os resultados obtidos na microscopia de fluorescência com respectivos erros.

Analisando assim as imagens que se encontram na figura 27, concluímos que a rodamina B permeou a pele e que se encontra no SC, uma vez que o SC tem uma espessura média de 10-20 $\mu$ m como já foi referido anteriormente e, segundo a escala da figura esta é uma conclusão que pode ser retirada. De acordo com a figura 28, há linearidade entre a fluorescência obtida pelo microscópio e a concentração, isto é, a intensidade de fluorescência aumenta com o aumento da concentração do gel.

## 7. Comparação entre os três métodos em pele

De modo a comparar mais facilmente os três métodos onde se fez um estudo em pele, intensidade de fluorescência pelo método não invasivo, extracção e microscopia de fluorescência, desenvolveu-se o gráfico presente na figura 29.

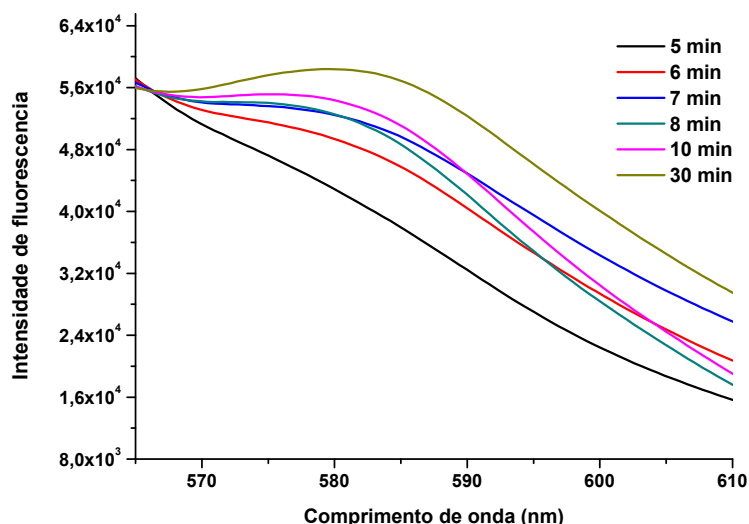


**Figura 29.** Gráfico da intensidade de fluorescência do método não invasivo, da quantidade de rodamina B que permeou a pele e da intensidade de fluorescência medida através da microscopia de fluorescência para cada gel.

De acordo com este gráfico pode-se concluir que, como era espectável, à medida que se aumenta a percentagem de Rh B no gel, aumenta também a quantidade permeada na pele e a intensidade de fluorescência. No entanto, e como já se viu anteriormente, no caso do método não invasivo existe um grande erro associado a grandes concentrações.

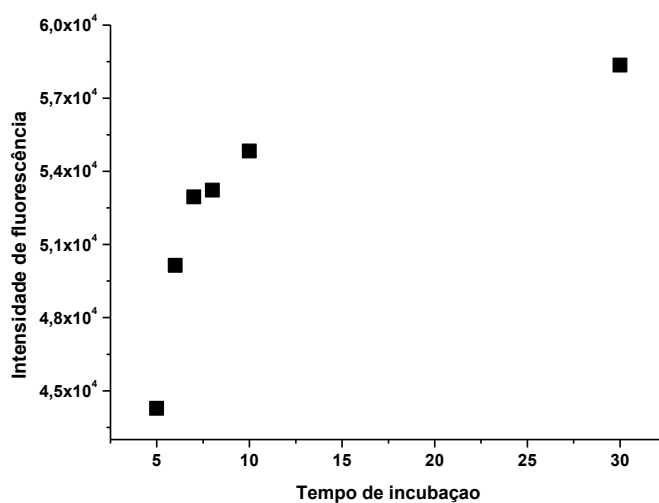
## 8. Determinação dos limites da técnica

De modo a definir os limites desta técnica desenvolveu-se um gel semelhante aos anteriores mas apenas com 0,1% de API (5 vezes menos concentrado que o gel como menos concentração). O estudo baseou-se na colocação de 0,2ml de gel em seis pedaços de pele de leitão e deixou-se permear durante vários tempos. O resultado está presente na figura 30.



**Figura 30.** Gráfico da intensidade de fluorescência do gel de 0,1%, num tempo de integração de 200ms para diferentes tempos de incubação. Para este estudo foi utilizado um LED de 505nm.

De acordo com a análise do gráfico anterior conclui-se que há permeação do gel a partir dos 10 minutos, uma vez que para esse tempo de incubação a curva do gráfico anterior apresenta-se bem definida e com um comportamento ligeiramente diferente das anteriores. Comparando por exemplo com a curva do minuto 5 consegue-se perceber a diferença, visto esta curva não apresentar sinais de permeação. De modo a perceber o aumento da intensidade de fluorescência com o tempo de incubação, desenvolveu-se o gráfico que se encontra na figura 31.



**Figura 31.** Gráfico da intensidade de fluorescência do gel de 0,1% pelo tempo de incubação, num tempo de integração de 200ms. Dados relativos ao comprimento de onda de 578nm. Para este estudo foi utilizado um LED de 505nm.



Concluiu-se assim que a quantidade de rodamina B que permeia a pele é detectada (através desta técnica) a partir de um tempo de incubação de 10 minutos para um gel que apresenta uma concentração de rodamina B de 0,1%. Este foi o tempo escolhido com base no gráfico que se encontra na figura 30. No geral, verifica-se que há permeação de um gel na pele quando a correspondente curva de fluorescência possui uma banda onde é suposto haver fluorescência, num determinado comprimento de onda. Neste caso, a cerca de 590nm (comprimento de onda onde há fluorescência) não há variação nas curvas até 8 minutos. Comparativamente, a 30 minutos há uma curva bem definida, com uma banda a cerca de 590nm, sinónimo de permeação de gel na pele. Relativamente à curva dos 10 minutos verifica-se uma mudança de comportamento comparando com os minutos anteriores, visto haver o surgimento de uma pequena banda neste comprimento de onda.

Conclui-se assim que é a partir deste tempo de incubação que a permeação da rodamina B na pele é detectada.

# Capítulo IV

*Conclusão*

## 1. Conclusão

Será possível utilizar uma metodologia totalmente não invasiva baseada na detecção de fluorescência para determinar pelo menos semi-quantitativamente (determinação de quantidades absolutas ou de quantidades relativas) a quantidade de uma substância activa entregue na pele?

Para verificar se tal seria possível desenvolveu-se um gel com uma substância activa modelo fluorescente. Escolheu-se a rodamina B porque é fluorescente e tem massa e propriedades de polaridade parecidas a substâncias activas relevantes. Esta metodologia foi também desenvolvida com o propósito de ser usada como método para testar *in vivo*, não invasivamente e de forma rápida, as potencialidades de entrega de uma dada formulação. Poder-se-ia usar apenas uma pequena concentração de rodamina B e testar várias formulações, para ver a que libertava melhor. É claro que isto pressupõe que resultados com a utilização de um elemento activo (rodamina B) são transponíveis para um outro (algo que é controverso).

Fez-se um gel (com distintas concentrações de rodamina B). Optimizou-se alguns parâmetros da metodologia (remoção do gel, tempo de exposição, tempo de recolha, etc). Ultrapassou-se problemas como o do filtro interno.

Utilizou-se técnicas complementares para determinar a quantidade de elemento activo que foi entregue (extração e determinação da quantidade de rodamina B). Isto para comparar com os resultados obtidos pelo método não invasivo. Adicionalmente utilizou-se microscopia de fluorescência e células de Franz (com membranas de celulose).

Nos estudos efectuados com a intenção de otimizar o método de fluorescência verificou-se que o tempo de exposição do gel na pele que garantia uma maior permeação e consequente um maior sinal de fluorescência é em 60 minutos. Resultados demonstraram que o melhor método para limpar o excesso de gel da superfície da pele é um pedaço de algodão embebido em água, uma vez que apos a limpeza a pele perde a coloração cor-de-rosa típica do gel de rodamina B, o que indica que a superfície da pele se encontra perfeitamente limpa; as duas repetições que se fizeram mostram resultados concordantes no que diz respeito à fluorescência medida; a água não é um promotor de absorção; a análise quantitativa que se fez mostrou resultados concordantes e aceitáveis. Relativamente

à escolha do tempo de integração de medição da fluorescência concluiu-se que 200ms é o tempo adequado, uma vez que se obtêm bons resultados para esse tempo.

Nas experiências levadas a cabo com a finalidade de determinar a quantidade de rodamina B que permeou a pele, verificou-se que a concentração de API presente no gel é proporcional à quantidade de composto que permeia a pele, aumentando de modo não linear, isto porque a concentração de rodamina B no gel acaba por saturar para elevadas concentrações. O gel 0,5% apresenta uma quantidade permeada de  $0,0786 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ; o gel 1% apresenta  $0,2231 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ; o gel 1,5% apresenta  $0,2833 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ . No entanto, os resultados obtidos pelo aparelho portátil de fluorescência não aumentam linearidade, sendo 355 para o gel menos concentrado, 465 para o gel que apresenta concentração intermédia e 471 para o gel mais concentrado. Este resultado pode estar relacionado com o efeito de filtro interno, provocado por concentrações muito elevadas da rodamina B.

De acordo com os resultados obtidos nas células de Franz em membrana de celulose, e como era espectável, quanto maior a concentração de API no gel, maior será a sua quantidade libertada na membrana. No entanto, o fluxo de cada gel apresenta duas velocidades: das 0h as 2h a libertação é mais rápida, o fluxo é maior, havendo uma velocidade de libertação maior (aumenta com o aumento da concentração de Rh B no gel); das 2h as 6h a libertação é mais lenta, o fluxo diminui e a velocidade de libertação é menor (o fluxo diminui com o aumento da concentração do API no gel). Isto pode acontecer devido à lotação inicial da membrana.

Os resultados qualitativos obtidos através da microscopia de fluorescência demonstram que o fluoróforo permeou o estrato córneo. Conseguem-se observar este resultado através das imagens obtidas e comparando a escala das mesmas com o facto de o SC apresentar uma espessura variável entre 10 a 20  $\mu\text{m}$ . Conclui-se ainda que a intensidade de fluorescência foi proporcional ao aumento da concentração: 81,89 e 91.

No que diz respeito ao teste de limite de fluorescência concluiu-se que esse limite se encontra para um gel de 0,1% de rodamina b num tempo de incubação de 10 minutos, uma vez que só a partir desse tempo há fluorescência a cerca de 590nm.

Relativamente ao método não invasivo, e como conclusão geral deste projecto, concluiu-se que é uma técnica que pode ser utilizada para quantificação relativa e que vale a pena ser explorada num outro estudo. No entanto, a reprodutibilidade pode ser um problema (no entanto pode ser minimizada fazendo várias repetições).

### **1.1. Perspectivas Futuras**

No futuro seria interessante desenvolver vários géis com o mesmo API (fluoróforo) na mesma concentração em todos os géis. Esses géis apenas iriam variar nos seus excipientes, e seria assim estudado o veículo por fluorescência, de modo a definir qual o que possuía melhores características. No futuro, quando alguém pretendesse estudar um API (não fluorescente), escolhia-se um fluoróforo que possuísse as mesmas características (MM, log P, entre outras) que esse API que se pretendia estudar e desenvolvia-se um gel com esse API (o tal gel que foi considerado com melhores características). O objectivo era generalizar o método.

# **Capítulo V**

## ***Bibliografía***

## 1. Bibliografia

- [1] Zadymova, N.; “Colloidochemical aspects of transdermal drug delivery (review)” *Colloid Journal*, Vol.75, Nº 5, p. 491-503 (2013)
- [2] Summerfield, A., Meurens, F., Ricklin, M.; “The immunology of the porcine skin and its value as a model for human skin” *Molecular Immunology*, Vol. 66, p. 14-21 (2015)
- [3] Walters, K., Roberts, M.; “Dermatological and transdermal formulations” Marcel Dekker, New York (2002)
- [4] G. M. El Maghraby, B. W. Barry, A. C. Williams; “Liposomes and skin: From drug delivery to model membranes” *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, Vol. 34, p. 203-222 (2008)
- [5] Estrutura da pele. Disponível em: <<http://imgkid.com/blank-skin-structure.shtml>> Acesso em 12 de Junho de 2015
- [6] Feldman, C.; “VITAMIN D” Elsevier, Vol.1 (2005)
- [7] Riviere, J. E.; “Dermal absorption models in toxicology and pharmacology” CRC Press, Boca Raton (2006)
- [8] Rinnerthaler, M.; Streubel, M. K., et all; “Skin aging, gene expression and calcium” *Experimental Gerontology*, Vol.68, p.59-65 (2015)
- [9] Esquematização do processo de diferenciação. Disponível em: <<http://www.headandneckcancerguide.org/adults/introduction-to-head-and-neck-cancer/skin-cancer/anatomy/>> Acesso em 15 de Junho de 2014
- [10] Addor, D., Aoki, V.; “Barreira cutânea na dermatite atópica” *Anais Brasileiros de Dermatologia*, Vol. 85, p.184-194 (2010)
- [11] Jepps, O. G., Dancik Y., et all; “Modeling the human skin barrier – Towards a better understanding of dermal absorption” *Advanced Drug Delivery Reviews*, Vol. 65, p. 152-168 (2013)
- [12] Kadhemy, M., Alsharnee, I., Al-Zuky; “Analysis of the effect of the concentration of Rhodamine B in ethanol on the fluorescence spectrum using the “Gauss Mod” function” *Journal of Physical Science*, Vol. 22, p. 77-86 (2011)

- [13] Wiedersberg, S., Leopold, C., Guy, R. H.; “Bioavailability and bioequivalence of topical glucocorticoids” *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, Vol. 68, p. 453-466 (2008)
- [14] Poet, S., McDougal, N.; “Skin absorption and human risk assessment” *Chemio-biological Interactions*, Vol. 140, p.19-34 (2002)
- [15] LeBleu, V., McDonald, B., Kalluri, R.; “Structure and Function of Basement Membranes” *Experimental Biology and Medicine*, Vol. 232, p. 1121-1129 (2007)
- [16] Baek, H., Lee, S., et all; “Subungual Tumors: Clinicopathologic Correlation with US and MR Imaging Findings” *RadioGraphics*, Vol. 30, p. 1621-1636 (2010)
- [17] Caputo, M., Cametti, C.; “The memory formalism in the diffusion of drugs through skin membrane” *Journal of Physics D: Applied Physics*, Vol. 42, p. 1-7 (2009)
- [18] Esquema das três possíveis vias de difusão de fármacos na pele. Disponível em: <http://www.pharmaresearchjournal.com/transdermal-drug-delivery-system-tdds/> Acesso em 18 de Junho de 2015
- [19] Ramachandran, C., Fleisher, D.; “Transdermal delivery of drugs for the treatment of bone diseases” *Advanced Drug Delivery Reviews*, Vol. 42, p. 197-223 (2000)
- [20] Prausnitz, M., Langer, R.; “Transdermal Drug Delivery” *Nature Biotechnology*, Vol. 26, p. 1261-1268 (2008)
- [21] N’Da, D.; “Prodrug Strategies for Enhancing the Percutaneous Absorption of Drugs” *Molecules*, Vol. 19, p. 20780-20807 (2014)
- [22] Uchechi, O., Ogbonna, J., Attama, A.; “Nanoparticles for Dermal and Transdermal Drug Delivery” *InTech*, Vol. 6, p. 193-235 (2014)
- [23] Paudel, K., Milewski, M., et all; “Challenges and opportunities in dermal/transdermal delivery” *Ther Deliv.*, Vol. 1, p. 109-131 (2010)
- [24] Bruno, B., Miller, G., Lim, C.; “Basics and recent advances in peptide and protein drug delivery” *Ther Deliv.*, Vol. 4, p. 1443-1467 (2013)
- [25] Couto, A., Fernandes, R., et all; “Dermic diffusion and stratum corneum. A state of the art review of mathematical models” *Journal of Controlled Release*, Vol. 177, p. 74-83 (2014)



- [26] Peck, T., Hill, S., Williams, M.; “Pharmacology for Anaesthesia and Intensive Care” Cambridge (2008)
- [27] Hilley, A., Lloyd, A., Swarbrick, J.; “Drug delivery and targeting for pharmacists and pharmaceutical scientists” Taylor & Francis (2005)
- [28] Silva, J.A., Apolinário, A.C., et al; “Administração cutânea de fármacos: desafios e estratégias para o desenvolvimento de formulações transdérmicas” Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences, Vol. 3, p. 125-131 (2010)
- [29] Phua, S., Liu, B., et al; “Visualizing molecular diffusion through passive permeability barriers in cells: conventional and novel approaches” Elsevier, Vol. 17, p. 1-9 (2013)
- [30] Células de Franz. Disponível em: < <http://www.permegear.com/primer.pdf>> Acesso em 14 de Julho de 2015
- [31] Weiss, L., Gilbert, H., Posner, J.; “Brain Metastasis” G. K. Hall & Co. (2012)
- [32] Lin, J., Lu, A.; “Role of Pharmacokinetics and Metabolism in Drug Discovery and Development” Pharmacological Reviews, Vol. 49, p. 403-449 (1997)
- [33] Bartosova, L., Bajgar, J.; “Transdermal Drug Delivery *in vitro* Using Diffusion Cells” Current Medicinal Chemistry, Vol. 19, p. 4671-4677 (2012)
- [34] Rehman K, Zulfakar MH; “ Recent advances in gel technologies for topical and transdermal drug delivery” Drug Development and Industrial Pharmacy, Vol. 40, p. 433-440 (2014)
- [35] Piyush Gupta, Kavita Vermani and Sanjay Garg; “Hydrogels: from controlled release to pH-responsive drug delivery” Drug Discovery Today, Vol.7, p. 569-579 (2001)
- [36] Chicott, R., Prince, S.; “Principles and Practice of Skin Toxicology” Wiley (2008)
- [37] Savjanj, K., Gaijar, A., Savjani, J.; “Drug Solubility: Importance and Enhancement Techniques” ISRN Pharmaceutics, p. 1-10 (2012)
- [38] Manadas, R., Pina, M. E., Veiga, F.; “A dissolução *in vitro* na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada” Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, Vol. 38, Nº 4, p. 375-399 (2002)
- [39] Rutkowska, E., Pajak, K., Jozwiak, K.; “Lipophilicity – Methods of Determination and its Role in Medical Chemistry” Vol. 70, p. 3-18 (2013)

- [40] Donnelly, R., Singh, T., Morrow, D., et al; “Microneedle-Mediated Transdermal and Intradermal Drug Delivery” Wiley Blackwell (2012)
- [41] Wang, J., Douville, N., et al; “Quantitative Analysis of Molecular Absorption into PDMS Microfluidic Channels” *Annals of Biomedical Engineering*, Vol. 30, p. 1862-1873 (2012)
- [42] Water, T., Staecker, H.; “Otolaryngology – Basic Science and Clinical Review” Thieme (2011)
- [43] Freitas, P., Simões. A.; “Lasers in Dentistry” Wiley Blackwell (2015)
- [44] Profundidade de penetração da luz na pele. Disponível em: <[http://missionignition.net/bms/led\\_heal.php](http://missionignition.net/bms/led_heal.php)> Acesso em 23 de Julho de 2015
- [45] Patonay, G.; “Advances in near-infrared measurements” Jai Press, LTS. (1993)
- [46] Sjoback, R., Nygren, J., Kubista, M.; “Absorption and fluorescence properties of fluorescein” *Spectrochimica Acta Part A*, Vol. 51, p. L7-L21 (1995)
- [47] Ferreira, L., Pereira, S.; “Fluorescence quantum yield evaluation of strongly absorbing dye solutions as a function of the excitation wavelength” *Journal of Photochemistry and Photobiology*, Vol. 55, p. 361-376 (1991)
- [48] Budavari, S.; “The Merck Index – Encyclopedia of Chemicals , Drugs and Biologicals” Merck and Co. (1989)
- [49] Povrozin, Y., Terpetschnig, E.; “Measurement of fluorescence quantum yields on ISS instrumentation using vinci” *Fluorescence and Biomedical Instrumentation* (2015)
- [50] Martins, M., Veiga, F.; “Promotores de permeação para a libertação transdérmica de fármacos: uma nova aplicação para as ciclodextrinas” *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, Vol. 38, p. 33-54 (2002)
- [51] Barry, B.; “Breaching the skin’s barrier to drugs” *Nature Biotechnology*, Vol. 22, p. 165-167 (2001)
- [52] Lane, M.; “Skin penetration enhancers” *International Journal of Pharmaceutics*, Vol. 447, p. 12-21 (2013)
- [53] Sangster, J.; “Octanol-Water Partition Coefficients of Simple Organic Compounds” *Journal of Physical Chemistry*, Vol. 18, p. 1111-1229 (1989)

- [54] Jadhav, R.; “A review on hydrogel as drug delivery system” World Journal of Pharmaceutical Research, Vol. 4, p. 578-599 (2015)
- [55] Maitra, J., Shukla, V.; “Cross-linking in Hydrogels – A Review” American Journal of Polymer Science, Vol. 4, p. 25-31 (2014)
- [56] Talukdar, M., Vinckier, I., et al; “Rheological characterization of canthan gum and hydroxypropylmethyl cellulose with respect to controlled-release drug delivery” Journal of Pharmaceutical Sciences, Vol. 85, p. 120-134 (1996)
- [57] Berger, J., Reist, M., et al; “Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications” European Journal of Biopharmaceutics, Vol. 57, p. 19-34 (2004)
- [58] Peppas, N., Bures, P., et al; “Hydrogels in Pharmaceutical formulations” European Journal of Biopharmaceutics, Vol. 50, p. 27-46 (2000)
- [59] “Neutralizing Carbopol<sup>®</sup> and Pemulen<sup>™</sup> Polymers in Aqueous and Hydroalcoholic Systems” Lubrizol, September 16 (2009)
- [60] Estrutura química da trietanolamina. Disponível em: <<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/triethanolamine#section=Top>> Acesso em 5 de Agosto de 2015
- [61] Jui-Chen Tsai, Norman D. Weiner, Gordon L. Flynn, James Ferry; “Properties of adhesive tapes used for stratum corneum stripping” International Journal of Pharmaceutics, Vol. 72, p. 227-231 (1991)
- [62] R. G. van der Molen, F. Spies, J. M. van't Noordende, E. Boelsma, A. M. Mommaas, H. K. Koerten; “Tape stripping of human stratum corneum yields cell layers that originate from various depths because of furrows in the skin” Arch Dermatol Res, Vol. 289, p. 514-518 (1997)