

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**Avaliação de condições experimentais de estudos *in vitro* de  
permeação/retenção cutânea empregando pele suína para creme  
comercial e nanoemulsão contendo penciclovir**

**ALIANISE DA SILVA MEIRA**

**PORTO ALEGRE, 2013**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**Avaliação de condições experimentais de estudos *in vitro* de permeação/retenção cutânea empregando pele suína para creme comercial e nanoemulsão contendo penciclovir**

Dissertação apresentada por **Alianise da Silva Meira** para obtenção do GRAU DE MESTRE em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Nadia Maria Volpato  
Coorientador: Prof. Dr. Helder Ferreira Teixeira

Porto Alegre, 2013

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul a ser apresentada em 29 de abril de 2013, frente à Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dra. Letícia Marques Colomé  
Universidade Federal do Pampa

Profa. Dra. Cássia Virginia Garcia  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Valquiria Linck Bassani  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Meira, Alianise da Silva

Avaliação de condições experimentais de estudos in vitro de permeação/retenção cutânea empregando pele suína para creme comercial e nanoemulsão contendo penciclovir / Alianise da Silva Meira. -- 2013. 118 f.

Orientadora: Nadia Maria Volpato.  
Coorientador: Helder Ferreira Teixeira.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2013.

1. Penciclovir. 2. Nanoemulsão. 3. Validação de método analítico. 4. Permeação/retenção cutânea. 5. Pele suína. I. Volpato, Nadia Maria, orient. II. Teixeira, Helder Ferreira, coorient. III. Título.

Este trabalho foi desenvolvido nos Laboratórios de Controle de Qualidade Farmacêutico (402 e 403) e no Laboratório de Desenvolvimento Galênico (606) da Faculdade de Farmácia da UFRGS



## **AGRADECIMENTOS**

Em especial a Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Nadia Volpato por toda sua orientação durante a execução deste trabalho e também pelo seu exemplo de profissionalismo e competência.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Helder Teixeira, pela oportunidade e orientação.

Aos meus pais, irmã e namorado pelo constante incentivo, amor e apoio nos momentos difíceis.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFRGS, pela oportunidade de aperfeiçoamento científico.

Aos professores do corpo docente da UFRGS, pelos ensinamentos transmitidos.

Aos colegas e amigos do LEPCQ e LCQFar: Lorena, Jaison, Rúbia, Vitor, Amanda, Rita, Márcia, Camila, Mariana, Diogo, Alini, Letícia, Nathalie e Francieli, que de alguma forma colaboraram para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas do LDG principalmente, Débora, Cristiane, Juliana Bidone e Regina pelo auxílio e instruções para o desenvolvimento deste trabalho.

À bolsista de iniciação científica Ana Paula Batistel pela ajuda e compreensão durante todo o desenvolver deste trabalho, sem a qual teria sido muito mais cansativo.

A todos meus amigos fora da instituição que, de uma forma ou outra, contribuíram para a realização deste projeto.





## RESUMO

Estudos *in vitro* de absorção percutânea são uma importante ferramenta para avaliação de formulações semissólidas e transdérmicas. Embora haja um grande número de agências reguladoras preocupadas com a harmonização metodológica, em muitos parâmetros elas permanecem flexíveis e isto é possível verificar na ampla variedade e divergências encontradas na literatura. O objetivo do trabalho foi avaliar parâmetros ainda flexíveis a respeito dos estudos *in vitro* como modo de separação das camadas da pele, permeabilidade da pele congelada (tempo de armazenamento) e diferença de permeabilidade dos locais anatômicos. Os estudos foram conduzidos utilizando células de Franz, pele suína como membrana e formulações (comercializada e inovadora) contendo penciclovir. Inicialmente, nanoemulsões foram preparadas utilizando técnica de homogeneização a alta pressão, caracterizadas, incorporadas em gel de carbômero 940 e avaliadas quanto à liberação tópica em pele suína. Simultaneamente ao desenvolvimento da formulação foi desenvolvido e validado método analítico para quantificação do fármaco nas formulações e nas camadas da pele suína. As nanoemulsões apresentaram-se monodispersas com diâmetro de gotícula em torno de 180-200 nm, potencial zeta de -27 mV e teor de penciclovir de 98% mantendo sua estrutura após a incorporação em carbômero 940. A metodologia analítica demonstrou ter alta sensibilidade (LoQ 0,05 µg/mL), especificidade e uma adequada recuperação do fármaco a partir das matrizes biológicas (90 – 104%). Quanto aos estudos *in vitro* de comparação de metodologias, foi possível observar que, dependendo da solubilidade do fármaco em água e das características da formulação, o método clássico de separação das camadas da pele por imersão em água não é o mais indicado. Já para permeabilidade da pele suína congelada, os resultados obtidos indicam um aumento significativo na penetrabilidade e permeabilidade após um mês de congelamento. Dentre os locais anatômicos testados, não houve diferença entre abdômen e orelha suína desde que obtidos antes do procedimento de escaldado.

**Palavras chave:** penciclovir, nanoemulsão, homogeneização a alta pressão, absorção percutânea, pele suína, separação das camadas da pele por aquecimento



## ABSTRACT

*In vitro* percutaneous absorption studies are an important tool for evaluation of semisolid and transdermal formulations. Although there are a large number of official guides concerned with methodological harmonization in many parameters they remain flexible and it is possible to see the wide variety and differences reported in the literature. The aim of study was to evaluate some parameters regarding the *in vitro* studies as the mode of skin layers separation, skin frozen stability and permeability difference of anatomical sites. These studies were conducted with porcine skin and formulations (conventional and novel) using penciclovir as model drug. Initially, nanoemulsions were prepared using high pressure homogenization, characterized and incorporated into carbomer 940 gel and evaluated for topical delivery using porcine skin. Simultaneously with the development of the formulation, analytical method for quantification of the drug in the formulations and porcine skin layers was developed and validated. The nanoemulsions presented themselves monodisperse with droplet diameter of 180-200 nm, zeta potential of about -27 mV and penciclovir content of 98% maintaining their structure after incorporation into carbomer 940. The analytical methodology was shown to have high sensitivity (LOQ 0.05 µg/mL), specificity and adequate recovery of drug from the biological matrices (90-104%). Regarding the *in vitro* comparison methodologies, it was observed that, depending on the solubility of the drug in water and the characteristics of the formulation, the classical separation is not the most suitable for separation of the skin layers. For the stability of frozen porcine skin, the results indicate a significant increase in permeability and penetrability after one month of freezing. Within the anatomical sites tested, there was no difference between the abdomen and ear porcine skin since obtained before the scald procedure.

**Keywords:** penciclovir, nanoemulsion, high pressure homogenization, percutaneous absorption, porcine skin, heated separation skin layers



## LISTA DE FIGURAS

### Revisão da Literatura

Figura 1. Camadas da pele e caminhos de penetração através da pele.....	300
Figura 2. Célula vertical de difusão de FRANZ. ....	32
Figura 3. Comparação da absorção percutânea <i>in vitro</i> para composto .....	36
Figura 4. Estrutura molecular do penciclovir.....	37
Figura 5. Comparação de espectros FTIR para abdominal suíno, orelha suína e abdome humano (de cima para baixo).....	40



## LISTA DE TABELAS

### **Revisão da Literatura**

Tabela 1. Parâmetros de validação.....	42
--	----





## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO .....	197
REFERÊNCIAS.....	21
OBJETIVOS.....	18
REVISÃO DA LITERATURA .....	27
PELE.....	29
PELE HUMANA E PELE SUÍNA .....	34
NANOEMULSÕES.....	38
ANTIVIRAIS - PENCICLOVIR .....	39
VALIDAÇÃO DE METODOLOGIAS ANALÍTICAS .....	41
REFERÊNCIAS.....	42
CAPÍTULO I.....	47
RESUMO.....	51
REFERENCES.....	52
CAPÍTULO II .....	55
RESUMO.....	59
REFERENCES.....	60
DISCUSSÃO GERAL .....	67
CONCLUSÕES .....	71



---

## INTRODUÇÃO

---



O tratamento de patologias cutâneas pela aplicação direta de uma formulação é fácil, conveniente e geralmente bem aceita pelos pacientes. Mesmo constituindo uma barreira física, a pele tem sido extensivamente utilizada para liberação cutânea e percutânea de fármacos.

O crescente interesse em medicamentos de aplicação na pele deve-se a vantagens como, por exemplo, a possibilidade de terapia sistêmica evitando efeito de metabolismo de primeira passagem e minimizando efeitos adversos (BAROLI, 2010; HENNING *et al.*, 2009; SCHÄFER-KORTING *et al.*, 2007; PROW *et al.*, 2011; WAGNER *et al.*, 2001). No caso de produtos tópicos, estes são projetados para atingir o local de ação no tecido no qual elas são aplicadas fornecendo uma limitada absorção sistêmica (BOIX-MONTANES, 2011).

Nesse contexto, métodos *in vitro* de liberação e/ou permeação cutânea têm sido empregados no desenvolvimento e otimização de produtos farmacêuticos de aplicação na pele (HENNING *et al.*, 2009; WAGNER *et al.*, 2001). O método *in vitro* mais empregado é o sistema de difusão bicompartimental das células de Franz que pode utilizar como membrana pele humana ou animal e artificial (SUPACSS, SCCP, 2006; 2008).

Dentre os tipos de membranas, a pele humana seria preferida para experimentos de penetração *in vitro*, porém, devido à dificuldade de obtenção em quantidades apropriadas, vem sendo substituída por modelos de peles animais. Vários pesquisadores consideram a pele suína como o modelo mais apropriado, uma vez que se assemelha em permeabilidade e composição à pele humana (BARBERO & FRASCH, 2009; BOUDRY *et al.*, 2008; GODIN & TOUITOU, 2007; HENNING *et al.*, 2009; MOSER *et al.*, 2001; SARTORELLI *et al.*, 2000; SCHMOOK *et al.*, 2001). Segundo a Scientific Committee on Consumer Products (SCCP), o local de obtenção da pele varia entre abdômen, perna ou seio para pele humana e abdômen, perna, peito, costas, flancos e orelhas para pele suína (SCCP, 2006; 2008). Broudry e colaboradores relatam costas e abdômen suíno como os locais mais comuns para a obtenção da pele, embora, na atualidade, a orelha suína seja considerada a principal região anatômica para estudos de absorção na pele (BOUDRY *et al.*, 2008).

A infecção pelo vírus *Herpes simplex* (HSV) é uma infecção comum e onipresente da pele que provoca lesões mucocutâneas chamadas herpes simples (herpes labial). Estima-se que cerca de 80% da população mundial seja portadora do vírus HSV e, aproximadamente, 40% sofra de infecções recorrentes (HASLER-NGUYEN *et al.*, 2009).

Para melhor efeito, os medicamentos antivirais devem ser capazes de chegar em concentrações terapêuticas nas células basais epidérmicas, que são o sítio inicial de entrada para a propagação do vírus. Conseqüentemente, a penetração da substância ativa na pele é um dos fatores mais críticos para a terapia bem sucedida com uma formulação tópica para o tratamento de herpes labial (HASLER-NGUYEN *et al.*, 2009).

Assim, a utilização de nanoestruturas no tratamento potencial de doenças locais e sistêmicas, através da pele, vem sendo cada vez mais estudada, devido a sua potencialidade de aumentar a absorção percutânea e permitir uma boa segmentação dos ativos na pele, proporcionando um melhor risco benefício da terapia tópica (SCHÄFER-KORTING *et al.*, 2007; PROW *et al.*, 2011).

Atualmente, há inúmeros trabalhos publicados com desenvolvimento de formulações micro e nanoemulsionadas que utilizam permeação/penetração cutânea *in vitro* como forma de avaliação de seu desempenho.

A normatização de protocolos *in vitro* para avaliação de desempenho de formulações convencionais e nanoestruturadas, tem sido preocupação de diferentes organizações, como a Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) e a Scientific Committee on Consumer Products (SCCP), embora ainda sejam observadas, na literatura, relevantes variações nas condições dos experimentos realizados por diferentes pesquisadores. Assim, o presente trabalho propõe avaliar, experimentalmente, algumas condições empregadas nos estudos de permeação/penetração cutânea *in vitro* através de duas diferentes formulações, uma convencional - presente no mercado - e outra, inovadora – nanoemulsão - utilizando penciclovir como fármaco modelo, com o objetivo de definir melhores condições protocolares para estes estudos.

A dissertação está estruturada em revisão bibliográfica e dois capítulos:

— O capítulo I apresenta os resultados obtidos no estudo de desenvolvimento de hidrogéis contendo penciclovir incorporado em nanoemulsões, validação de método analítico para quantificação do fármaco nas camadas da pele, e estudo preliminar de retenção cutânea para a formulação desenvolvida.

— O capítulo II apresenta os resultados dos estudos *in vitro* de permeação/retenção cutânea desenvolvidos com o objetivo de comparar resultados entre diferentes técnicas usadas por pesquisadores.

## REFERÊNCIAS

Basic Criteria for the *In vitro* Assessment of dermal absorption of cosmetic ingredient, in, **Scientific Committee on Consumer Products**, European Commission (2006).

BARBERO, A.M.; FRASCH, H.F. Pig and guinea pig skin as surrogates for human *in vitro* penetration studies: A quantitative review. **Toxicology in Vitro** 23: 1–13, 2009.

BAROLI, B. Penetration of Nanoparticles and Nanomaterials in the Skin: Fiction or Reality? **Journal of Pharmaceutical Sciences** 99: 21- 50, 2010.

BOIX-MONTANES, A. Relevance of equivalence assessment of topical products based on the dermatopharmacokinetics approach. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 42, p. 173–179, 2011.

BOUDRY, I.; BLANCK, O.; CRUZ, C.; BLANCK, M.; VALLET, V.; BAZIRE, A.; CAPT, A.; JOSSE, D.; LALLEMENT, G. Percutaneous penetration and absorption of parathion using human and pig skin models *in vitro* and human skin grafted onto nude mouse skin model *in vivo*. **Journal of Applied Toxicology** 28: 645–657, 2008.

GODIN, B.; TOUITOU, E. Transdermal skin delivery: Predictions for humans from *in vivo*, *ex vivo* and animal models. **Advanced Drug Delivery Reviews** 59: 1152-1161, 2007.

GOODMAN & GILMAN – **As bases Farmacológicas da Terapêutica**, Editora MAC GRAW HILL – 11<sup>a</sup> Ed:2006

HASLER-NGUYEN, N.; SHELTON, D.; PONARD, G.; BADER, M.; SCHAFFRIK, M.; MALLEFET, P. Evaluation of the *in vitro* skin permeation of antiviral drugs from penciclovir 1% cream and acyclovir 5% cream used to treat herpes simplex virus infection. **BMC Dermatology** 9: 1-10, 2009.

HENNING, A.; SCHAEFER, U.F.; NEUMANN, D. Potential pitfalls in skin permeation experiments: Influence of experimental factors and subsequent data evaluation. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics** 72: 324–331, 2009.

MOSER, K.; KRIWET, K.; NAIK, A.; KALIA, Y.N.; GUY, R.H. Passive skin penetration enhancement and its quantification *in vitro*. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics** 52: 103-112, 2001.

On regulatory aspects of nanomaterials, in, **Scientific Committee on Consumer Products**, European Commission (2008).

PROW, T.W.; GRICE, E.J.; LYNLEE, L.L.; FAYE, R.; BUTLER, M.; BECKER, W.; WURM, E. M.T.; YOONG, C.; ROBERTSON, T. A.; SOYER, H. P.; ROBERTS, M. S. Nanoparticles and microparticles for skin drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews** (2011).

SARTORELLI, P.; ANDERSEN, H.R.; ANGERER, J.; CORISH, J.; DREXLER, H.; GÖEN, T.; GRIFFIN, P.; HOTCHKISS, S.A.M.; LARESE, F.; MONTOMOLI, L.; PERKINS, J.; SCHMELZ, M.; VAN DE SANDT, J.; WILLIAMS, F. Percutaneous penetration studies for risk assessment. **Environmental Toxicology and Pharmacology** 8: 133-152, 2000.

SCHÄFER-KORTING, M.; MEHNERT, W.; KORTING, H. C. Lipid nanoparticles for improved topical application of drugs for skin diseases. **Advanced Drug Delivery Reviews** 59: 427–443, 2007.

SCHMOOK, F.P.; MEINGASSNER, J.G.; BILLICH, A. Comparison of human skin or epidermis models with human and animal skin in in-vitro percutaneous absorption. **International Journal of Pharmaceutics** 215: 51–56, 2001.

WAGNER, H.; KOSTKA, K.H.; LEHR, C.M.; SCHAEFER, U.F. Interrelation of permeation and penetration parameters obtained from *in vitro* experiments with human skin and skin equivalents. **Journal of Controlled Release** 75: 283–295, 2001.

WHO (World Health Organisation) Kielhorn J., Melching-Kollmuß S., Mangelsdorf I. Dermal Absorption. WHO / IPCS Environmental Health Criteria, Draft February 2006.



---

## **OBJETIVOS**

---



## **Objetivo Geral**

Avaliar, experimentalmente, diferentes condições empregadas nos estudos de permeação/retenção cutânea *in vitro* utilizando duas diferentes formulações de um mesmo fármaco antiviral modelo (creme comercial e nanoemulsão desenvolvida para os propósitos deste trabalho), visando definir melhores condições protocolares para estes estudos.

## **Objetivos Específicos**

- Desenvolver e validar metodologia analítica para determinação de penciclovir nas formulações e quantificação do fármaco nas diferentes camadas do modelo de pele empregado;
- Desenvolver forma farmacêutica semissólida nanoemulsionada de penciclovir;
- Caracterizar as propriedades físico-químicas da formulação desenvolvida;
- Realizar estudos de permeação/retenção *in vitro* variando condições experimentais para as formulações como: local de obtenção da pele (abdômen e orelha para pele suína), tempo de armazenamento da pele suína, características da pele (antes e após escaldado do suíno e diferente método de separação das camadas epiderme/derme após contato com as formulações).



---

**REVISÃO DA LITERATURA**

---



## **Pele**

A pele, além de ser o maior órgão do corpo humano em extensão e em peso, é também uma barreira protetora contra ataques físicos, químicos, microbiológicos e de raios ultravioletas. É composta por três principais camadas: epiderme, derme e, mais internamente, a hipoderme, sendo que, numa perspectiva de penetração, somente a epiderme e a derme são importantes (BAROLI, 2010; HADGRAFT *et al.*, 2005; MOSER *et al.*, 2001; PROW *et al.*, 2011; SCHÄFER-KORTING *et al.*, 2007).

A derme contém vários tipos de células, vasos sanguíneos, linfáticos, terminações nervosas, glândulas sudoríparas, sebáceas e folículos capilares (MOSER *et al.*, 2001). É o principal suporte nutricional para a epiderme avascular, fornece flexibilidade e atua como uma barreira contra infecções além de funcionar como um reservatório de água (WHO, 2006). Acima da derme, está a epiderme composta por várias camadas de células estratificadas de queratinócitos que se organizam em cinco diferentes estratos: basal, espinoso, granuloso, lúcido e córneo. O estrato córneo é responsável pela principal função de barreira da pele sendo, muitas vezes referenciado simplificadaamente, como “a barreira da pele”. Essa função lhe é atribuída devido a sua estrutura celular e matriz lipídica intercelular (BAROLI, 2010; HADGRAFT *et al.*, 2005; MOSER *et al.*, 2001; PROW *et al.*, 2011; SCHÄFER-KORTING *et al.*, 2007). Contudo, a pele não é uma barreira impenetrável de forma que muitas substâncias podem penetrar nela e através dela (POET; MCDOUGAL, 2002). O principal processo de penetração e permeação de fármacos ocorre por difusão através da epiderme intacta, pelos folículos capilares e glândulas sebáceas (Figura 1). Estes últimos representam a rota de penetração trans-folicular ou transanexal. Os anexos abrangem cerca de 0,1% da superfície da pele e, em estudos recentes, apesar de pequena área, é ressaltada sua importância na absorção de grandes moléculas e pequenas partículas, bem como moléculas hidrofílicas de pequeno peso molecular.

Em suma, a penetração anexal pode ser usada por “agentes” que possuem dimensões entre as dimensões foliculares (10–210  $\mu\text{m}$ ) e dispersão viável no micro-ambiente das glândulas sebáceas. Essa rota, embora

negligenciada por muito tempo, tem ganhado atenção recentemente por ser sugerida como via predominante na penetração de nanopartículas, lipossomas e fármacos hidrofílicos (BAROLI, 2010; BOLZINGER *et al*, 2012; WAGNER *et al.*, 2001).

A difusão através da epiderme viável, mais precisamente através do estrato córneo, ocorre por duas rotas: transcelular e intercelular. Destas, o caminho intercelular é responsável, predominantemente, pela maior parte de difusão de moléculas (Ansel; Popovich; Allen, 2000; BAROLI, 2010; MOSER *et al.*, 2001; PROW *et al.*, 2011; SCHÄFER-KORTING *et al.*, 2007; WHO, 2006).

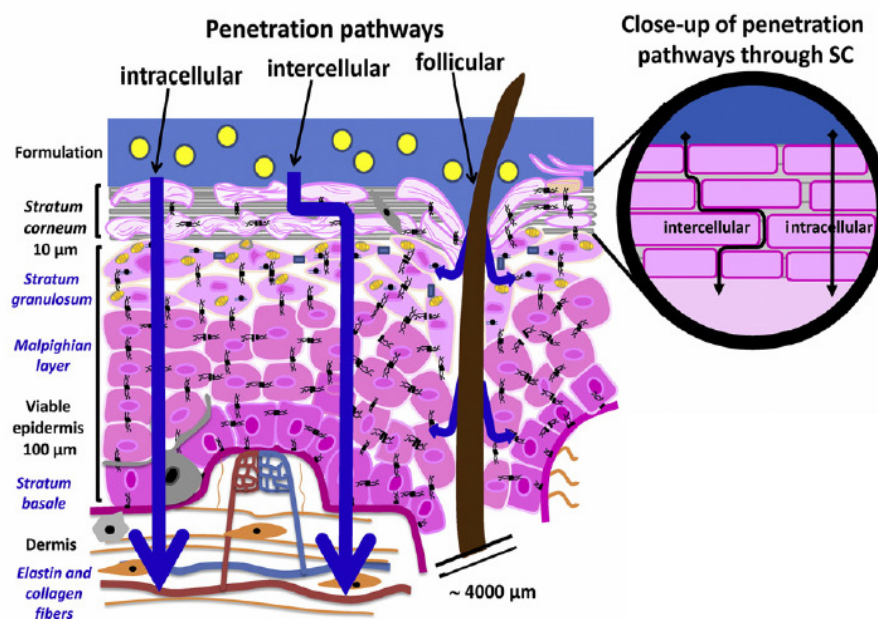


Figura 1. Camadas da pele e caminhos de penetração através da pele. Adaptado de BOLZINGER *et al.*, 2012.

Mesmo constituindo uma barreira física, a pele tem sido extensivamente utilizada para liberação cutânea e percutânea de fármacos. Nos últimos anos tem crescido o interesse em medicamentos de aplicação na pele devido as suas vantagens como, por exemplo, a possibilidade de terapia sistêmica evitando efeito de metabolismo de primeira passagem e minimizando efeitos adversos (HENNING *et al.*, 2009; WAGNER *et al.*, 2001).



Assim, a possibilidade de empregar a pele como via para administração sistêmica de medicamentos alavancou interesse em estudos referentes à absorção cutânea de fármacos, resultando numa melhor compreensão desses mecanismos e, conseqüentemente, em um melhor entendimento dos processos envolvidos para medicamentos de ação local.

### **Métodos *In Vitro* para avaliação de absorção percutânea**

A eficácia *in vivo* de uma formulação tópica depende da biodisponibilidade do fármaco no interior da pele no local de ação. Métodos para a avaliação da absorção percutânea de fármacos podem ser divididos em *in vivo* e *in vitro* (HENNING *et al*, 2008; 2009). Atualmente os métodos *in vitro* estão sendo bem aceitos em substituição aos métodos *in vivo* devido, em sua grande parte, pela possibilidade de variação de parâmetros, menor custo e, principalmente, aos problemas éticos que envolvem os estudos *in vivo* (HENNING *et al*, 2008; 2009). Além disso, tem sido confirmado que estudos *in vitro* podem prever a absorção *in vivo*, desde que adequada metodologia seja utilizada (SAMARAS *et al*, 2012).

O OECD Test Guidelines 428 é um dos guias elaborados com o intuito de uniformizar as metodologias utilizadas nos estudos *in vitro*. Parece ser unanimidade dentre as demais guias existentes, como por exemplo, WHO, SCCP, SUPAC-SS, que o documento da OECD deve ser seguido o mais próximo possível para que se possam correlacionar dados *in vitro* obtidos com dados *in vivo*.

Quando da utilização de um sistema *in vitro* para avaliar a absorção dérmica há que se considerarem quatro pontos principais: tipo de célula, fonte de pele, viabilidade, preparação, composição de fluido receptor e apuração de resultados (POET; MCDUGAL, 2002).

Sistemas de células de difusão foram descritos pioneiramente por T. J. Franz em 1970 e possuíam a configuração básica de um aparelho de pequeno volume celular, constituído por uma câmara doadora para aplicação da formulação, uma membrana por meio do qual ela pode permear, e uma câmara

receptora a partir do qual as amostras podem ser analisadas quanto à presença do fármaco. Este tipo de célula ficou conhecido popularmente como "célula de Franz" (FRANZ, 1975; OECD, 2004; POET; MCDUGAL, 2002). Atualmente o sistema de célula de difusão vertical (CDV), que é considerado um aprimoramento da célula inicial de Franz, é mais utilizado (Figura 2) (FRANZ, 1975; OECD, 2004; TANOJO *et al.*, 1997). O FDA através do guia SUPAC-SS recomenda o CDV para avaliar as alterações scale-up e pós-aprovação em formulações tópicas (SUPAC-SS, 1997). Assim, durante um experimento, um banho de circulação fornece água aquecida às células encamisadas para manter uma temperatura constante (tipicamente 32 °C para aplicações na pele) e cada unidade de célula controla a mistura de sua câmara receptora ao longo do teste. As amostras são coletadas e o volume retirado do meio receptor é simultaneamente repostado para manter uma interface de membrana constante.

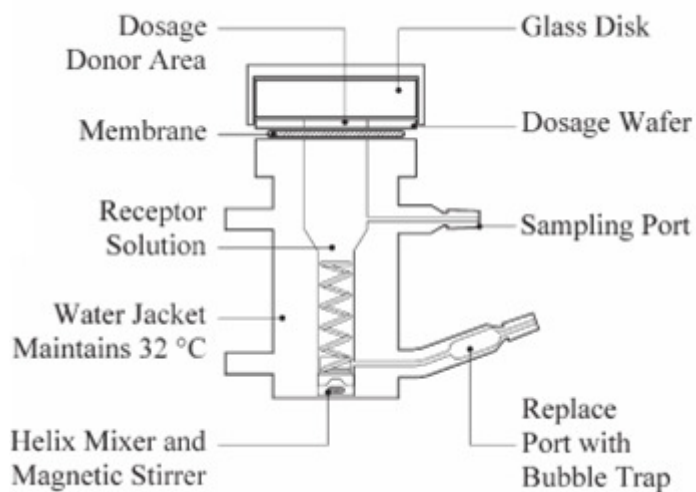


Figura 2. Célula de difusão vertical de Franz aprimorada. Fonte: <http://www.hansonresearch.com/media/DTAPrimerReleaseRateTestingofSemisolids.pdf>

Para avaliar a absorção, vários tipos de membranas como pele humana e animal, obtidas de diferentes regiões anatômicas podem ser utilizadas no compartimento doador. Além destes, a variabilidade dos

resultados obtidos *in vitro* podem também ser devido a sexo, raça, idade ou a inconsistências na obtenção e na preparação da pele (GODIN; TOUITOU, 2007; GHAFOURIAN, *et al*, 2010; POET; MCDUGAL, 2000).

Idealmente, a pele humana seria preferida para avaliar a penetração e permeação de fármacos uma vez que ela é considerada como o “gold standard” dos estudos *in vitro*. A freqüente indisponibilidade e obtenção em quantidades insuficientes limitam seu uso e fazem com que se busquem alternativas para sua substituição (GODIN; TOUITOU, 2007; HENNING *et al*, 2009; SCHMOOK *et al*, 2001).

Uma vasta gama de modelos animais tem sido sugerida como adequada para substituição da pele humana como primata, suína, de rato e camundongo e também de cobra (GODIN; TOUITOU, 2007). Uma vez que o uso de primatas na pesquisa é altamente restrito, a pele suína emerge como o modelo animal mais relevante. Isto pode ser atribuído à similaridade fisiológica da pele suína com a humana e à facilidade de sua obtenção (BARBERO; FRASCH, 2009; BOUDRY *et al.*, 2008; GODIN; TOUITOU, 2007; HENNING *et al.*, 2009; MOSER *et al.*, 2001; SARTORELLI *et al.*, 2000; SCHMOOK *et al.*, 2001).

Outro fator que pode influenciar é a espessura da pele. Para membranas de pele humana a espessura varia até em 2 mm para espessura total (epiderme+derme). Samaras e colaboradores (2012) através de modelo de análise não linear a respeito da espessura da membrana apontaram que o fluxo é muito maior para amostras de pele com espessura < 1,21 mm do que para amostras com espessura > 1,21 mm. Assim, uma espessura mais fina favorece um maior fluxo enquanto, uma espessura mais grossa resulta numa maior quantidade de fármaco retida na pele (OECD, 2010; WILKINSON *et al*, 2006).

Naturalmente, a integridade da pele é um fator que deve ser levado em consideração nos estudos de penetração *in vitro*, pois o comprometimento da barreira (estrato córneo) devido à idade, machucados e doenças de pele como dermatite atópica e psoríase pode levar a um aumento potencial da permeabilidade da pele para penetração de compostos (PROW *et al.*, 2011;

SCHÄFER-KORTING *et al.*, 2007). Assim, uma pele não íntegra favorece a permeação de compostos de modo que uma maior quantidade do penetrante alcançará o fluido receptor e, quando neste meio, a condição sink deve ser garantida (OECD, 2010).

A escolha do fluido receptor também é um fator importante. Geralmente, não há um fluido receptor definido, este deve ser validado em um sistema em que prove a solubilidade do penetrante no fluido receptor (SARTORELLI *et al*, 2000). Um exemplo disso é a adequabilidade de soluções salinas para compostos hidrofílicos e a sua inadequabilidade para compostos lipofílicos (OECD, 2010).

### **Pele humana e pele suína**

A pele suína demonstra ter similaridades com a pele humana em termos de morfologia, permeabilidade, espessura e composição lipídica (GODIN; TOUITOU, 2007; SEKKAT *et al*, 2001). Devido a esses fatores, a pele suína tem sido recomendada como modelo de pele humana para estudos *in vitro* de absorção percutânea.

Vários estudos reforçam as similaridades descritas acima. No ano de 2000, Sartorelli e colaboradores publicaram uma revisão dos principais métodos *in vitro* na tentativa de padronizar estes experimentos, concluindo que a pele suína é uma alternativa viável à pele humana por ser mais próxima fisiologicamente desta e pela fácil aquisição.

Schmook e colaboradores (2001) através de um estudo comparativo de absorção em pele humana, animal (rato e porco) e modelos de pele reconstruída para terbinafina, clotrimazol, hidrocortisona e ácido salicílico observaram que, quando comparados os resultados obtidos para os modelos de membranas e fármacos testados, estes demonstraram que a pele artificial é bem mais permeável que os demais tecidos, sendo seguida pela pele de rato. As peles suína e humana apresentaram valores de permeabilidade próximos e bem menores que as demais.

Barbero e Frasch (2009) obtiveram coeficiente de correlação de Pearson de 0,88 ao correlacionar coeficientes de permeabilidade *in vitro* para pele suína e pele humana obtidos para 26 diferentes compostos químicos. Demonstrando que, embora semelhante, a pele suína ainda é mais permeável que a humana.

Jacobi e colaboradores (2007), em estudo comparativo de espessura do estrato córneo e quantidade de folículos entre a pele humana e pele de orelha suína, obtiveram, como resultados, 21  $\mu\text{m}$  para espessura do estrato córneo da pele de orelha suína, enquanto que para pele humana esse valor é um pouco menor variando entre 6-19  $\mu\text{m}$ . Em 1 $\text{cm}^2$  de pele suína, foram numerados cerca de 20 folículos capilares, sendo que esse valor, para pele humana de mesma área, varia de 14 a 32. Além disso, os autores demonstram que, histologicamente, os folículos capilares suínos são muito similares aos humanos.

Embora a similaridade seja evidente, a permeabilidade da pele varia de local para local e, com a flexibilidade dos guias, as pele são obtidas de regiões anatômicas diferentes. Nesse contexto, Bolzinger e colaboradores (2012) através de estudo *in vitro* de absorção percutânea para um composto organofosforado, compararam a permeabilidade de diferentes regiões anatômicas para pele humana e suína (Figura 3). Como resultado, a pele de orelha suína foi a que melhor se correlacionou com a pele humana.

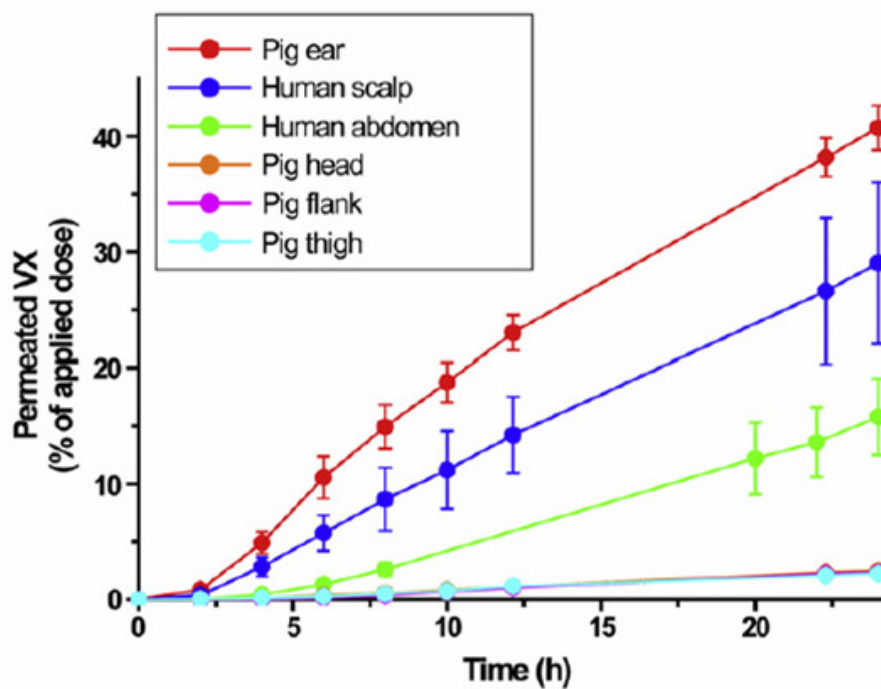


Figura 3. Comparação da absorção percutânea *in vitro* para composto organofosforado (VX) em diferentes regiões anatômicas da pele humana e suína. Fonte: BOLZINGER *et al.* 2012.

Além disso, regiões como abdômen e orelha suína têm sido reportados como as regiões mais comumente utilizadas para estudos *in vitro* que utilizam este tipo de pele como membrana. Embora não haja diferença significativa na composição lipídica entre estas regiões e a pele humana, como pode ser observado na Figura 4, a pele de orelha suína tem sido continuamente escolhida (HASANOVIC *et al.*, 2011).

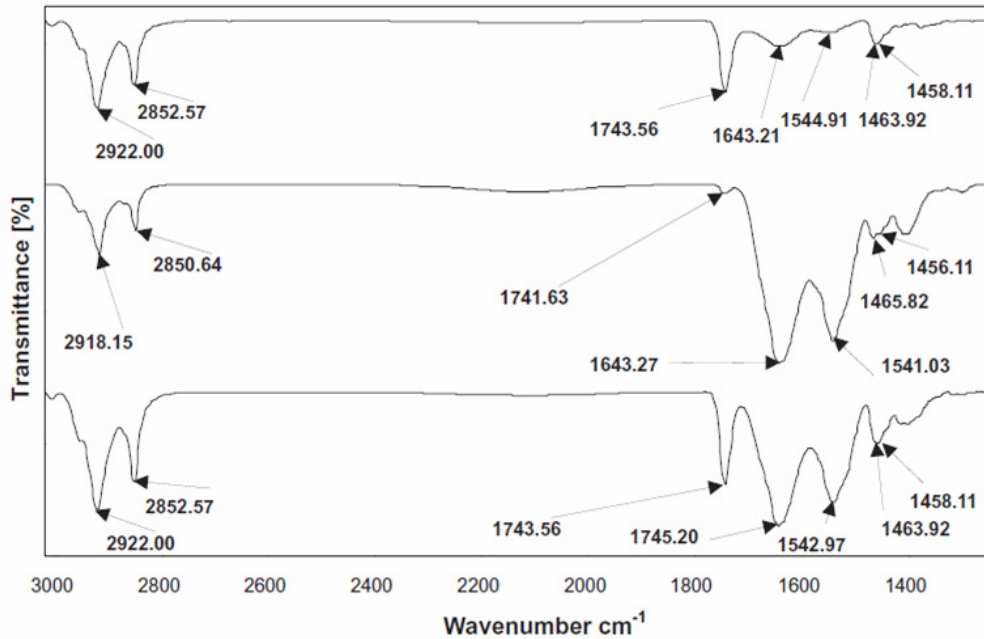


Figura 4. Comparação de espectros FTIR para abdominal suíno, orelha suína e abdômen humano (de cima para baixo). Fonte: Hasanovic *et al.* 2011.

Para Herkenne e colaboradores (2006), a orelha suína deveria ser preferida em relação ao abdômen, uma vez que esta pode ser retirada após o sacrifício do animal, antes que o corpo seja submetido ao processo de limpeza em água com alta temperatura.

Sekkat e colaboradores (2002) e Otto e colaboradores (2008) também confirmam a utilização de orelha suína como bom modelo para substituição da pele humana, através de estudos *in vitro* comparativos entre pele humana e suína. Sendo que para estes últimos a orelha foi indicada como a melhor região anatômica para estudos de absorção.

Assim, há uma forte tendência na escolha de orelha suína para estudos *in vitro* e, embora similares do ponto de vista de composição lipídica, não foram encontrados estudos na literatura que comparem a permeabilidade entre abdômen e orelha suínos, podendo se presumir que a escolha ocorre pela facilidade de aquisição do tecido.

## Nanoemulsões

O fato da terapia de aplicação de fármacos na pele ter sua eficácia limitada pela baixa penetração e permeação através do estrato córneo levou a pesquisa de promotores de absorção e ao desenvolvimento de novas formulações, como micro e nanoemulsões, para aumentar a liberação cutânea de fármacos (WAGNER *et al.*, 2001).

Assim, a utilização de nanoestruturas no tratamento de doenças locais e sistêmicas, através da pele, vem sendo cada vez mais estudada, devido a sua potencialidade de aumentar a absorção percutânea e permitir uma boa segmentação dos ativos na pele, proporcionando um melhor risco benefício da terapia tópica (PROW *et al.*, 2011; SCHÄFER-KORTING *et al.*, 2007).

As nanoemulsões têm sido consideradas um bom sistema para administração tópica de moléculas com reduzida hidrossolubilidade. Essas podem ser definidas como gotículas nanométricas oleosas em uma fase aquosa externa e estabilizadas por um sistema tensoativo adequado; possuem características de líquido leitoso de baixa viscosidade e reduzido diâmetro de gotícula, sendo que as moléculas de reduzida hidrossolubilidade encontram-se dispersas e/ou adsorvidas na fase interna da nanoestrutura (SONNEVILLE-AUBRUN *et al.*, 2004; TROTTA *et al.*, 2002; VANDAME *et al.*, 2002; WASHINGTON *et al.*, 1996). Alguns trabalhos têm mostrado que estes sistemas podem reduzir efeitos colaterais e aumentar a biodisponibilidade, quando comparados com formulações convencionais (OLIVEIRA, 2004; YILMAZ; BORCHERT, 2006). Com relação ao núcleo oleoso, este representa de 10 a 20% da composição final das nanoemulsões. A seleção do tipo e concentração da fase oleosa é feita de acordo com a solubilidade do fármaco a ser veiculado. Os óleos de origem vegetal ou semisintética, como os triglicerídeos de cadeia média (TCM), têm sido largamente utilizados (MUCHTAR; BENITA, 1994).

No que se refere à interface óleo/água das nanoemulsões, estas devem ser estabilizadas com o uso de tensoativos. As lecitinas, por exemplo, são misturas complexas de fosfolipídios de origem natural, extraídas da gema do ovo ou da soja, e mesmo em altas concentrações não são tóxicas e são



biocompatíveis, sendo que a concentração usual está entre 1,2 e 3,0% para emulsões contendo 10 a 20% de fase interna. Além disso, pode-se considerar o uso da combinação de lecitinas com tensoativos sintéticos como polissorbato 80 e poloxâmero, na preparação de nanoemulsões. Isso se deve ao fato das lecitinas terem composição heterogênea, resultando em uma variabilidade na estabilidade das formulações (YILMAZ; BORCHERT, 2006; PRIMO *et al.*, 2006).

Quanto à técnica de obtenção, o método de homogeneização a alta pressão está entre os mais citados na literatura para o preparo de emulsões e, nos últimos anos, tem-se demonstrado que o método é um dos mais efetivos no preparo de dispersões de porte submicrométrico. Ao contrário de outras técnicas, o *scaling up* não representa problemas na maioria dos casos (MEHNERT; MÄDER, 2012).

Esta metodologia pode ser resumida em três passos: em primeiro lugar, ocorre a formação de uma pré-emulsão, em seguida, a pré-emulsão é homogeneizada por um homogeneizador de alta pressão, inicialmente em baixa pressão por várias vezes e, finalmente, homogeneizado em pressão elevada por um número suficiente de ciclos até que as nanoemulsões atinjam o tamanho desejado (PU *et al.*, 2009;. ALMEIDA *et al.*, 2008).

Esta é uma técnica rápida, simples e confiável para a preparação de nanoemulsões. Ainda, apresenta vantagens como facilidade de incorporação de fármacos que são difíceis de solubilizar em solventes aquosos e orgânicos e utilização de formulações contendo lipídios numa faixa de 5 – 10%. A desvantagem é o desgaste dos equipamentos (KÖHLER *et al.*, 2010).

### **Antivirais - Penciclovir**

O desenvolvimento de compostos anti-herpéticos efetivos talvez tenha sido o acontecimento que desencadeou todos os esforços posteriores de terapia antiviral. A infecção pelo vírus *Herpes Simplex* (HSV) é uma infecção comum e onipresente da pele e mucosas que provoca lesões mucocutâneas chamadas herpes simples (herpes labial). Estima-se que cerca de 80% da

população mundial seja portador do vírus *Herpes simplex* e, aproximadamente, 40% sofra de infecções recorrentes (HASLER-NGUYEN *et al.*, 2009).

A descoberta e desenvolvimento do aciclovir, aprovado em 1982, deu origem aos compostos relacionados, tais como o valaciclovir, penciclovir, famciclovir, que apresentam espectro ligeiramente diferente de atividade antiviral e/ou farmacodinâmica melhorada (GOODMAN; GILMAN, 2006; JEROME, 2005).

Quimicamente o PCV é conhecido como 9 - [4-hidroxi-3-(hidroximetil) butil] guanina derivado sintético da guanina acíclica e tem a estrutura molecular demonstrada na Figura 4.

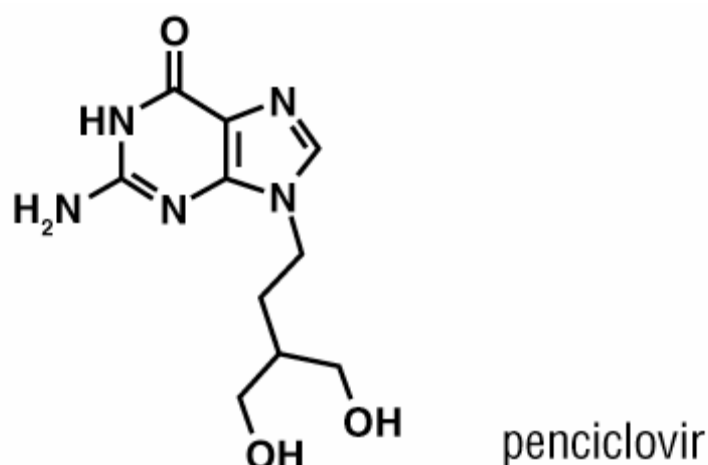


Figura 5. Estrutura molecular do penciclovir.

A 20 °C, PCV tem uma solubilidade de 0,2 mg/mL em metanol, 1,3 mg/ml em propileno-glicol, e 1,7 mg/mL, em água. Em tampão aquoso (pH 2), a solubilidade é de 10,0 mg/ml. Seu coeficiente de partição n-octanol/água em pH 7,5 é 0,024 (logP = -1,62).

O uso de penciclovir (PCV) no tratamento de infecções com herpesvírus tem aumentado significativamente desde a introdução dessa classe de antivirais no mercado. O tratamento tópico com medicamentos antivirais como o PCV é eficaz em reduzir a duração da lesão e no alívio da dor, como tem sido demonstrado em estudos randomizados de grande porte, duplo cego, ensaios clínicos multicêntrico (HASLER-NGUYEN *et al.*, 2009).

### **Validação de Metodologias Analíticas**

Um dos fatores mais importantes no desenvolvimento de medicamentos é assegurar que os métodos de ensaio de analíticos que são usados para analisar os produtos gerem dados significativos (SABIR, 2003). Dados analíticos não confiáveis podem conduzir a decisões desastrosas e a prejuízos financeiros irreparáveis (RIBANI *et al.*, 2004).

Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e inequívocas sobre a amostra, ele deve sofrer uma avaliação denominada validação (RIBANI *et al.*, 2004).

Validação de método analítico é a confirmação por exame e fornecimento de evidência objetiva de que os requisitos específicos para um determinado uso pretendido são atendidos. A validação do método analítico permite demonstrar que o método é "adequado ao uso" pretendido (BARROS, 2002).

A validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Para tanto, deve apresentar precisão, exatidão, linearidade, limite de detecção e limite de quantificação, especificidade, reprodutibilidade, estabilidade e recuperação adequadas à análise (ANVISA, 2003). Assim, segundo a legislação brasileira, para considerar um método validado este deve atender aos parâmetros da Tabela 1.

Tabela 1. Parâmetros de validação.

INMETRO	ANVISA
Especificidade/seletividade	Especificidade/seletividade
Faixa de trabalho e faixa linear de trabalho	Intervalos da curva de calibração
Linearidade	Linearidade
Limite de Detecção	Limite de Detecção
Limite de Quantificação	Limite de Quantificação
Sensibilidade	Exatidão
Exatidão	Precisão
Precisão	Robustez
Robustez	
Incerteza de medição	

Fonte: Adaptado de RIBANI *et al*, 2004.

É importante destacar que não há uma completa uniformidade nos parâmetros de validação, embora haja agências reguladoras que trabalham no intuito de harmonizá-las como, por exemplo, o *International Conference Harmonisation* (ICH).

Quanto à validação de métodos bioanalíticos, os parâmetros a serem avaliados permanecem os mesmos. O que diferencia um método do outro é a presença de uma matriz biológica que será analisada a fim de quantificar o fármaco nela presente. Devido à presença dessa matriz, a variabilidade nesses ensaios é superior aos métodos analíticos físico-químicos e isto pode ser observada pela mais ampla faixa de aceitação dos resultados como, por exemplo, a faixa de recuperação que vai de 80 – 120 % (ANVISA, 2012).

## Referências

ALLEN LV, POPOVICH NG, ANSEL HC. Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos. Porto Alegre: Artmed, 2007, cap. 10, p. 301-313.

Basic Criteria for the *In vitro* Assessment of dermal absorption of cosmetic ingredient, in, **Scientific Committee on Consumer Products**, European Commission (2006).

- BARBERO, A.M.; FRASCH, H.F. Pig and guinea pig skin as surrogates for human *in vitro* penetration studies: A quantitative review. **Toxicology in Vitro**, v. 23, p. 1–13, 2009.
- BAROLI, B. Penetration of Nanoparticles and Nanomaterials in the Skin: Fiction or Reality? **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, p. 21- 50, 2010.
- BARROS, C.B. Validação de métodos analíticos. **Biológico**, v.64, n.2, p.175-177, 2002.
- BOLZINGER, M.A; BRIANÇON, S.; PELLETIER, J.; CHEVALIER, Y. Penetration of drugs through the skin, a complex rate-controlling membrane. **Current Opinion in colloid and interface science**, v. 17, p. 156-165, 2012.
- BOUDRY, I.; BLANCK, O.; CRUZ, C.; BLANCK, M.; VALLET, V.; BAZIRE, A.; CAPT, A.; JOSSE, D.; LALLEMENT, G. Percutaneous penetration and absorption of parathion using human and pig skin models *in vitro* and human skin grafted onto nude mouse skin model *in vivo*. **Journal of Applied Toxicology**, v. 28, p. 645–657, 2008.
- Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial da União, Brasília, Poder Executivo, de 02 de junho de 2003.
- Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC 27, de 17 de maio de 2012. Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos. Diário Oficial da União, Brasília, Poder Executivo, de 22 de maio de 2012.
- FRANZ, J. Percutaneous absorption on the relevance of in-vitro data. **J.Interes. Dermato**, v. 67, p. 190–196,1975.
- GHAFOURIAN, T.; SAMARAS, E. G.; BROOKS, J.D.; RIVIERE, J.E. Validated models for predicting skin penetration from different vehicles. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 41, p. 612–616, 2010.
- GODIN, B.; TOUITOU, E. Transdermal skin delivery: Predictions for humans from *in vivo*, *ex vivo* and animal models. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, p. 1152-1161, 2007.
- HADGRAFT, J.; LANE, M.E. Skin permeation: The years of enlightenment. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 305, p. 2-12, 2005.
- HADGRAFT, J. Skin, the final frontier. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 224, p. 1-18, 2001.
- HASLER-NGUYEN, N.; SHELTON, D.; PONARD, G.; BADER, M.; SCHAFFRIK, M.; MALLEFET, P. Evaluation of the *in vitro* skin permeation of antiviral drugs from penciclovir 1% cream and acyclovir 5% cream used to treat herpes simplex virus infection. **BMC Dermatology**, v. 9, p. 1-10, 2009.

HENNING, A.; NEUMANN, D.; KOSTKA, K.H.; LEHR, C.M.; SCHAEFER, U.F. Influence of Human skin specimens consisting of different skin layers on the result of *in vitro* permeation experiments. **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 21, p. 81-88, 2008.

HENNING, A.; SCHAEFER, U.F.; NEUMANN, D. Potential pitfalls in skin permeation experiments: Influence of experimental factors and subsequent data evaluation. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.72, p. 324–331, 2009.

HERKENNE, C.; NAIK, A.; KALIA, Y.N.; HADGRAFT, J.; GUY, R. Pig Ear Skin ex Vivo as a Model for in Vivo Dermatopharmacokinetic Studies in Man. **Pharmaceutical Research**, v. 23, p. 1850-1856, 2006.

ICH Steering Committee (2005) International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. Geneva, Switzerland.

JACOBI, U.; KAISER, M.; TOLL, R.; MANGELSDORF, S.; AUDRING, H.; OTBERG, N.; STERRY, W.; LADEMANN, J. Porcine ear skin: an *in vitro* model for human skin. **Skin Research and Technology**, v.13, p. 19–24, 2007.

JEROME, K.R. The road to new antiviral therapies. **Clinical and Applied Immunology Reviews**, v. 5, p. 65–76, 2005.

KÖHLER, K.; SANTANA, A.S.; BRAISCH, B.; PREIS, R.; SCHUCHMANN, H.P. High pressure emulsification with nano-particles as stabilizing agents. **Chemical Engineering Science**, v. 65, p. 2957–2964, 2010.

MEHNERT, W. MÄDER, K. Solid lipid nanoparticles: Production, characterization and applications **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.64 p. 83–101, 2012.

MOSER, K.; KRIWET, K.; NAIK, A.; KALIA, Y.N.; GUY, R.H. Passive skin penetration enhancement and its quantification *in vitro*. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 52, p. 103-112, 2001.

MUCHTAR, S.; BENITA, S. Emulsions as drug carriers for ophtalmic use. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v.91, p. 181-190, 1994.

OECD Guidance Notes on dermal absorption, 2010.

OLIVEIRA DE ANTÔNIO, M. E. C. **Permeação Cutânea in vitro como ferramenta auxiliar para o estudo de formulações semi-sólidas de Cetoconazol para aplicação tópica**. Dissertação (Doutorado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Farmácia. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

On regulatory aspects of nanomaterials, in, **Scientific Committee on Consumer Products**, European Commission (2008).

POET, T.S. MCDUGAL, J.N..Skin absorption and human risk assessment. **Chemico-Biological Interactions**, v.140, p. 19–34, 2002.

PRIMO, F. L.; MICHIELETO, L.; RODRIGUES, M. A. M.; MACAROFF, P. P.; MORAIS, P. C.; LACAVAL, Z. G. M.; BENTLEY, M. V. L. B.; TEDESCO, A. C. Magnetic nanoemulsions as drug delivery system for Foscan®: Skin permeation and retention *in vitro* assays for topical application in photodynamic therapy (PDT) of skin cancer. **Journal of Magnetism and Magnetic Material**, v. 311, p. 354-357, 2007.

PROW, T.W.; GRICE, E.J.; LYNLEE, L.L.; FAYE, R.; BUTLER, M.; BECKER, W.; WURM, E. M.T.; YOONG, C.; ROBERTSON, T. A.; SOYER, H. P.; ROBERTS, M. S. Nanoparticles and microparticles for skin drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, p. 470-91, 2011.

PU, X.; SUN, J.; LI, M.; HE, Z. Formulation of Nanosuspensions as a New Approach for the Delivery of Poorly Soluble Drugs. **Current Nanoscience**, v.5, p. 417- 427, 2009.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27 p.771-780, 2004.

SHABIR, G. A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. **Journal of Chromatography A**, v. 987 p. 57–66, 2003.

SAMARAS, E.G.; RIVIERE, J.E.; GHAFOURIAN, T. The effect of formulations and experimental conditions on *in vitro* human skin permeation—Data from updated EDETOX database. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 434, p. 280– 291, 2012.

SARTORELLI, P.; ANDERSEN, H.R.; ANGERER, J.; CORISH, J.; DREXLER, H.; GÖEN, T.; GRIFFIN, P.; HOTCHKISS, S.A.M.; LARESE, F.; MONTOMOLI, L.; PERKINS, J.; SCHMELZ, M.; VAN DE SANDT, J.; WILLIAMS, F. Percutaneous penetration studies for risk assessment. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 8, p. 133-152, 2000.

SARISKY, R.T.; BACON, T.; BOON, R.; LOCKE, L.; NGUYEN, T.T.; LEARY, J.; ESSER, K.; SALTZMAN, R. Penciclovir Susceptibilities of Herpes Simplex Virus Isolates from Patients Using Penciclovir Cream for Treatment of Recurrent Herpes Labialis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, p. 2848–2853, 2002.

SCHÄFER-KORTING, M.; MEHNERT, W.; KORTING, H. C. Lipid nanoparticles for improved topical application of drugs for skin diseases. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.59, p.427–443, 2007.

- SCHMOOK, F.P.; MEINGASSNER, J.G.; BILLICH, A. Comparison of human skin or epidermis models with human and animal skin in in-vitro percutaneous absorption. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 215, p. 51–56, 2001.
- SEKKAT, N.; KALIA, Y.N.; GUY, R.H. Biophysical Study of Porcine Ear Skin *In Vivo* and its Comparison to Human Skin *In Vivo*. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 91, p. 2376- 2381, 2002.
- SONNEVILLE-AUBRUN, O.; SIMONNET, J.-T; L'ALLORET, F. Nanoemulsions: a new vehicle for skincare products. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 20, p. 145-149, 2004.
- TANOJO, H.; ROEMELÉ, P.E.H.; VAN VEEN, G.H.; STIELTJES, H.; JUNGGMGER, H.E.; BODDÉ, H.E. New design of a flow-through permeation cell for studying *in vitro* permeation studies across biological membranes. **Journal of Controlled Release**, v. 45, p. 41-47, 1997.
- TOUITOU, E.; MEIDAN, V.M.; HORWITZ, E. Methods for quantitative determination of drug localized in the skin. **Journal of Controlled Release**, v. 56, p. 7-21, 1998.
- TROTTA, M.; PATTARINO, F.; IGNONI, T. Stability of drug-carrier emulsions containing phosphatidylcholine mixtures. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 53, p. 203-208, 2002.
- VANDAMME, T.F. Microemulsions as ocular drug delivery systems: recent developments and future challenges. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 21, p. 15-34, 2002.
- WILKINSON, S.C.; MAAS, W.J.M.; NIELSEN, J. B.; JOHANNES, L.C.G.; VAN DE SANDT, J.M.; WILLIAMS, F.M. Interactions of skin thickness and physicochemical properties of test compounds in percutaneous penetration studies. **Int Arch Occup Environ Health**, v.79, p. 405–413, 2006.
- WAGNER, H.; KOSTKA, K.H.; LEHR, C.M.; SCHAEFER, U.F. Interrelation of permeation and penetration parameters obtained from *in vitro* experiments with human skin and skin equivalents. **Journal of Controlled Release**, v. 75, p. 283–295, 2001.
- WASHINGTON, C. Stability of lipid emulsion for drug delivery. **Advanced drug delivery** 20: 131-145, 1996.
- WHO (World Health Organisation) Kielhorn J., Melching-Kollmü S., Mangelsdorf I. Dermal Absorption. WHO / IPCS Environmental Health Criteria, Draft February 2006.
- YILMAZ, E.; BORCHERT, H. Effect of lipid-containing, positively charged nanoemulsions on skin hydration, elasticity and erythema – An in vivo study. **International Journal of Pharmaceutics** 307: 232-238.



---

## **CAPÍTULO I**

**Assessment of penciclovir in porcine skin samples by liquid chromatography and a comparative cutaneous retention study between an hydrogel containing penciclovir-loaded nanoemulsion and commercial formulation**

---



---

*Neste primeiro capítulo experimental, objetivou-se o desenvolvimento de nanoemulsões contendo penciclovir (PCV) e a validação de um método por cromatografia líquida isocrática para quantificar o fármaco nas diferentes camadas de pele de orelha suína. Em uma primeira fase, após definir a composição da nova formulação, caracterizou-se as propriedades das nanoemulsões de PCV (1mg/mL) constituídas de um núcleo oleoso de triglicérides de cadeia média (TCM) estabilizado por lecitina de gema de ovo e poloxamer 188, obtidas por homogeneização a alta pressão. As análises quantitativas do fármaco foram realizadas em temperatura ambiente utilizando coluna de fase reversa C8, fase móvel composta de metanol: água (7:93, v/v) e detecção ultravioleta a 251 nm. Não foram detectadas interferências dos adjuvantes das formulações e dos constituintes das camadas da pele. Na sequência, o método foi aplicado na determinação do PCV liberado das formulações nas diferentes camadas da pele, após 8 horas de contato, utilizando células de difusão de Franz. A maior concentração de PCV foi detectada na epiderme tanto para hidrogéis contendo as nanoemulsões quanto para a formulação comercial. Além disso, foi possível quantificar o fármaco permeado no fluido receptor.*

---



## Resumo

Adequado método para a quantificação de penciclovir (PCV) nas principais camadas de pele de orelha suína foi validado, e um estudo comparativo foi realizado para analisar a retenção e a permeação do fármaco em creme comercial de hidrogel contendo a nanoemulsão (HN) desenvolvida. Nanoemulsões de PCV foram preparadas pelo método de homogeneização de alta pressão. Entre as formulações desenvolvidas, 0,1% de PCV contendo poloxâmero 188 de foi a que apresentou os melhores resultados de caracterização. Nanoemulsões revelaram ser esféricas, com tamanho médio de gota de 180 nm,  $\zeta$ -potencial de cerca de - 27 mV, e eficácia associação de 87%. O método bioanalítico desenvolvido apresentou especificidade para as interferências das matrizes (epiderme e derme), bem como para os componentes das formulações. Linearidade na faixa de 0,1-25 ug/mL de fármaco, e ANOVA mostrou desvio linear não significativo ( $p > 0,05$ ). Os dados médios de recuperação para os três níveis testados foram de 95,2% para a epiderme e 97,3% para a derme. Repetibilidade e precisão inter-dia foram como esperado, demonstrando que o método é adequado e confiável em estudos *in vitro* de PCV retenção cutânea. Além disso, um estudo comparativo de PCV retenção cutânea foi realizado utilizando o creme comercial (1%) e o HN (0,1%). A quantidade de PCV retido na pele usando o creme comercial foi apenas três vezes maior que o valor retido usando HN. Por outro lado, as quantidades cumulativas de PCV a partir de permeado do creme e HN, 8 h após a administração, foram 2,60 e 4,15 ug/cm<sup>2</sup>, respectivamente, o que representa um fluxo muito maior e um coeficiente de permeabilidade muito mais elevado para a formulação desenvolvida.

## References

ALMEIDA, M. E.; TEIXEIRA, H. F.; KOESTER, L.S. Preparação de Emulsões Submicrométricas: Aspectos Teóricos sobre os Métodos Empregados na Atualidade. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 27 (5), p. 780-8, 2008.

AULTON, M. E. Delineamento de Formas Farmacêuticas. 2ª Ed., Porto Alegre: Artmed, 2005.

HASLER-NGUYEN, N.; SHELTON, D.; PONARD, G.; BADER, M.; SCHAFFRIK, M.; MALLEFET, P. Evaluation of the in vitro skin permeation of antiviral drugs from penciclovir 1% cream and acyclovir 5% cream used to treat herpes simplex virus infection. **BMC Dermatology**, v.9, p. 1-10, 2009.

HENNING, A.; SCHAEFER, U.F.; NEUMANN, D. Potential pitfalls in skin permeation experiments: Influence of experimental factors and subsequent data evaluation. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.72, p. 324–331, 2009.

ICH (2005) Steering Committee. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. Geneva, Switzerland.

JENSEN, L.B.; PETERSSON, K.; NIELSEN, H. M. In vitro penetration properties of solid lipid nanoparticles in intact and barrier-impaired skin. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 79, p. 68–75, 2011.

LEE, C.H.; MOTURI, V.; LEE, Y. Thixotropic property in pharmaceutical formulations. **Journal of Controlled Release**, v. 136, p. 88-98, 2009.

LIN, L.; CHEN, X.S.; CUI, P.G.; WANG, J. B.; GUO, Z.P.; LU, N. Z.; BI, Z.G.; JIA, H.; YANG, X.Y. Topical application of penciclovir cream for the treatment of herpes simplex facialis/labialis: a randomized, double-blind, multicentre, acyclovir controlled trial. **Journal of Dermatological Treatment**, v.13, p. 67–72, 2002.

LV, Q.; YU, A.; XI, Y.; LI, H.; SONG, Z.; CUI, J.; CAO, F.; ZHAI, G. Development and evaluation of penciclovir-loaded solid lipid nanoparticles for topical delivery. **Journal of Pharmaceutics**, v.372, p. 191–198, 2009.

MEHNERT, W.; MÄDER, K. Solid lipid nanoparticles: Production, characterization and applications **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.64 p. 83–101, 2012.

MÜLLER, R.H.; SCHMIDT, S.; BUTTLE, I.; AKKAR, A.; SCHMITT, J.; BROMER, S. Solemuls: novel technology for the formulation of iv emulsions with poorly soluble drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v.269, p.293-302, 2004.

PATRAVALE, V. B.; ABHIJIT, A.; KULKARNI, R. M. Nanosuspensions: a promising drug delivery strategy. **Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 56, p. 827–840, 2004.

PU, X.; SUN, J.; LI, M.; HE, Z. Formulation of Nanosuspensions as a New Approach for the Delivery of Poorly Soluble Drugs. **Current Nanoscience**, v.5, p. 417- 427, 2009.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27 p.771-780, 2004.

SADURNÍ, N.; SOLANS, C.; AZEMAR, N.; GARCIA-CELMA, M. J. Studies on the formation of O/W nano-emulsions, by low-energy emulsification methods, suitable for pharmaceutical applications. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.26 p. 438–445, 2005.

SCHÄFER-KORTING, M.; MEHNERT, W.; KORTING, H-C. Lipid nanoparticles for improved topical application of drugs for skin diseases. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.59 p. 427–443, 2007.

SMITH, R.L.; MORRONI, J.; WILCOX, C.L. Lack of effect of treatment with penciclovir or acyclovir on the establishment of latent HSV-1 in primary sensory neurons in culture. **Antiviral Research** v. 52, p. 19–24, 2001.

SOLANS, C.; IZQUIERDO, P.; NOLLA, N.; AZEMAR, N.; GARCIA-CELMA, M. J. Nano-emulsions. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v.10, p.102 – 110, 2005.

TRIMAILLE, T.; CHAIX, C.; DELAIR, T.; PICHOT, C. ; TEIXEIRA, H.; DUBERNET, C.; COUVREUR, P. Interfacial deposition of functionalized copolymers onto nanoemulsions produced by the solvent displacement method. **Colloid and Polymer Science**, v. 279, p. 784 – 792, 2001.

YU , A.; GUO, C.; ZHOU, Y.; CAO, F.; ZHU, W.; SUN, M.; ZHAI, G. Skin irritation and the inhibition effect on HSV-1 in vivo of penciclovir-loaded microemulsion. **International Immunopharmacology**, v.10 p. 1305–1309, 2010.





---

## **CAPÍTULO II**

**Evaluation of porcine skin layers separation methods, freezing times and anatomical site in *in vitro* percutaneous absorption studies using penciclovir formulations**

---



---

*Neste segundo capítulo experimental, objetivou-se avaliar algumas condições experimentais dos estudos de absorção cutânea in vitro, as quais exibem alguma divergência e flexibilidade na literatura e nos guias oficiais. Desse modo, condições como técnicas de separação das camadas da pele, tempo de congelamento em que a pele mantém sua permeabilidade e diferença de penetração e permeação entre os locais anatômicos mais frequentemente utilizados, obtidos de diferentes formas, foram avaliadas para pele suína.*

*A formulação comercial disponível e a nanoemulsão gelificada, anteriormente desenvolvida, foram utilizadas nos experimentos que foram conduzidos utilizando células de difusão de Franz, tampão fosfato pH 7,4 como solução receptora mantida a 32 °C e pele suína como membrana. Foi determinada a quantidade de PCV na epiderme, derme e fluído receptor nos tempos de 1, 2, 4, 6 e 8 horas.*

---



## Resumo

A literatura apresenta elevada variação nas técnicas utilizadas para os estudos *in vitro* de absorção percutânea, resultando em diversos resultados e tornando difícil de estabelecer uma correlação com a absorção *in vivo*. Nosso objetivo foi investigar algumas condições sobre estudos *in vitro* empregando penciclovir (PCV) como fármaco modelo nas formas convencionais (creme comercial) e uma formulação inovadora (nanoemulsão hidrogel). Em primeiro lugar, o método de separação de camadas da pele suína, após contato com a formulação foi avaliado por meio da técnica clássica de separação proposta por Kligman e Christofers (1963) e pela separação utilizando apenas bisturi. Capacidade de penetração e permeação da pele de orelha suína congelado foi avaliada durante três meses. Ainda, avaliou-se a diferença na penetração e permeação entre os diferentes sítios anatômicos de pele de porco (abdômen não escaldado e orelha e abdômen escaldado). A quantidade retida em camadas da epiderme obtida após o modo clássico de separação foi mais baixa do que a observada após a separação utilizando apenas um bisturi para as duas formulações testadas, embora a nanoemulsão hidrogel, não apresentou diferença significativa entre as condições testadas. A soma do valor obtido a partir de penetração com a quantidade restante do fármaco na água, depois submetido ao modo clássico, é próximo da quantidade total obtida por separação mecânica. Independentemente da localização anatômica, não houve diferença significativa na penetração e permeação para ambas as formulações entre o abdômen não escaldado e pele da orelha. Para as amostras de abdômen escaldadas, foi medido um aumento na quantidade do fármaco penetrado nas camadas permeado para a solução receptora quando comparado com as peles não submetidas a esse procedimento. Finalmente, foi detectado que a permeabilidade da pele de orelha suína aumenta com o tempo de armazenamento congelado. Este estudo mostra que o congelamento de pele de porco em até 30 dias não altera a função barreira da pele e a permeabilidade do PCV.

## References

- AHLSTROM, L. A.; CROSS, S. E.; MILLS, P. C. The effects of freezing skin on transdermal drug penetration kinetics. **J. vet. Pharmacology Therapy**, 30, 456–463, 2007.
- ALBERTI, I.; KALIA, Y. N.; NAIK, A.; GUY, R. H. Assessment and Prediction of the Cutaneous Bioavailability of Topical Terbinafine, *In vivo*, in Man. **Pharmaceutical Research**, v. 18, p. 1472-1475, 2001.
- ALLEN, L.V; POPOVICH, N.G.; ANSEL, H.C. **Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos**. Porto Alegre: Artmed, 2007, cap. 10, p. 301-313.
- BACH, M.; LIPPOLD, B.C. Percutaneous penetration enhancement and its quantification. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.46, p. 1–13, 1998.
- BAERT, B.; BOONEN, J.; BURVENICH, C.; ROCHE, N.; STILLERT, F. ; BLONDERLI, P.; BOCXLAERr, J.V.; SPIEGELEER, B.D. 218 A New Discriminative Criterion for the Development of FRANZ Diffusion Tests for Transdermal Pharmaceuticals. **J Pharm Pharmaceutical Sciences**, v. 13, p. 218 - 230, 2010.
- BARBERO, A. M.; FRASCH, H.F. Pig and guinea pig skin as surrogates for human *in vitro* penetration studies: A quantitative review. **Toxicology in vitro**, v. 23, p. 1–13, 2009.
- BARRY, B.W. Drug delivery routes in skin: a novel approach. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, p. S31–S40, 2002.
- BOLZINGER, M.A; BRIANÇON, S.; PELLETIER, J.; CHEVALIER, Y. Penetration of drugs through the skin, a complex rate-controlling membrane. **Current Opinion in colloid and interface science**, v. 17, p. 156-165, 2012.
- BOUWSTRA, J.A.; HONEYWELL-NGUYEN, P.L. Skin structure and mode of action of vesicles. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, p. S41–S55, 2002.
- BOWSTRA, J.A.; HONEYWELL-NGUYENA, P.L.; GOORISA, G.S.; PONEC, M. Structure of the skin barrier and its modulation by vesicular formulations. **Progress in Lipid Research**, v. 42, p. 1–36, 2003.
- BOUWSTRA, J.A.; PONEC, M. The skin barrier in healthy and diseased state. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1758, p. 2080–2095, 2006.

BRAIN, K.R.; WALTERS, K.A.; WATKINSON, A.C. Methods for studying percutaneous absorption, In: in: K.A. Walters (Ed.), *Dermatological and Transdermal Formulations*, Marcel Dekker AG, New York, 2002, p. 197–270.

CAUSSIN, J. GOORIS, G. S. JANSSENS, M. BOUWSTRA, J. A.. Lipid organization in human and porcine stratum corneum differs widely, while lipid mixtures with porcine ceramides model human stratum corneum lipid organization very closely. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1778, p. 1472–1482, 2008.

DENNERLEIN, K. ; SCHNEIDER, D. ; GÖEN,T. ; SCHALLER, K.H. ; DREXLER, H. ; KORINTH, G. Studies on percutaneous penetration of chemicals – Impact of storage conditions for excised human skin. **Toxicology in Vitro**, v.27, p. 708–713, 2013.

European Commission. Guidance Document on Dermal Absorption - OECD, 2004.

European Commission. Scientific Committee on Consumer Products (SCCP). Basic criteria for the *in vitro* assessment of dermal absorption of cosmetic ingredients. 2006.

FDA. Guidance for industry Nonsterile Semisolid Dosage Forms (SUPACSS). 1997.

FRANZ, T.J. ; LEHMAN, P.A.; RANEY, S.G.. Use of Excised Human Skin to Assess the Bioequivalence of Topical Products. **Skin Pharmacol Physiol**, v. 22, p. 276–286, 2009.

FRASCH, H.F.; BARBERO, A.M. Application of numerical methods for diffusion-based modeling of skin permeation, **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, p. 208-220, 2013.

FRIEND, D. R. *In vitro* skin permeation techniques. **Journal of Controlled Release**, v. 18, p. 235-248, 1992.

GATTU, S.; MAIBACH, H.I. Modest but Increased Penetration through Damaged Skin: An Overview of the *in vivo* Human Model. **Skin Pharmacol Physiol**, v. 24, p.2–9, 2011.

GEERLIGS, M. **Skin layer mechanism**. Proefschrift doctoraat, Technische Universiteit Eindhoven, 2010.

GRAY GM, YARDLEY HJ. Different populations of pig epidermal cells: isolation and lipid composition. **Journal of Lipid Research**, v. 16: 441-447, 1975.

GODIN, B.; TOUITOU E. Transdermal skin delivery: Predictions for humans from *in vivo*, *ex vivo* and animal models. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, p.1152-1161, 2007.

GROEN, D. POOLE, D. S. GOORIS, G. S. BOUWSTRA, J. A. Investigating the barrier function of skin lipid models with varying compositions. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 79, p. 334–342, 2011.

HADGRAFT, J. Skin, the final frontier. **International Journal of Pharmaceutics**, v.224, p. 1-18, 2001.

HADGRAFT, J.; LANE, M. E. Skin permeation: The years of enlightenment. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 305, p. 2–12, 2005.

HANSEN, S.; LEHR, Claus-M.; SCHAEFER, U. F. Improved input parameters for diffusion models of skin absorption. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, p.251-64, 2013.

HASANOVIC, A.; WINKLER, R.; RESCH, G. P.; VALENTA, C. Modification of the conformational skin structure by treatment with liposomal formulations and its correlation to the penetration depth of acyclovir. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 79, p. 76–81, 2011.

HEARD, C.M.; SCREEN, C. Probing the permeation enhancement of mefenamic acid by ethanol across full-thickness skin, heat-separated epidermal membrane and heat-separated dermal membrane. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 349, p. 323–325, 2008.

HENNING, A.; NEUMANN, D.; KOSTKA, K.H.; LEHR, C.M.; SCHAEFER, U. F. Influence of Human skin specimens consisting of different skin layers on the result of *in vitro* permeation experiments. **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 21, p. 81-88, 2008.

HENNING, A.; SCHAEFER, U. F.; NEUMANN, D. Potential pitfalls in skin permeation experiments: Influence of experimental factors and subsequent data evaluation. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 72: 324–331, 2009.

HERKENNE, C.; NAIK, A.; KALIA, Y. N.; HADGRAFT, J.; GUY, R. H.. Pig Ear Skin *ex Vivo* as a Model for *in vivo* Dermatopharmacokinetic Studies in Man. **Pharmaceutical Research**, v. 23, No. 8, 2006.

JACOBI, U.; KAISER, M.; TOLL, R.; MANGELSDORF, S.; AUDRING, H.; OTBERG, N.; STERRY, W.; LADEMANN, J. Porcine ear skin: an *in vitro* model for human skin. **Skin Research and Technology**, v. 13, p. 19–24, 2007.

JACOBI, U.; TOLL, R.; AUDRING, H.; STERRY, W.; LADEMANN, J. The porcine snout – an *in vitro* model for human lips? **Experimental Dermatology**, V. 14, p. 96–102, 2005.



JEPPI, O. G.; DANKI, Y.; ANISSIMOV, Y. G.; ROBERTS, M. S. Modeling the human skin barrier — Towards a better understanding of dermal absorption. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, p.152-68, 2013.

KARADZOVSKA, D.; BROOKS, J. D.; RIVIERE, J. E. Experimental factors affecting *in vitro* absorption of six model compounds across porcine skin. **Toxicology in vitro**, v. 26, p. 1191–1198, 2012.

KLIGMAN, A.M.; CHRISTOPHERS, E. Preparation of isolated sheets of human stratum corneum. *Archives on Dermatology*, v. 88, p. 702-705, 1963.

KONG, R.; BHARGAVA, R. Characterization of porcine skin as a model for human skin studies using infrared spectroscopic imaging. **Analyst**, v.136, p. 2359, 2011.

LADEMANN, J.; JACOBI, U.; SURBER, H.-J. WEIGMANN., Fluhr, J.W. The tape stripping procedure – evaluation of some critical parameters. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.72, p. 317-23, 2009.

LEHMAN, P.A.; RANEY, S.G.; FRANZ, T.J. Percutaneous Absorption in Man: *In vitro-in vivo* Correlation. **Skin Pharmacol Physiol**, v. 24, p. 224–230, 2011.

MAYEE, R.; RAWAT, S. Pharmacokinetic Studies of Topical Formulations – A Review. **International Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 2, p. 98-100, 2010.

MONTEIRO-RIVIERE, N.; RIVIERE, J.E., 1996. The pig as a model for cutaneous pharmacology and toxicology research. In: Tumbleson, M.E., Shook, L.B. (Eds.), **Advances in Swine in Biomedical Research**. Plenum Press, New York, pp. 425– 458.

MOSER, K.; KRIWET, K.; NAIK, A; KALIA, Y. N.; Guy RH. Passive skin penetration enhancement and its quantification *in vitro*. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 52: 103-112, 2001.

NARKAR, Y. Bioequivalence for Topical Products—An Update. **Pharm Res**, v. 27, p. 2590–2601, 2010.

NIELSEN, J.B.; PLASENCIA, I.; SØRENSEN, J.A.; BAGATOLLI, L.A. Storage Conditions of Skin Affect Tissue Structure and Subsequent *in vitro* Percutaneous Penetration. **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 24, p. 93–102, 2011.

NOTMAN, R. ANWAR, J. Breaching the skin barrier — Insights from molecular simulation of model membranes. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, p. 237–250, 2013.

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

POET, T.S.; McDOUGAL, J.N. Skin absorption and human risk assessment. **Chemico-Biological Interactions**, v. 140, p.19–34, 2002.

PROKSCH, E.; BRANDNER, J. M.; JENSEN, J. M. The skin: an indispensable barrier. **Experimental Dermatology**, v. 17, p. 1063–1072, 2008.

PROW, T.W.; GRICE, E.J.; LYNLEE, L.L.; FAYE, R.; BUTLER, M.; BECKER, W.; WURM, E. M.T.; YOONG, C.; ROBERTSON, T. A.; SOYER, H. P.; ROBERTS, M. S. Nanoparticles and microparticles for skin drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews** (2011).

SAMARAS, E.G.; RIVIERE, J.E.; GHAFOURIAN, T. The effect of formulations and experimental conditions on *in vitro* human skin permeation—Data from updated EDETOX database. **International Journal of Pharmaceutics**, v.434,p. 280– 291, 2012.

SARTORELLI, P.; ANDERSEN, H.R.; ANGERER J, CORISH J, DREXLER H, GÖEN T, GRIFFIN P, HOTCHKISS SAM, LARESE F, MONTOMOLI L, PERKINS J, SCHMELZ M, VAN DE SANDT J, WILLIAMS F. Percutaneous penetration studies for risk assessment. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.8, p. 133-152, 2000.

SCHÄFER-KORTING, M.; MEHNERT, W.; KORTING, H-C. Lipid nanoparticles for improved topical application of drugs for skin diseases. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, p. 427–443, 2007.

SCHMOOK, F.P.; MEINGASSNER, J.G.; BILLICH, A. Comparison of human skin or epidermis models with human and animal skin in in-vitro percutaneous absorption. **International Journal of Pharmaceutics**, 215: 51–56, 2001.

SEKKAT, N.; KALIA, Y.N.; GUY, R.H. Biophysical Study of Porcine Ear Skin *In Vivo* and its Comparison to Human Skin *In Vivo*. **Journal of Pharmaceutical Sciences** 91: 2376- 2381, 2002.

SELZER, D.; ABDEL-MOTTALEB, M.M.A.; HAHN, T.; SCHAEFER, U.F.; NEUMANN, D. Finite and infinite dosing: Difficulties in measurements, evaluations and predictions. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, p. 278-94, 2013.

SIMON, G.A.; MAIBACH, H.I. The pig as an experimental animal model of percutaneous permeation in man: qualitative and quantitative observations – an overview. **Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology**, v. 13, p. 229–234, 2000.

- SWINDLE, M. M. Porcine integumentary system models:part 1 – Dermal toxicology. Technical bulletin, Sinclair Research, 2008.
- VAN SCOTT, E. J. Mechanical separation of the epidermis from the corium. **British Journal of Dermatology**, v. 18, p. 377-379, 1952.
- WAGNER, H.; KOSTKA, K.H.; LEHR, C.M.; SCHAEFER, U.F. Interrelation of permeation and penetration parameters obtained from *in vitro* experiments with human skin and skin equivalents. **Journal of Controlled Release**, v75, p. 283–295, 2001.
- WILLIAMS, F. M. *In vitro* studies—how good are they at replacing *in vivo* studies for measurement of skin absorption? **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.21, p.199–203, 2006.
- WILLIAMS, A. C.; BARRY, B. W. Penetration enhancers. **Advanced Drug IDelivery Reviews**, v. 64, p. 128-137, 2012.
- World Health Organization. Environmental Health Criteria 235 Dermal absorption, 2006.
- WOOD, D.G.; BROWN, M.B.; JONES, S.A. Understanding heat facilitated drug transport across human epidermis. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 81, p. 642–649, 2012.



---

**DISCUSSÃO GERAL**

---



A crescente utilização de métodos *in vitro* para avaliar a absorção percutânea de medicamentos tópicos ou sistêmicos tem voltado as atenções de agências regulatórias na tentativa de harmonização de técnicas utilizadas durante os experimentos, uma vez que as divergências podem ser claramente encontradas na literatura e também entre os guias regulatórios. Diante disso, avaliando a flexibilidade desses documentos, muitos autores têm trabalhado no contexto de minimizar as diferenças, padronizando protocolos e tornando os métodos *in vitro* mais reprodutíveis e confiáveis.

Nesse contexto, a presente pesquisa foi desenhada no intuito de avaliar parâmetros *in vitro* flexíveis nos guias e divergentes na literatura como o modo de separação das camadas da pele, estabilidade da capacidade de penetração e permeação da pele congelada e a comparação entre os dois locais anatômicos de obtenção da pele mais reportados na literatura, empregando pele suína como modelo de membrana e penciclovir como fármaco modelo. Além disso, desenvolveu-se uma formulação inovadora (nanoemulsão) visando contemplar diferentes comportamentos das questões analisadas perante o tipo de formulação utilizada. Ainda, método bioanalítico foi validado para avaliar a penetração e permeação cutânea do PCV *in vitro*.

Primeiramente, desenvolveram-se as nanoemulsões de PCV. Para isso, utilizou-se a técnica de homogeneização à alta pressão e a concentração final da formulação foi 0,1%.

Simultaneamente ao desenvolvimento da formulação, método bioanalítico por cromatografia líquida para quantificação do fármaco nas camadas da pele foi desenvolvido e validado. A validação de método por CLAE, com a utilização de coluna C8 e detector UV/DAD, permitiu a análise qualitativa e quantitativa do fármaco de maneira rápida e eficiente. Além disso, a eluição diferenciada do fármaco e matriz biológica garantiu a especificidade do método.

Na seqüência foram realizados estudos de permeação e penetração cutânea *in vitro* utilizando células de difusão de Franz e pele suína como membrana e tampão fosfato pH 7,4 como meio receptor para verificar a

liberação tópica da formulação desenvolvida em comparação com a formulação comercial (creme 1%).

Finalmente, foram executados os estudos comparativos *in vitro* para avaliar as questões anteriormente mencionadas utilizando as condições acima. Quanto à técnica de separação, o modo de separação mecânico demonstrou ser mais adequado devido a maior aplicabilidade e menor perda de fármaco. A permeabilidade da pele suína apresenta-se estável em até 30 dias após o congelamento das peles frescas e entre os locais anatômicos testados (orelha e abdômen suíno) não houve diferença significativa de permeação e penetração para as duas formulações testadas tanto na epiderme quanto derme quando obtidas antes do escaldado, em contrapartida o abdome obtido após o escaldado tem sua permeação e penetração aumentada e isso pode ser assegurado devido a não integridade da pele como pôde ser visualizado nas análises histológicas.



---

**CONCLUSÕES**

---



- As nanoemulsões contendo PCV desenvolvidas pelo procedimento de homogeneização a alta pressão apresentaram-se monodispersas com diâmetro de gotícula de 180-200 nm, potencial zeta de cerca de -27 mV e teor de penciclovir de 98%.
- A estrutura das nanoemulsões foi mantida após a incorporação em gel de carbômero 940 e as formulações gelificadas apresentaram comportamento reológico do tipo não-Newtoniano plástico e não apresentaram tixotropia.
- A metodologia analítica desenvolvida e validada para quantificação de penciclovir em amostras de pele de orelha suína demonstrou ter alta sensibilidade, especificidade e uma adequada recuperação do fármaco a partir das matrizes biológicas epiderme e derme.
- Estudos *in vitro* conduzidos com o objetivo de avaliar o método analítico e a entrega tópica das nanoemulsões gelificadas em comparação com a formulação comercial (creme a 1%) demonstraram que, embora a formulação comercial seja 10 vezes mais concentrada, diferença menor foi obtida nas quantidades de PCV retidas nas camadas da pele.
- A formulação comercial forneceu retenção do fármaco apenas três vezes maior que a formulação desenvolvida, sendo que a formulação desenvolvida apresentou maiores fluxo e coeficiente de permeabilidade do que a formulação comercial, podendo estes parâmetros ser os responsáveis pela menor diferença na retenção a partir das formulações.
- As nanoemulsões incorporadas em gel hidrofílico demonstraram ser promissoras para liberação tópica de PCV na pele.
- Os estudos comparativos *in vitro* para a técnica de separação das camadas da pele demonstraram que o método de separação mecânica é a melhor escolha, por não possuir as limitações do modo clássico e fornecer resultados mais confiáveis principalmente quando aplicado a fármacos solúveis em água.
- O congelamento da pele suína demonstrou um aumento significativo na retenção e permeabilidade do PCV após 30 dias de congelamento.

- Não foram encontradas diferenças significativas na penetração e permeação entre orelha e abdome suíno quando obtidos antes do procedimento de escaldo.
- Análises histológicas demonstram que, após passar pelo escaldo, a pele suína perde sua integridade, sendo este o principal fator para o aumento da penetração e permeabilidade detectadas em comparação com a pele íntegra.