

GUILHERME CARNEIRO

**LIPOSSOMAS CONTENDO PAROMOMICINA:  
DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E  
ESTUDOS DE PERMEAÇÃO CUTÂNEA *IN VITRO***

**BELO HORIZONTE  
FACULDADE DE FARMÁCIA/UFMG  
2007**

**GUILHERME CARNEIRO**

**LIPOSSOMAS CONTENDO PAROMOMICINA: DESENVOLVIMENTO,  
CARACTERIZAÇÃO E ESTUDOS DE PERMEAÇÃO CUTÂNEA *IN*  
*VITRO***

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Lucas Antônio Miranda Ferreira

Co-orientadores: Prof. Dra. Mônica Cristina de Oliveira e Prof. Dr. Gilson Andrade Ramaldes

Belo Horizonte

Faculdade de Farmácia da UFMG

2007

Este trabalho contou com a colaboração de:

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Elzírria de Aguiar Nunan  
Laboratório de Controle de Qualidade, UFMG

Dedico este trabalho:

aos meus pais, Ede e Rita, pela confiança e pelo carinho,  
aos meus amigos, pelo incentivo e presença,  
ao prof. Lucas, por seu apoio e confiança.

"O erro não se torna verdade por se difundir e multiplicar facilmente.  
Do mesmo modo que a verdade não se torna erro pelo fato de ninguém a ver."

(Mahatma Gandhi)

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, Pai onipotente. Com Ele, toda conquista é possível.

Ao professor Lucas, meu orientador, meu sincero agradecimento pela oportunidade de trabalharmos juntos. Obrigado por ter sido um exemplo de profissionalismo, de competência, confiança e dedicação. Agradeço imensamente todos os ensinamentos dispensados, acadêmicos e aqueles que vão além.

Aos meus pais, por toda a confiança em mim depositada, por seu amor e por todo o apoio durante toda a execução deste trabalho.

Aos meus amigos, co-mestrandos comigo, a conquista não é tão valiosa sem vocês ao meu lado.

Aos professores Mônica e Gilson, por todas as riquíssimas sugestões, por todo o convívio e aprendizado.

À professora Elzília por todo seu acompanhamento nos ensaios microbiológicos. Sua colaboração foi fundamental, não só apenas neste trabalho, mas em toda minha vida acadêmica.

Aos amigos do LTF, Álvaro, Andréa, Berta, Cristiane Giuberti, Cristiane Moraes, Eduardo, Elaine, Erly, Gisele, Isabel, José Geraldo, Juliana, Marta, prof. Renata, Ricardo, Sávia, Samuel, Talita, Vanessa e prof. Vildete, pela amizade e companheirismo, pelas informações multiplicadas e pelas horas de trabalho e diversão compartilhadas no dia-a-dia.

À Délia, por sua amizade e por seu companheirismo. Seu auxílio foi fundamental neste trabalho.

À professora Gerluza, pela gentileza e disponibilidade na contribuição para este trabalho e por outros ensinamentos que vão além da Academia.

À Rose e à Jurema, secretárias do PPGCF, por tornar a pós-graduação muito menos burocrática e muito mais amorosa.

Ao Eduardo, técnico responsável do LTF, um agradecimento especial pela convivência, pela ajuda e por sua disponibilidade em vários momentos adversos.

Aos amigos do Laboratório de Controle de Qualidade, Fernando, Janaína, Ana Gabriela, Larissa, Michele e Isabela, pelo companheirismo e por tornar o trabalho cotidiano bem mais divertido.

Aos amigos do Laboratório de Radioisótopos, pelo convívio.

Ao professor Lauro, por toda a atenção e gentileza em fotografar as imagens obtidas através das análises histológicas.

À Mirian, farmacêutica responsável do CEDAFAR, pela gentileza em disponibilizar a utilização do espectrofotômetro e pelas sugestões sempre enriquecedoras.

Aos funcionários do CEDAFAR, Márcia, Leonardo e Tânia, por todo o auxílio e disponibilidade.

À funcionária Lúcia, por ter ajudado em vários momentos.

À professora Maria Alice pela gentileza em permitir a utilização de equipamento em seu laboratório.

Ao frigorífico Hipercofres e, especialmente, aos funcionários da linha de abate, pelas orelhas de porco fornecidas.

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	16
2.1 Leishmanioses.....	16
2.2 Leishmaniose Cutânea.....	17
2.3 Quimioterapia da Leishmaniose Cutânea.....	18
2.3.1 Paromomicina.....	19
2.3.1.1 Estudos <i>in vitro</i> .....	19
2.3.1.2 Estudos <i>in vivo</i> .....	20
2.3.1.3 Estudos clínicos.....	21
2.3.1.4 Permeação cutânea <i>in vitro</i> da PA.....	23
2.4 Pele.....	23
2.4.1 Estrutura da pele.....	23
2.4.2 Rotas de penetração.....	24
2.4.3 Avaliação da permeação cutânea <i>in vitro</i> .....	25
2.5 Lipossomas.....	28
2.5.1 Caracterização dos lipossomas.....	30
2.5.2 Aplicação tópica.....	31
3 OBJETIVOS.....	33
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	34
4.1 Material.....	34
4.2 Obtenção das preparações.....	36
4.2.1 Preparo dos lipossomas pelo método REV.....	36
4.3 Caracterização química e físico-química dos lipossomas.....	37
4.3.1 Determinação do teor de encapsulação.....	37
4.3.2 Determinação do diâmetro das vesículas.....	37
4.3.3 Determinação do potencial zeta das vesículas.....	38
4.4 Ensaio microbiológico.....	38
4.5 Permeação e penetração cutânea <i>in vitro</i> .....	40
4.5.1 Preparação da pele.....	41
4.5.1.1 Retirada da epiderme.....	41
4.5.1.2 Retirada do estrato córneo.....	41



4.5.2 Montagem das células de Franz.....	42
4.5.3 Aplicação das preparações.....	42
4.5.4 Determinação da difusão.....	42
4.5.4.1 Remoção da PA não absorvida.....	43
4.5.4.2 Extração da PA na pele.....	43
4.5.4.2.1 Validação da extração da PA da pele.....	43
4.5.5 Análise estatística.....	44
4.6 Análise histológica.....	44
4.7 Determinação de perda de água transepidermica.....	44
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
5.1 Obtenção da curva-padrão.....	46
5.2 Caracterização química e físico-química dos lipossomas.....	47
5.3 Estudo de estabilidade dos lipossomas.....	50
5.4 Validação da retirada de estrato córneo e epiderme.....	52
5.4.1 Análises histológicas.....	52
5.4.2 Determinação da Perda de Água Transepidermica (PAT).....	54
5.5 Permeação e penetração cutânea <i>in vitro</i> da PA.....	56
5.5.1 Permeação e penetração da PA através da pele intacta.....	56
5.5.2 Permeação e penetração da PA através da pele sem EC.....	58
5.5.3 Permeação cutânea da PA através da pele sem epiderme.....	61
6 CONCLUSÃO GERAL.....	64
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
A/O	água em óleo
BHT	butilhidroxitolueno
CDF	célula de difusão de Franz
Chol	colesterol
CMB	cloreto de metilbenzetônio
dp	desvio padrão
DPPC	dipalmitoilfosfatidilcolina
EC	estrato córneo
EDTA	ácido etilenodiaminotetraacético
HEPES	N-2-hidroxietilpiperazina
IP	índice de polidispersão
LC	leishmaniose cutânea
LUV	<i>large unilamellar vesicles</i>
ND	não detectado
O/A	óleo em água
PA	paromomicina
PAT	perda de água transepidermica
PBS	tampão fosfato salina
PC	fosfatidilcolina de soja
PCS	<i>photon correlation spectroscopy</i>
REV	evaporação em fase reversa
UFC	unidades formadoras de colônia
USP	<i>United States Pharmacopeia</i>

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Caracterização das formulações lipossomais quanto ao teor de encapsulação, diâmetro e índice de polidispersão (IP).....	44
Tabela 2 – Permeação e penetração cutânea <i>in vitro</i> da PA, a partir das formulações lipossomais, através da pele intacta.....	53
Tabela 3 – Permeação cutânea <i>in vitro</i> da PA, a partir das formulações lipossomais e em solução, através da pele sem EC, após 8h.....	55
Tabela 4 – Penetração cutânea <i>in vitro</i> da PA, a partir das formulações lipossomais, através da pele sem EC.....	56
Tabela 5 – Permeação cutânea <i>in vitro</i> da PA, após 8h, a partir das formulações lipossomais e em solução, através da pele de orelha de porco sem epiderme.....	59

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Forma promastigota de <i>Leishmania sp.</i> .....	12
Figura 2 – Lesões características da LC.....	13
Figura 3 – Fórmula Estrutural da PA.....	14
Figura 4 – Representação da estrutura da epiderme apresentando as 4 principais camadas nos diferentes estágios de diferenciação.....	19
Figura 5 – Diagrama simplificado do EC e duas micro-rotas de penetração de fármacos.....	20
Figura 6 - Representação esquemática de uma célula de difusão de Franz.....	21
Figura 7 – Representação esquemática da retirada do EC por meio da técnica do <i>tape stripping</i> .....	22
Figura 8 – Representação esquemática de um eletrodo responsável pelas medidas da PAT.....	23
Figura 9 – Tipos de agregação molecular das moléculas lipídicas e tipos de lipossomas.....	24
Figura 10 – Fórmula estrutural dos glicerofosfolípides e dos principais derivados de fosfatidilcolina.....	25
Figura 11 – Fórmula estrutural do colesterol (A) e representação da interação entre o colesterol (Chol) e uma molécula de dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC)....	26
Figura 12 – Placa de Petri apresentando os halos de inibição referentes à concentração de 0,8 µg/mL.....	36
Figura 13 – Representação gráfica de duas curvas padrão de PA, obtidas por doseamento microbiológico, em dias diferentes.....	42
Figura 14 – Representação gráfica da curva-padrão de PA (média ± dp), obtida por ensaio microbiológico, na faixa de 0,2 a 3,2 µg/mL.....	43
Figura 15 – Perfil de estabilidade do teor total de PA (%) nas formulações lipossomais conforme o tempo.....	47
Figura 16 – Perfil de estabilidade da encapsulação da PA (%) nas formulações lipossomais conforme o tempo.....	47
Figura 17 – Análises histológicas de pele de orelha de porco, observadas sob aumento de 40 x.....	49
Figura 18 – Determinação da Perda de Água Transepidérmica.....	50

Figura 19 – Permeação cutânea (em $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) <i>in vitro</i> da PA a partir das formulações lipossomais e da solução, através de pele de orelha de porco sem epiderme.....	57
Figura 20 – Permeação cutânea (em porcentagem de dose aplicada) <i>in vitro</i> da PA a partir das formulações lipossomais e da solução, através de pele de orelha de porco sem epiderme.....	58

## RESUMO

A paromomicina (PA), um antibiótico aminoglicosídeo hidrofílico, tem sido utilizada como alternativa para o tratamento tópico de leishmaniose cutânea (LC). Apesar de este regime ter mostrado resultados promissores, ele não tem acelerado a recuperação em muitos casos. Isto pode ser atribuído, pelo menos em parte, à baixa penetração da PA na pele. Uma vez que as formulações lipossomais proporcionam aumento de penetração cutânea, o objetivo deste estudo foi preparar e caracterizar lipossomas contendo PA e investigar seu potencial como sistema de liberação tópica deste antibiótico. Foram preparadas vesículas unilamelares grandes (LUVs) pelo método de evaporação por fase reversa. Os lípides usados foram fosfatidilcolina de soja (PC), PC/Colesterol (Chol) (razão molar 60/40), dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) e DPPC/Chol (razão molar 60/40). Os experimentos de permeação cutânea foram realizados utilizando pele de orelha de porco montadas em células de difusão de Franz. Três modelos foram usados: pele intacta, sem estrato córneo (EC) e sem epiderme. A remoção do EC (30 *strippings*) foi confirmada por meio da determinação da perda de água transepidérmica (PAT) e de análises histológicas, as quais demonstraram uma remoção quase completa do EC. A retirada da epiderme foi confirmada por meio de análises histológicas. A permeação da PA através de pele intacta foi desprezível, independente da formulação testada. Entretanto, a penetração cutânea (% da dose aplicada) foi de  $7.2 \pm 0.2\%$ ,  $4.8 \pm 0.2\%$  e  $1.9 \pm 0.1\%$  para PC, PC/Chol e solução aquosa, respectivamente. A permeação do fármaco através de pele sem EC foi de  $19.6 \pm 0.8\%$ ,  $6.1 \pm 0.5\%$  e  $1.0 \pm 0.6\%$  para PC, PC/Chol e solução aquosa, respectivamente, enquanto que a permeação através de pele sem epiderme foi de  $7.3 \pm 0.7\%$ ,  $10 \pm 2\%$  e  $26 \pm 3\%$ . Assim sendo, os lipossomas proporcionaram aumento significativo da penetração e permeação da PA através da pele intacta e sem EC, enquanto que uma liberação tópica controlada foi observada em permeação através de pele sem epiderme.

## ABSTRACT

Paromomycin (PA), an aminoglycoside antibiotic, has been used as an alternative for topical treatment of the cutaneous leishmaniasis (CL). Although this treatment has shown promising results, it has not been successful in accelerating the recovery in most cases. This could be attributed, at least in part, to the low skin penetration of PA. Considering that liposomal formulations usually provide skin penetration enhancement, the aim of this study was to prepare and to characterize liposomal formulations containing PA and to investigate their potential as topical delivery systems of this antibiotic. Large unilamellar vesicles (LUVs) were prepared by reverse-phase evaporation method. The lipids used were soybean phosphatidylcholine (PC), PC/Cholesterol (Chol) (molar ratio 60:40), dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) and DPPC/Chol (molar ratio 60:40). Permeation experiments using pig ear skin were performed in Franz diffusion cells. Three models of skin were used: intact, stripped and without epidermis. The removal of the stratum corneum (SC – 30 strippings) was confirmed by the determination of transepidermal water loss (TEWL) values and by histological analysis, which demonstrated an almost complete removal of EC. The removal of the epidermis was confirmed by histological analysis. PA permeation through intact skin was negligible, independent of the formulation tested. However, the skin penetration (as % dose applied) was  $7.2 \pm 0.2\%$ ,  $4.8 \pm 0.2\%$  and  $1.9 \pm 0.1\%$  for PC, PC/Chol and aqueous solution, respectively. Drug permeation across stripped skin was  $19.6 \pm 0.8\%$ ,  $6.1 \pm 0.5\%$  and  $1.0 \pm 0.6\%$  for PC, PC/Chol and aqueous solution, respectively, whereas permeation across skin without epidermis was  $7.3 \pm 0.7\%$ ,  $10 \pm 2\%$  and  $26 \pm 3\%$ . Thus, liposomes provided significant PA penetration and permeation enhancement across intact and stripped skin while controlled topical delivery was observed in permeation across skin without epidermis.

## 1 INTRODUÇÃO

A administração parenteral de antimoniais pentavalentes dentre eles, o estibogluconato de sódio (Pentostam<sup>®</sup>) e antimoniato de n-metilglucamina (Glucantime<sup>®</sup>), em uma dose diária de 20 mg Sb<sup>+5</sup>/kg durante 20 a 30 dias constitui o tratamento de primeira escolha para as leishmanioses em geral. Entretanto, a toxicidade deste regime é muito alta, sendo relatados mialgias, artralgias, sintomas abdominais como pancreatite química e hepatoesplenomegalia, dores de cabeça, diminuição dos níveis de plaquetas e cardiotoxicidade.

Uma alternativa inovadora para tratamento da forma cutânea desta doença (leishmaniose cutânea – LC) é um agente tópico que pode ser aplicado diretamente sobre a lesão devido à simplicidade de administração e redução dos custos de aplicação. A aplicação de uma formulação tópica de baixa toxicidade surge como uma possibilidade para resolver o problema da falta de opções terapêuticas.

A paromomicina (PA), um antibiótico aminoglicosídeo, vem sendo o fármaco mais usado nesta modalidade de tratamento. No entanto, apesar desta opção ter sido avaliada há muitos anos, seu uso clínico ainda não foi consagrado, devido aos resultados variáveis.

Uma consideração importante no tratamento tópico da LC é a condição da pele. Formulações tópicas podem ser aplicadas em lesões ulceradas, as quais perderam a proteção do estrato córneo (EC), ou em lesões com hiperqueratose, que representam uma barreira adicional à absorção. A penetração cutânea de fármacos hidrofílicos, tais como a PA, através de pele intacta geralmente é dificultada pela incapacidade de penetrar no EC. Neste sentido, lipossomas podem constituir uma alternativa interessante para veicular este antibiótico.

Estudos prévios mostraram que lipossomas são capazes de aumentar a permeação e penetração da PA na pele intacta e promover liberação controlada na pele sem EC. No entanto, estes estudos foram conduzidos com pele de camundongos glabros, um modelo limitado para simular a pele humana. Portanto, este trabalho tem por objetivo ampliar aqueles estudos, investigando a estabilidade e permeação cutânea da PA a partir dos lipossomas aplicados sobre a pele da orelha de porco, um modelo relevante para a pele humana.



## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Leishmanioses

A Organização Mundial de Saúde (OMS) considera a leishmaniose uma das seis mais importantes doenças tropicais, com 2 milhões de casos novos a cada ano (1 a 1,5 milhão apenas para LC), sendo que aproximadamente 12 milhões de pessoas estão infectadas atualmente em todo o mundo e aproximadamente 350 milhões estão em situação de risco (DESJEUX, 2004; OMS, 2007).

Apesar de a leishmaniose afetar 88 países, cerca de 90% dos casos de LC ocorrem no Afeganistão, Algéria, Irã, Arábia Saudita e Síria, no “Velho Mundo” e Brasil e Peru, no “Novo Mundo”, enquanto que 90% dos casos de leishmaniose visceral ocorrem em Bangladesh, Índia, Nepal, Sudão e Brasil (DESJEUX, 2004; OMS, 2007).

As formas clínicas da leishmaniose são particularmente diversas e representam um complexo de doenças: a leishmaniose visceral, que é fatal quando não tratada, a leishmaniose mucocutânea, uma doença mutilante, a leishmaniose cutânea difusa, uma doença de longa duração devido à resposta imune celular deficiente e a LC (DESJEUX, 2004). A forma cutânea da doença é a mais comum e pode causar de 1 a 200 lesões na pele que podem ou não ser de difícil tratamento, sendo que neste caso podem acarretar deformidades e seqüelas (OMS, 2007).

As leishmanioses são causadas por protozoários (Figura 1) da ordem *Kinetoplastida*, família *Trypanosomatidae* e gênero *Leishmania*, que parasitam células do sistema fagocitário mononuclear de humanos e outros mamíferos, principalmente macrófagos (CORRÊA *et al.*, 2005).

Os parasitas se multiplicam na saliva do flebotomíneo e se tornam infectantes em 8 a 20 dias. Ao picar um animal ou ser humano infectado, as fêmeas do flebotomíneo (*Phlebotomus* spp. e *Lutzomyia* spp.) tornam-se infectadas. Os parasitas são inoculados quando o flebotomíneo pica sua vítima seguinte. Os flebotomíneos são mais ativos do anoitecer até a madrugada (DESJEUX, 2004; MURRAY *et al.*, 2005).

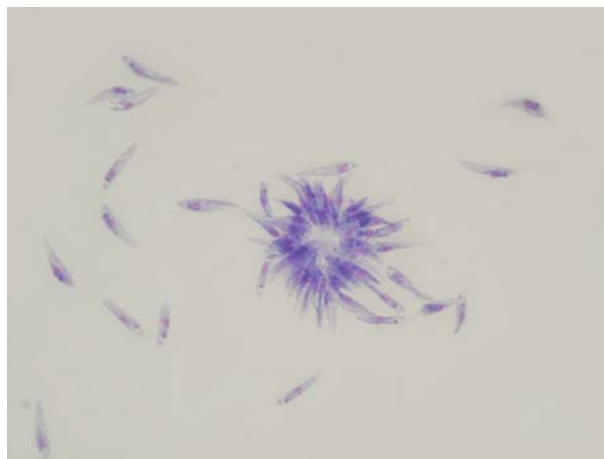


Figura 1 – Forma promastigota de *Leishmania* sp.

## 2.2 Leishmaniose Cutânea

Múltiplas espécies causam a LC em crianças e adultos, principalmente *Leishmania (Leishmania) major*, *L. (L.) tropica* e *L. (L.) aethiopica* (Velho Mundo); *L. (L.) infantum* e *L. (L.) chagasi* (região do Mediterrâneo e mar Cáspio); *L. (L.) mexicana*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (Viannia) braziliensis*, *L. (V.) panamensis*, *L. (V.) peruviana* e *L. (V.) guyanensis* (Novo Mundo) (MURRAY *et al.*, 2005).

A LC resulta da multiplicação da *Leishmania* nos fagócitos da pele. Na progressão clássica da doença, as lesões evoluem de pápulas para nódulos e depois para úlceras e podem ou não se curar espontaneamente, sendo que a cura acontece em 90 % dos casos em 3 a 18 meses (BERMAN, 2005; DAVIES *et al.*, 2003).

A lesão típica da LC é uma úlcera não-dolorosa bem circunscrita com uma borda elevada e endurecida, além de uma base necrótica que é geralmente coberta por uma crosta de exsudato seco. A maioria dos pacientes tem uma ou duas lesões, geralmente nas partes expostas, variando de 0,5 a 3 cm de diâmetro. Há, entretanto, consideráveis variações, como, por exemplo, algumas lesões que não ulceram e múltiplas lesões, encontradas no Velho Mundo (Figura 2). Infecção bacteriana secundária é comum e pode levar à dor. Normalmente, as lesões se curam em meses ou anos, deixando uma cicatriz (HEPBURN, 2003).



Figura 2 – Lesões características da LC.

(A) Leishmaniose cutânea localizada (lesão em início de processo de reapitelização). (B) Leishmaniose mucocutânea. (C) Leishmaniose cutânea disseminada. (D) Leishmaniose cutânea difusa. (BRASIL, 2000; MURRAY *et al.*, 2005)

### 2.3 Quimioterapia da Leishmaniose Cutânea

O tratamento de primeira escolha para a LC tem sido a administração parenteral de antimoniais pentavalentes, na forma de estibogluconato de sódio (Pentostam<sup>®</sup>) e antimoniato de n-metilglucamina (Glucantime<sup>®</sup>), em uma dose diária de 20 mg/kg/dia de antimônio durante 20 dias (BERMAN, 2005). Entretanto, a toxicidade destes medicamentos é muito alta, sendo relatados mal-estares, anorexia, mialgias, artralgias, sintomas abdominais como pancreatite química e hepatoesplenomegalia, dores de cabeça, leve leucopenia, diminuição dos níveis de plaqueta e cardiotoxicidade. Além disso, ultimamente, têm aparecido sinais de resistência aos antimoniais, especialmente na Índia (CROFT & COOMBS, 2003; HEPBURN, 2003).

A anfotericina B e a pentamidina, administradas por via parenteral, constituem os fármacos de segunda escolha. No entanto, estes fármacos também estão associados à incidência elevada de reações adversas. A utilização de anfotericina B lipossomal, bem com de outras formulações lipídicas, incluindo um complexo lipídico e uma dispersão coloidal, estão disponíveis, mas possuem custo elevado. A administração oral da miltefosina e tópica do Imiquimod<sup>®</sup> ainda estão em caráter experimental (BERMAN, 2005; CROFT *et al.*, 2006).

Uma alternativa inovadora para tratamento da forma cutânea desta doença (LC) é um agente tópico que pode ser aplicado diretamente sobre a lesão devido à simplicidade de administração e redução dos custos de aplicação. A aplicação de uma formulação tópica de baixa toxicidade surge como possibilidade para resolver o problema da falta de opções terapêuticas, sendo este regime mais seguro e eficaz (BERMAN, 2005).

### 2.3.1 Paromomicina

A PA ou aminosidina, antibiótico aminoglicosídeo (Figura 3) que difere da neomicina B apenas pela substituição de  $\text{CH}_2\text{OH}$  por  $\text{CH}_2\text{NH}_2$  em um dos três açúcares, é o fármaco mais investigado para o tratamento tópico da LC. A PA, uma molécula polar, relativamente insolúvel em lípidos e de elevada massa molar (615,64 g/mol), possui um amplo espectro de ação, incluindo atividade contra protozoários, bactérias e cestódios (SWEETMAN, 2005).

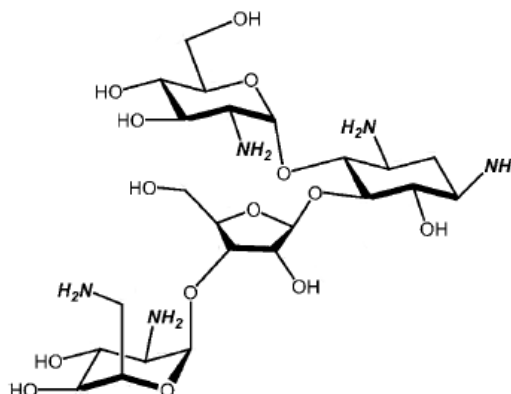


Figura 3 – Fórmula Estrutural da PA (BARBIERI & PILCH, 2006 – modificado).

#### 2.3.1.1 Estudos *in vitro*

Com o objetivo de selecionar um fármaco leishmanicida a ser incorporado em uma formulação tópica, EL-ON & GRENBLETT (1983) conduziram estudos *in vitro* utilizando amastigotas de *L. (L.) major* em macrófagos peritoniais de camundongos. Somente o sulfato de paromomicina (PA), na concentração de 10  $\mu\text{g/mL}$ , eliminou totalmente os parasitas intracelulares sem causar toxicidade relevante aos macrófagos.

Em outro estudo, NEAL *et al.* (1995) verificaram a atividade da PA contra diferentes espécies de leishmania, na forma de amastigotas em macrófagos peritoniais coletados de camundongos CD1. A PA apresentou alta eficácia contra *L. (L.) major* e *L. (L.) tropica*, entretanto, a eficácia foi menor em relação às cepas do Novo Mundo – *L. (V.) panamensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) mexicana*.

### 2.3.1.2 Estudos *in vivo*

Diversos estudos *in vivo*, utilizando animais experimentalmente infectados, foram realizados. Agentes quimioterápicos com atividade leishmanicida potencial ou estabelecida foram incorporados em diferentes pomadas ou bases para cremes e testados em camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) major*. Somente formulações contendo PA (15%), associada ao cloreto de metilbenzetônio (CMB) a 12%, incorporados em pomada de vaselina branca, se mostraram eficazes (EL-ON *et al.*, 1984). Estudos posteriores também confirmaram a eficácia da combinação PA a 15 % e CMB a 12 % utilizando, inclusive, outras espécies de *Leishmania* (EL-ON *et al.* 1987, EL-ON *et al.*, 1989 e CARTER *et al.*, 1989). No entanto, o CMB, um tensoativo quaternário de amônio, se mostrou muito irritante.

A fim de reduzir esta reação inflamatória, o CMB foi substituído pela uréia (NEAL *et al.*, 1994) ou pela gentamicina (GROGL *et al.*, 1999). Estas formulações mostraram alta taxa de cura em camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) major*.

A eficácia de uma nova formulação (gel hidrofílico) contendo PA foi maior do que o antimônio em camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis*, enquanto que, para hamsters infectados com *L. (V.) braziliensis*, a eficácia foi similar para os dois tratamentos (GONÇALVES *et al.*, 2005). Quando comparada com um antifúngico triazol (fluconazol), tópico ou oral, a eficácia do gel foi maior contra *L. (L.) major* ou *L. (L.) amazonensis* (MUSSI & FERREIRA, 2007). Esta formulação inovadora do gel hidrofílico da PA apresenta vantagens em relação à pomada PA/CMB, devido à ausência do agente diretamente implicado na toxicidade local (CMB), bem como pelo fato de a concentração de PA ser menor (10%).

### 2.3.1.3 Estudos clínicos

Em um estudo clínico, dois pacientes portadores de LC recidivante causada por *L. (L.) tropica* foram curados mediante um tratamento com uma pomada contendo 15% de PA e 1 % de CMB. Eles foram tratados duas vezes ao dia e acompanhados durante 10 a 12 meses (EL-ON *et al.*, 1985).

EL-ON *et al.* (1986) trataram pacientes infectados por *L. (L.) major* com uma pomada contendo PA a 15% e CMB a 12%, obtendo 72% de cura. Em um outro estudo, esta taxa foi de 76,6% com a mesma formulação, entretanto, para a pomada contendo PA a 15% e CMB a 5%, a taxa de cura foi de 66,6% dos pacientes (EL-ON *et al.*, 1992).

A avaliação clínica de uma pomada contendo PA a 15% foi realizada em pacientes do Sudão infectados por *L. (L.) major*, os quais foram tratados duas vezes ao dia durante 10 dias (EL-SAFI *et al.*, 1990). A eficácia de uma pomada contendo PA a 15% e uréia a 10% foi avaliada em pacientes infectados por *L. (L.) major* duas vezes ao dia, durante 14 dias, por ASILIAN *et al.* (1995) e BEN SALAH *et al.* (1995), no Irã e na Tunísia, respectivamente. Os resultados destes estudos não revelaram diferenças significativas entre o grupo tratado e o placebo. Entretanto, um tratamento de 12 semanas em pacientes com LC do Velho Mundo, utilizando uma formulação contendo PA a 12 ou 15% e uréia a 10%, obteve uma cura equivalente a 85% (BRYCESSON *et al.*, 1994).

WEINRAUCH *et al.* (1993), em Belize, obtiveram 68% de cura dos pacientes infectados por *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) mexicana* com uma pomada contendo 15% de PA e 12% de CMB duas vezes ao dia durante 14 a 21 dias. No Equador, 72% dos pacientes infectados com *L. (V.) panamensis* obtiveram cura após 50 dias de tratamento (KRAUSE & KROEGER, 1994), ao passo que na Guatemala 91,4% dos pacientes tratados por 20 dias apresentaram cura clínica, 13 semanas após o fim do tratamento, contra 39,4% de cura no grupo que recebeu o placebo (ARANA *et al.*, 2001).

A associação do tratamento tópico contendo PA e CMB ao tratamento parenteral utilizando N-metilglucamina foi avaliada em pacientes infectados por *L. (L.) braziliensis* e *L. (V.) panamensis* (SOTO *et al.*, 1995; SOTO *et al.*, 1998). No primeiro estudo, a cura foi de 90% dos pacientes tratados, enquanto que, no segundo, a taxa de cura foi 58% dos pacientes. Esta diferença é sugerida, segundo

o autor, a um controle maior no segundo estudo. O critério de cura deste estudo foi criticado por KRAUSE & KROEGER (1999), já que ocorre um aumento da lesão provocado pela reação inflamatória do CMB, o que retarda a cicatrização de ferida.

A eficácia de uma pomada contendo 15% de PA e 10% de uréia foi avaliada no tratamento da LC não-ulcerativa causada por *L. (L.) mexicana* e *L. (L.) chagasi*. O grupo tratado e o controle não apresentaram diferenças significativas, talvez pelo fato de que as lesões não estavam ulceradas, o que limitaria a penetração cutânea do fármaco (NEVA *et al.*, 1997).

SOTO *et al.* (2002) avaliaram a eficácia de uma emulsão hidrofilica tipo óleo em água (O/A) contendo 15% de PA e 0,5% de gentamicina em pacientes colombianos infectados por *L. (V.) panamensis*. A taxa de cura do grupo tratado (61%) não foi significativamente diferente daquela observada com o placebo (55%).

No Irã, dois estudos revelaram a ineficácia do tratamento tópico contendo PA a 15% e uréia a 10% em pacientes com a leishmaniose do Velho Mundo. A taxa de cura em ambos foi de 17% (FAGHIHI & TAVAKOLI-KIA, 2003; IRAJI & SADEGHINIA, 2005). ASILIAN *et al.* (2003) também trataram pacientes iranianos com uma pomada contendo PA, a fim de comparar a eficácia clínica e parasitológica de um tratamento de duas semanas com aquele de quatro semanas. A cura clínica e parasitológica foi de 74% e 44%, respectivamente, para o tratamento por quatro semanas e de 59% e 24% para os pacientes que foram tratados por duas semanas.

O conjunto destes resultados mostra que a eficácia das preparações tópicas contendo PA associada ao CMB é geralmente maior do que aquela da PA/uréia, a despeito do fato de que um estudo recente tenha mostrado taxa de cura similar entre as duas formulações (ARMIJOS *et al.*, 2004). O CMB e a uréia têm sido incorporados nestas formulações com o objetivo de aumentar a penetração cutânea da PA, no entanto, isto não tem sido investigado experimentalmente. Não existem evidências do papel acelerador de absorção do CMB e existem poucos relatos sobre esta atividade em relação à uréia.

Uma análise desses dados mostra também que, embora a PA seja tenha atividade leishmanicida comprovada (NEAL *et al.*, 1995), os resultados dos estudos clínicos são inconsistentes. Estes resultados podem ser explicados, pelo menos em parte, pela baixa penetração da PA na lesão. Seu caráter hidrofílico e massa molecular alta (MM ~ 1000) limitam sua penetração através da pele.

### 2.3.1.4 Permeação cutânea *in vitro* da PA

A permeação cutânea *in vitro* da PA, na ausência do EC, a partir de formulações hidrofílicas (gel e emulsão O/A) foi consideravelmente maior quando comparada com uma pomada de vaselina (GOMES *et al.*, 1998; FERREIRA *et al.* 2004; CASTRO *et al.*, 2003).

No entanto, estes estudos de permeação cutânea *in vitro* foram conduzidos com a pele de camundongos, um modelo que tem sido considerado de baixo valor preditivo em relação à pele humana. Entretanto, a pele suína tem sido considerada um modelo mais relevante para a pele humana e, portanto, mais interessante para este tipo de estudo (JACOBI *et al.*, 2007; WALKER *et al.*, 1997).

## 2.4 Pele

### 2.4.1 Estrutura da pele

A pele é composta principalmente de duas partes: a epiderme e a derme. A derme é um tecido conjuntivo em que se encontram várias estruturas como folículos pilosos, glândulas sudoríparas e sebáceas e vasos sanguíneos. A epiderme, um epitélio estratificado pavimentoso, é avascular. Os nutrientes e oxigênio chegam à epiderme por difusão a partir de vasos sanguíneos da derme (Figura 4).

A epiderme apresenta várias camadas que vão desde o estrato basal até o EC. O estrato basal, que é o mais profundo, está em contato com a derme e é constituído por células cúbicas, pouco diferenciadas, que se dividem continuamente e dão origem a todas as outras camadas. Algumas destas células diferenciam-se e passam para as camadas mais superficiais, enquanto outras permanecem na camada basal e continuam a dividir-se. O EC, camada mais externa da epiderme, é considerado a principal barreira à entrada e saída de substâncias. O EC é constituído de células achatadas eosinófilas com grande quantidade de filamentos. Possui de 10 a 20  $\mu\text{m}$  de espessura, e é composto por células funcionalmente mortas e queratinizadas, denominadas corneócitos.



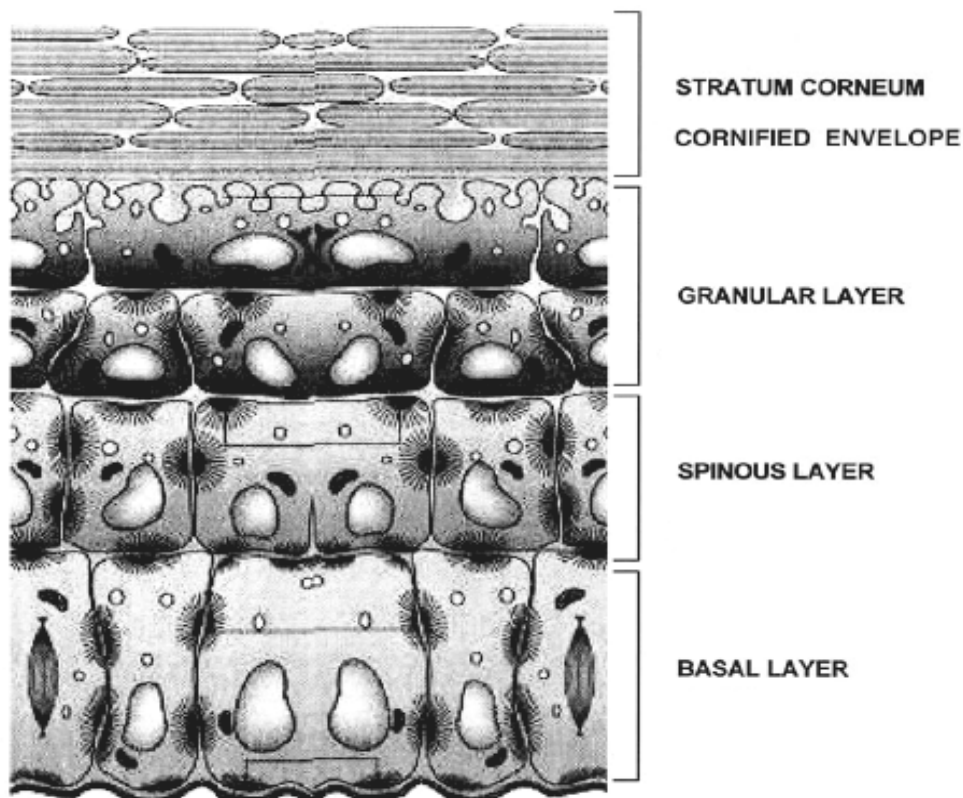


Figura 4 – Representação da estrutura da epiderme apresentando as 4 principais camadas nos diferentes estágios de diferenciação (MORGANTI *et al.*, 2001 – modificado).

As propriedades de barreira do EC são atribuídas à composição dos lípidos presentes e, em especial, ao excepcional arranjo estrutural desta matriz intercelular e ao envelope lipídico que circunda as células (MOSER *et al.*, 2001).

#### 2.4.2 Rotas de penetração

Há três vias potenciais de penetração de moléculas na pele: através dos folículos pilosos associados às glândulas sebáceas; através das glândulas sudoríparas; ou através da epiderme (BARRY, 2001). Porém, os apêndices da pele ocupam apenas 0,1% da superfície total da pele e a contribuição dessa via de penetração é normalmente considerada pequena (MOSER *et al.*, 2001).

Neste sentido, a via transepidérmica (através da epiderme), é considerada a mais importante. Há duas possíveis rotas de penetração através da epiderme (Figura 5): a rota lipídica intercelular, que ocorre entre os corneócitos, e a rota transcelular que ocorre através dos corneócitos e lipídeos (MOSER *et al.*, 2001).

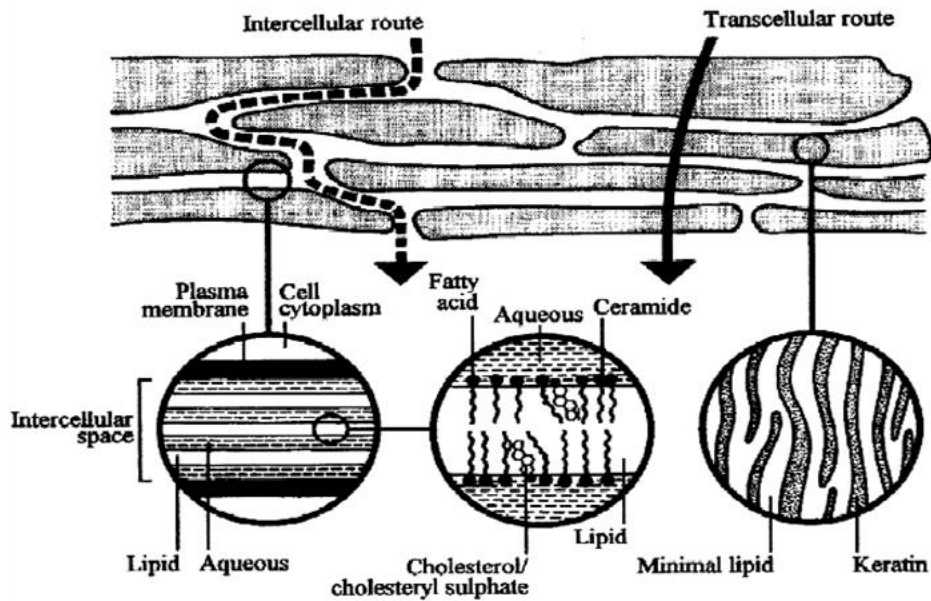


Figura 5 – Diagrama simplificado do EC e duas micro-rotas de penetração de fármacos (BARRY, 2001).

### 2.4.3 Avaliação da permeação cutânea *in vitro*

A permeação de fármacos através da pele pode ser investigada *in vitro*, uma vez que este tecido conserva suas características de permeabilidade após a excisão. A permeação cutânea *in vitro* tem sido extensivamente investigada com fragmentos, de pele humana ou animal, montados em células de difusão de Franz (CDF) (Figura 6).

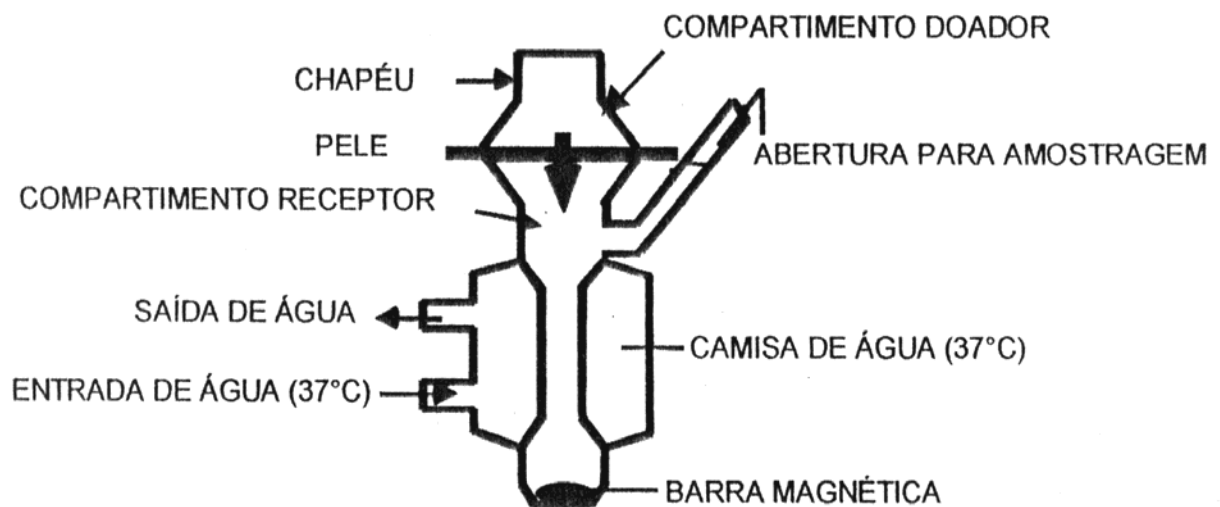


Figura 6 - Representação esquemática de uma célula de difusão de Franz.

Nesses experimentos, os fragmentos de pele são colocados horizontalmente na CDF dividindo-a em dois compartimentos: doador e receptor. O uso de pele humana nestes estudos apresenta limitações inerentes às dificuldades de obtenção e às variabilidades individuais, além de requerer a aprovação do Comitê de Ética Médica (GUPTA *et al.*, 1999; BENECH-KIEFFER *et al.*, 2000). A pele suína é uma alternativa interessante, uma vez que ela tem sido considerada um modelo relevante para a pele humana (SIMON & MAIBACH, 2000; WALKER *et al.*, 1997).

A pele de porco apresenta similaridades fisiológicas e histológicas (morfologia geral, espessura e estrutura da epiderme, espessura do EC, estrutura da derme, conteúdo de lipídios, estrutura folicular, presença de tecido adiposo subcutâneo, glândulas sebáceas associadas aos folículos pilosos e glândulas sudoríparas) em relação à pele humana (DICK & SCOTT, 1992; JACOBI *et al.*, 2007). Além disso, este modelo apresenta maior disponibilidade quando comparado à pele humana (DIEMBECK *et al.*, 1999; BENECH-KIEFFER *et al.*, 2000). Apesar de se utilizar pele suína da região dorsal em alguns estudos, a pele da região da orelha é mais confiável e tem sido usada por muitos pesquisadores (DICK & SCOTT, 1992).

Os fragmentos de pele usados podem ser intactos ou artificialmente lesionados a fim de simular uma situação clínica. Existem diferentes métodos para lesionar artificialmente os fragmentos de pele seja por meio da remoção do EC seja por meio da retirada da epiderme.

O método mais comumente empregado para a remoção do EC é o uso da técnica do *tape stripping* (BENECH-KIEFFER *et al.*, 2000). Nesta técnica, o EC é removido mecanicamente com uma fita adesiva firmemente aderida ao fragmento de pele (Figura 7).

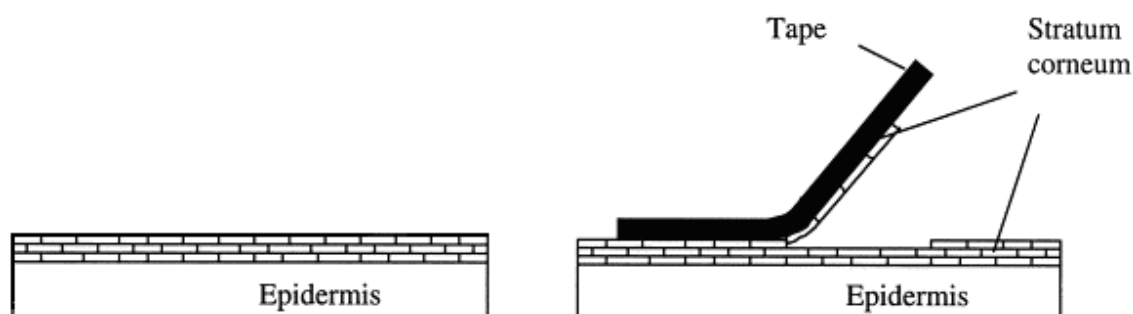


Figura 7 – Representação esquemática da retirada do EC por meio da técnica do *tape stripping*.

A utilização de um cilindro que exerça uma pressão constante sobre a pele tem minimizado a influência das invaginações que dificultam a retirada total do EC (LADEMANN *et al.*, 2005). A remoção completa do EC pode ser comprovada por meio de análises histológicas (JACOBI *et al.*, 2005) e/ou das medidas da perda de água transepidermica (PAT).

A PAT mede o fluxo de água através do EC e reflete mudanças na sua estrutura e espessura após sua remoção por meio do *tape stripping* (WEIGMANN *et al.*, 2005). As medidas são realizadas com o auxílio de um eletrodo conectado a um aparelho que detecta mudanças na transmissão do vapor de água imediatamente acima da superfície cutânea. Este eletrodo mede a umidade relativa e temperatura acima da pele (Figura 8). Quanto maior a umidade relativa maior a PAT.

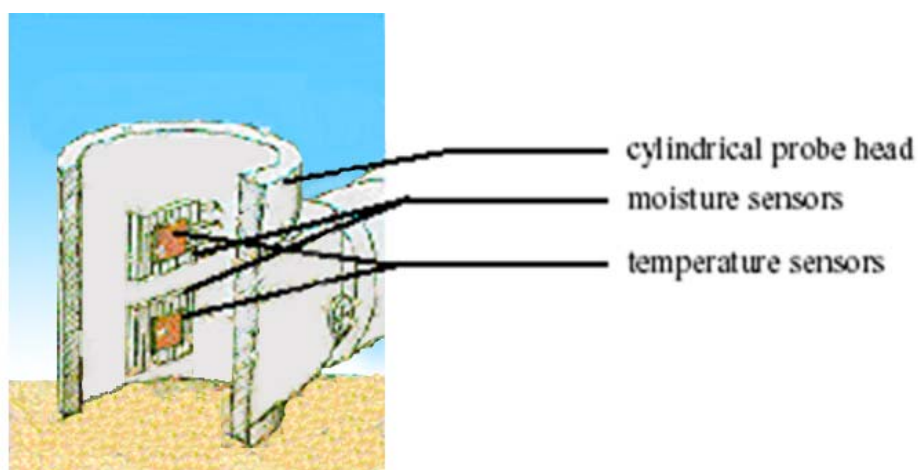


Figura 8 – Representação esquemática de um eletrodo responsável pelas medidas da PAT.

O método mais usado para a remoção da epiderme consiste na imersão do fragmento de pele em água a 60 °C durante 60 segundos e remoção desta camada com auxílio de um bisturi (DICK & SCOTT, 1992). Este procedimento não induz modificações de permeabilidade da pele quando comparado aos métodos que utilizam diferentes soluções químicas para a imersão do fragmento (BRONAUGH, 1995).

Uma importante consideração no tratamento tópico da LC é a condição da pele. A LC geralmente se desenvolve em uma úlcera com perda de epiderme e derme (NEAL *et al.*, 1994; ASILIAN *et al.*, 1995), resultando em um comprometimento da função barreira da pele. Assim, as formulações tópicas podem

ser aplicadas em lesões abertas, as quais perderam a proteção do EC, ou em lesões com hiperqueratose, que representam uma barreira adicional à absorção. Penetração cutânea de fármacos hidrofílicos, tais como a PA, através de pele intacta geralmente é dificultada pela incapacidade de penetrar no EC. Lipossomas podem aumentar a penetração cutânea de fármacos hidrofílicos, quando comparados com formulações convencionais (du PLESSIS *et al.*, 1994; HONZAK *et al.*, 2000), bem como proporcionar liberação sustentada quando aplicados na pele lesionada (KIM *et al.*, 1997). Assim, lipossomas contendo PA seria uma alternativa interessante para tratamento tópico da LC.

## 2.5 Lipossomas

Lipossomas são vesículas esféricas formadas basicamente por substâncias anfifílicas que se associam espontaneamente na forma de bicamadas contendo no centro uma cavidade aquosa (Figura 9). Geralmente são formados por fosfolípides de origem natural, sintética ou semi-sintética e possuem grande potencialidade para o transporte de substâncias hidrofílicas, lipofílicas e anfifílicas (LASIC, 1998). As substâncias hidrofílicas podem ser encapsuladas no meio aquoso interno, as lipofílicas na porção apolar das bicamadas e as anfifílicas na interface hidrofílica-lipofílica (JUNGINGER *et al.*, 1991).

Os fosfolípides são substâncias anfifílicas constituídas por uma molécula de glicerol ligada em uma das extremidades a um grupo hidrofílico como a colina (fosfatidilcolina), etanolamina (fosfatidiletanolamina), serina (fosfatidilserina) ou inositol (fosfatidilinositol); esterificada nas hidroxilas remanescentes por ácidos graxos contendo de 10 a 24 átomos de carbono com 0 a 6 ligações duplas (Figura 10). O glicerol pode ser substituído por esfingosina, base aminada componente dos cerebrosídeos, formando os esfingolípídeos (NEW, 1990).

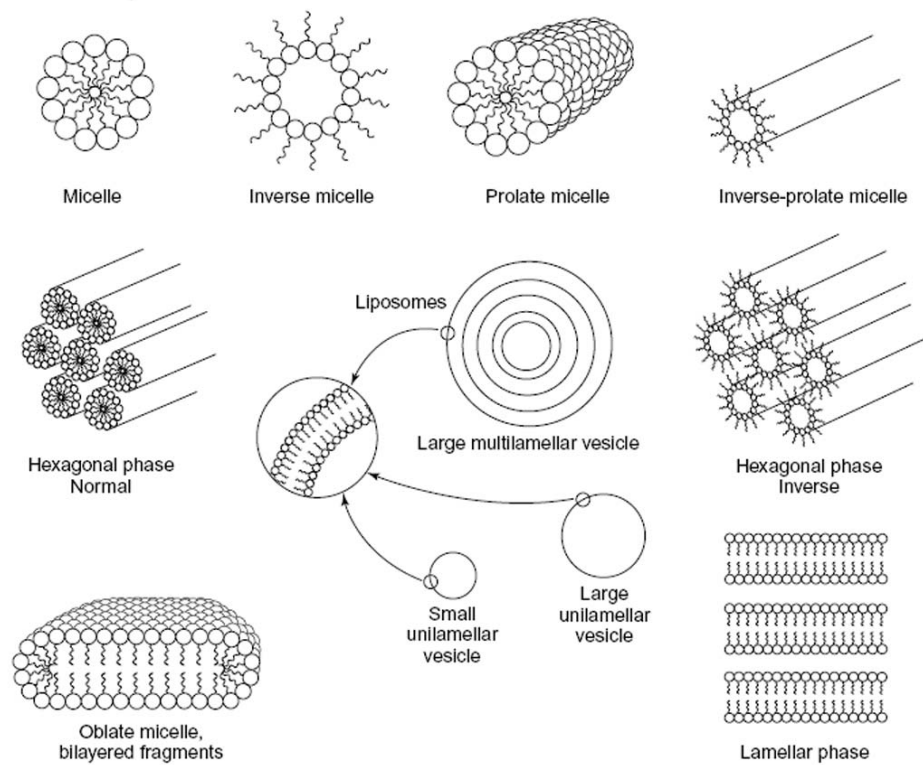


Figura 9 – Tipos de agregação molecular das moléculas lipídicas e tipos de lipossomas (LASIC, 1998)

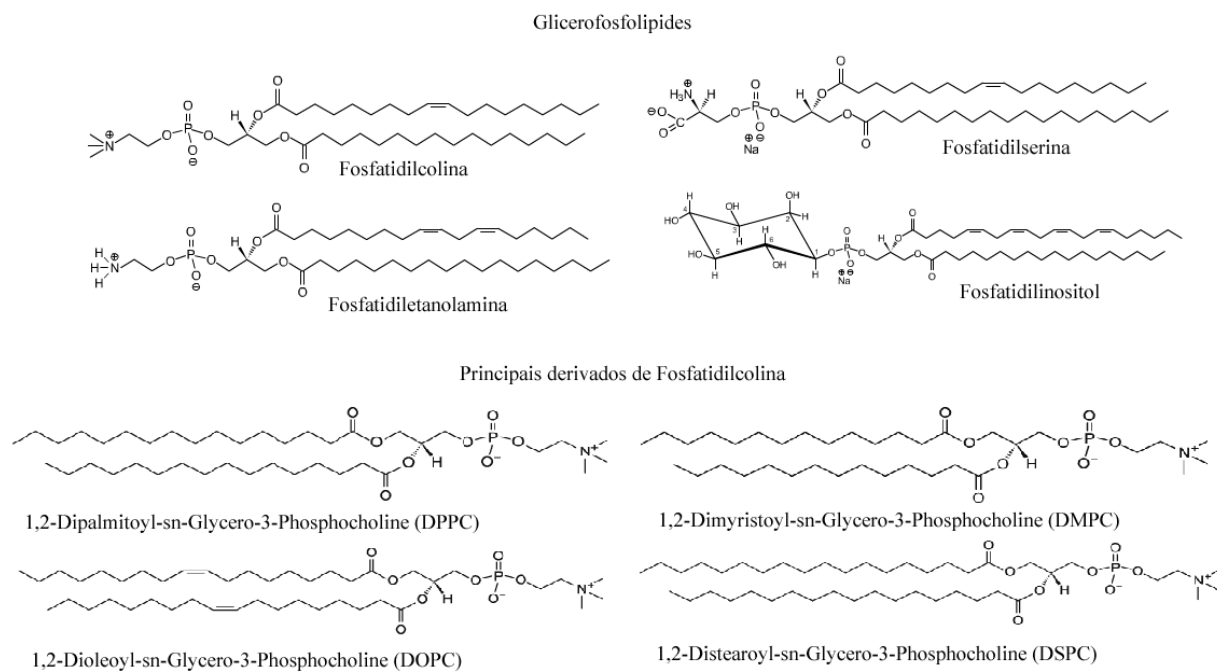


Figura 10 – Fórmula estrutural dos glicerofosfolípides e dos principais derivados de fosfatidilcolina

Os esteróis, como o colesterol, por si só não formam estruturas em bicamadas, entretanto, são componentes importantes das membranas biológicas naturais e a sua incorporação aos lipossomas pode trazer grandes mudanças nas propriedades destas membranas. O colesterol (Figura 11) por ser uma molécula anfifílica, se insere na membrana com seu grupo hidroxila orientado em direção à superfície aquosa e a cadeia alifática alinhada paralelamente às cadeias dos ácidos graxos, no centro da bicamada. A hidroxila do colesterol é posicionada paralelamente aos resíduos carboxílicos dos fosfolípides.

O colesterol pode reduzir ou aumentar a fluidez dos fosfolípides que compõem a bicamada lipídica. No caso dos fosfolípides de baixa temperatura de transição de fase gel/líquida (temperatura na qual a membrana passa de forma gel ou sólida para a fase líquido-cristalina ou fluida, na qual há um livre movimento de moléculas individuais), o colesterol reduz a fluidez da membrana. Já para os fosfolípides de elevada temperatura de transição de fase, na qual não há um livre movimento de moléculas individuais, o colesterol aumenta a fluidez da membrana.

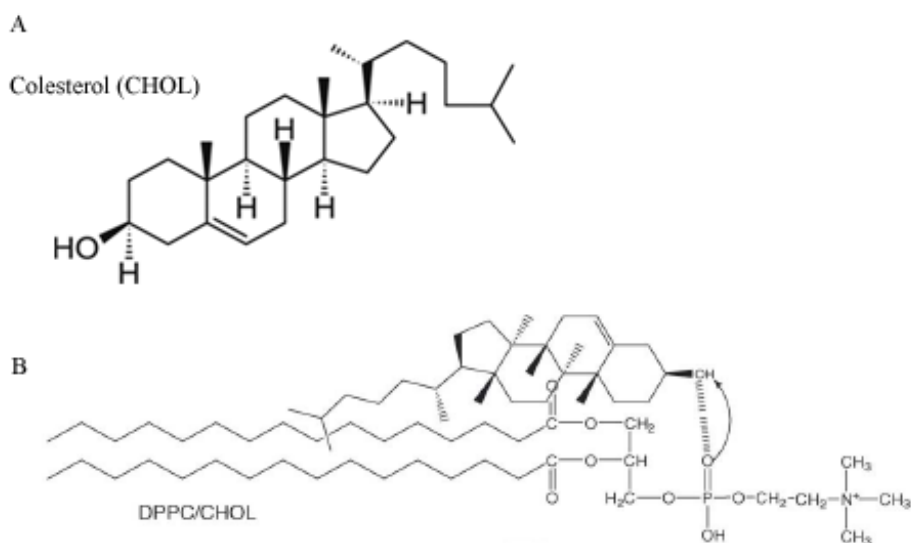


Figura 11 – Fórmula estrutural do colesterol (A) e representação da interação entre o colesterol (Chol) e uma molécula de dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) (DING *et al.*, 2005 – modificado)

### 2.5.1 Caracterização dos lipossomas

A distribuição de tamanho, lamellaridade, teor de encapsulação e estabilidade dos lipossomas podem ser monitoradas por diferentes técnicas de caracterização química e físico-química. O tamanho pode ser medido por vários tipos de

microscopia, tais como microscopia eletrônica de transmissão e microscopia de força atômica; espectroscopia por correlação de fótons e até cromatografia líquida de alta eficiência utilizando o princípio de exclusão por tamanho. O teor de encapsulação pode ser medido após separação do material não encapsulado, destruição da membrana lipídica liberando o material encapsulado e mensuração da quantidade de fármaco encapsulado por diferentes técnicas, tais como cromatografia, absorção molecular, fluorimetria, ELISA, etc. (NEW, 1990).

Outra maneira empregada para caracterizar os lipossomas é a medida de seu potencial zeta, que pode ser definido como o potencial existente na fronteira entre a superfície de uma partícula individual e seus íons associados, no plano de cisalhamento. A carga não pode ser medida diretamente, mas pode-se determinar a grandeza da carga elétrica pelas medidas da mobilidade eletroforética das partículas submetidas à aplicação de um determinado campo elétrico (FLORENCE & ATTWOOD, 2003). O conhecimento do potencial zeta de um lipossoma pode ajudar a prever a estabilidade e o destino de lipossomas *in vivo* (RUOZI *et al.*, 2005).

### 2.5.2 Aplicação tópica

A absorção percutânea de fármacos hidrofílicos através da pele é usualmente baixa e lipossomas representam uma alternativa interessante para contornar este obstáculo.

As substâncias hidrofílicas têm sua penetração cutânea aumentada em muitas vezes a partir de lipossomas multilamelares (HONZAK *et al.*, 2000). Estes autores, utilizando como modelo de substância hidrofílica o GluSL (N-(1-oxil-2,2,6,6-tetrametil-4-piperidinil)-2,3,4,5,6-pentahidroxi-hexanoamida), mostraram que lipossomas compostos de lecitina de soja hidrogenada penetram apenas até o EC onde se desintegram, enquanto aqueles compostos com lecitina de soja não hidrogenada são capazes de carrear fármacos hidrofílicos até camadas mais profundas da pele. Verma e colaboradores (2003) observaram que os lipossomas não só promovem a penetração na pele de uma substância hidrofílica encapsulada (no caso, a carboxifluoresceína), mas também de substância não-encapsulada.

O aumento da penetração cutânea de fármacos encapsulados é criticamente afetado pela composição e características físico-químicas dos lipossomas (KIRJAVAINEN *et al.*, 1999). A propriedade de barreira do EC pode ser modificada



pelos fosfolípidos por meio de sua difusão e mistura com o cimento lipídico e conseqüente modificação do coeficiente de partição, facilitando, assim, a penetração dos fármacos encapsulados. Em outro estudo, a penetração de inulina, uma substância hidrofílica, nas camadas mais profundas do EC foi aumentada em 53% a partir de lipossomas, sendo que a quantidade encontrada nas camadas mais profundas da pele foi aumentada em 300% (du PLESSIS *et al.*, 1994).

Outra vantagem da utilização de lipossomas é a liberação controlada de fármacos no sítio de ação. Kim e colaboradores (1997), por exemplo, observaram que um gel de lipossomas contendo hidrocortisona encapsulada gerou uma concentração mais alta e sustentada de hidrocortisona que uma pomada.

De uma forma geral, vesículas fluídas (“liquid-state”) aumentam a penetração nas camadas mais profundas da pele, enquanto que vesículas rígidas (“gel-state”) promoveram menor taxa de transporte do fármaco através do EC e, conseqüentemente, menor permeação cutânea. No entanto, estas vesículas rígidas proporcionam liberação controlada. O mecanismo exato pelo qual acontece o aumento da penetração dérmica pelos lipossomas não é bem estabelecido, mas a rota transepidérmica é considerada como importante para penetração tanto dos lipossomas quanto das moléculas encapsuladas (BARRY, 2001; BOWSTRA & HONEYWELL-NGUYEN, 2002, HONZAK *et al.*, 2000).

FERREIRA *et al.* (2004) avaliaram a permeação da PA a partir de lipossomas LUV através da pele intacta e sem EC. Na pele intacta, a permeação cutânea da PA a partir dos lipossomas LUV foi maior do que aquela observada a partir de uma solução do fármaco. Na pele sem EC, os lipossomas proporcionaram liberação controlada. No entanto, estes estudos foram conduzidos com a pele de camundongos glabros, um modelo limitado para simular a pele humana. Assim, este trabalho tem por objetivo avaliar a influência de alguns parâmetros, como o tipo de lípide e a fluidez sobre a taxa de encapsulação e estabilidade da PA. Os estudos de permeação cutânea *in vitro* serão conduzidos com a pele da orelha de porco, um modelo relevante para a pele humana.

### 3 OBJETIVOS

#### OBJETIVO GERAL

Desenvolver lipossomas contendo PA para tratamento tópico de LC e avaliar sua permeação e penetração cutânea *in vitro*.

#### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparação da curva-padrão para a avaliação da concentração de PA por ensaio microbiológico;
- Desenvolvimento e caracterização química e físico-química das formulações lipossomais:
  - . avaliação do teor de encapsulação da PA em função da composição dos fosfolipídios usados;
  - . determinação do diâmetro e potencial zeta dos lipossomas.
- Avaliação da estabilidade das preparações lipossomais de PA;
- Validação do procedimento de remoção do EC por meio das medidas da perda de água transepidérmica e de análises histológicas;
- Validação do procedimento de remoção da epiderme por meio das análises histológicas;
- Avaliar a permeação e penetração cutânea *in vitro* da PA a partir dos lipossomas através da pele da orelha de porco (intacta, sem EC e sem epiderme), considerando a influência da fluidez das vesículas na permeação e penetração cutânea.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Material

O sulfato de paromomicina, potência 757 mg/g, foi obtido da Antibióticos (Milão, Itália). O padrão usado foi o sulfato de paromomicina, potência 730 mg/g (Padrão USP). Os lípides foram os seguintes: fosfatidilcolina (PC, pureza > 98%, ácidos graxos livres < 0,1%; Lipoid, Alemanha), colesterol (Chol, pureza ~ 95%; Sigma-Aldrich, Alemanha) e dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC, pureza > 99%, ácidos graxos livres < 0,3%; Lipoid, Alemanha); o antioxidante foi o butilhidroxitolueno (BHT, Volp, Brasil). Todos os demais reagentes e solventes foram de grau analítico.

O microrganismo padrão foi o *Bacillus subtilis* ATCC 6633. Os meios de cultura usados foram: meio antibiótico n° 1 (DIFCO, França) e meio antibiótico n° 5 (DIFCO, França).

#### Soluções

##### Tampão Fosfato Salina (PBS) pH 7,4

Dissolveram-se 0,795 g de fosfato dibásico de sódio heptahidratado ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), 0,144 g de fosfato monobásico de potássio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) e 9,0 g de cloreto de sódio em 500 mL de água destilada. Esta solução foi transferida para balão volumétrico de 1000 mL e o volume completado com água destilada. Ajustou-se o pH para 7,4 com ácido clorídrico (HCl) 1 mol/L ou hidróxido de sódio (NaOH) 1 mol/L conforme a necessidade.

##### Tampão Fosfato pH 8,0

Dissolveram-se 16,73 g de fosfato dibásico de potássio ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ), 0,523 g de fosfato monobásico de potássio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) em 500 mL de água destilada. Esta solução foi transferida para balão volumétrico de 1000 mL e o volume completado com água destilada. Ajustou-se o pH para 7,4 com HCl 1 mol/L ou NaOH 1 mol/L conforme a necessidade.

### Tampão HEPES (N-2-hidroxietilpiperazina)

Foram dissolvidos 2,38 g de HEPES (Vetec, Brasil), 8,48g de NaCl, 1,46 g de ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) em água destilada. A preparação foi transferida para um balão volumétrico de 1000 mL e o volume completado com água destilada. Ajustou-se o pH para 7,4 com HCl 1 mol/L ou NaOH 1 mol/L conforme a necessidade.

### Soluções-estoque de lípidos

Soluções concentradas dos fosfolípidos foram preparadas, a saber: uma solução de PC na concentração de 50 mmol/L (50 mM), uma de DPPC na concentração de 50 mmol/L (50 mM) e outra de Chol na concentração de 20 mmol/L (20 mM) conforme descrito abaixo.

1. Pesaram-se exatamente 393 mg de PC (MM = 786), adicionou-se BHT a 0,01% em relação à massa total de lípidos e dissolveu-se a mistura em 10 mL de clorofórmio PA. Após completa solubilização, colocou-se a solução em um tubo de vidro de borossilicato com tampa, em atmosfera inerte contendo nitrogênio.
  2. Pesaram-se exatamente 376 mg de DPPC (MM = 752), adicionou-se BHT a 0,01% em relação à massa total de lípidos e dissolveu-se a mistura em 10 mL completa solubilização, colocou-se a solução em um tubo de vidro de borossilicato com tampa, em atmosfera inerte contendo nitrogênio.
  3. Pesaram-se exatamente 77,4 mg de Chol (MM = 387), adicionou-se BHT a 0,01% em relação à massa total de lípidos e dissolveu-se a mistura em 10 mL de clorofórmio PA. Após completa solubilização, colocou-se a solução em um tubo de vidro de borossilicato com tampa, em atmosfera inerte contendo nitrogênio.
- Estas soluções foram estocadas em freezer a - 40° C até o momento de sua utilização.

Todos os materiais e soluções utilizadas em ensaio microbiológico foram previamente esterilizados em autoclave vertical 415 (Fanem, Brasil) a 121°C durante 15 minutos.

## MÉTODOS

### 4.2 Obtenção das preparações

#### 4.2.1 Preparo dos lipossomas pelo método da Evaporação em Fase Reversa (REV)

##### A - Lipossomas de PC e DPPC

Foram adicionados 1,0 mL da solução estoque de PC ou DPPC (50 mmol/L) a um balão de fundo redondo contendo 2 mL de clorofórmio. Em seguida, o balão foi conectado a um evaporador rotatório R-215 (Buchi, Suíça), sendo o solvente orgânico removido sob pressão reduzida a fim de se obter um filme seco de fosfolípidios na parede do balão. No preparo dos lipossomas contendo PC, foi utilizada uma temperatura de 30°C e uma pressão reduzida (vácuo) igual a 131 mbar e, no caso dos lipossomas contendo DPPC, foi utilizado aquecimento à 45°C e uma pressão reduzida igual a 258 mbar.

O filme foi dissolvido em 3 mL de éter etílico livre de peróxidos. A remoção dos peróxidos, responsáveis pela oxidação dos lípidos, foi feita previamente por meio da agitação do éter com tampão HEPES pH 7,4 na proporção 1/3. Em seguida, 1 mL de solução aquosa de PA a 10 mg/mL foi adicionada à solução de fosfolípidios em éter etílico juntamente com algumas pérolas de vidro. Esta mistura foi submetida a banho de ultra-som por 5 minutos para se preparar uma emulsão água/fase orgânica (A/O). A emulsão resultante foi colocada em um evaporador rotatório para retirada da fase orgânica com conseqüente formação de uma dispersão de lipossomas. Durante esta etapa, utilizou-se temperatura de 30°C e pressão reduzida de 367 mbar para os lipossomas contendo PC e, para aqueles contendo DPPC, foi utilizada temperatura de 45°C e pressão reduzida de 689 mbar. No ponto da formação do “gel”, o balão foi retirado do rotavapor e foi agitado em vórtex por 10 segundos. Em seguida, o balão foi novamente conectado ao rotavapor, sob as mesmas condições, até completa evaporação do éter etílico.

Em seguida, os lipossomas foram calibrados por tripla passagem em um extrusor T 001 (Lipex Biomembranes, Canadá) contendo membrana de policarbonato (600 nm). No caso de lipossomas contendo DPPC, a extrusão foi

conduzida a 45°C. Após a extrusão, a preparação foi centrifugada a 20.000 g em microcentrífuga Espresso (Jouan, França) por 30 minutos para a remoção da fração não encapsulada da PA. O precipitado foi coletado e o sobrenadante, desprezado. A preparação foi dispersa em 0,9 mL de solução aquosa de NaCl 50 mM e resfriado a 4°C. As preparações lipossomais de PA foram conservadas sob refrigeração.

#### B - Lipossomas de PC/Chol e DPPC/Chol

Foram adicionados 0,6 mL da solução estoque de PC ou DPPC (30 mmol/L) e 1,0 mL da solução estoque de Chol (20 mmol/L) a um balão de fundo redondo contendo 2 mL de clorofórmio. Em seguida, o balão foi conectado ao evaporador rotatório e procedeu-se da mesma forma como descrito em A.

### 4.3 Caracterização química e físico-química dos lipossomas

#### 4.3.1 Determinação do teor de encapsulação

Depois de realizada a centrifugação e a remoção do material não-encapsulado (conforme descrito em 4.2.1), foram transferidos 100 µL da suspensão de lipossomas para um vidro de penicilina de 10 mL e adicionou-se 1 mL de álcool isopropílico para solubilização dos lipossomas, seguido de agitação em vórtex. Em seguida, a preparação foi transferida quantitativamente para um balão volumétrico de 100 mL e o volume foi completado com tampão fosfato pH 8,0. A concentração de PA nesta solução foi determinada por ensaio microbiológico, conforme descrito em 4.4. O cálculo do teor foi realizado a partir da relação entre as massas de PA encapsulada e de PA na solução de hidratação, levando em consideração o volume de lipossoma produzido.

#### 4.3.2 Determinação do diâmetro das vesículas

O diâmetro das vesículas foi determinado pelo método da espectroscopia de correlação do fóton (PCS), utilizando-se o Zetasizer 3000 MHS (Malvern, Inglaterra). Para a realização das medidas, os lipossomas foram diluídos cerca de 100 vezes em

uma solução de NaCl 50 mM. As medidas foram efetuadas a temperatura de 25°C e em ângulo de 90°. Os resultados são apresentados como a média de dez medidas.

#### 4.3.3 Determinação do potencial zeta das vesículas

O potencial zeta foi determinado pela análise da mobilidade eletroforética das vesículas e do espalhamento dinâmico de luz das vesículas. As medidas foram feitas em triplicata em alíquotas diluídas cerca de 250 vezes, empregando-se o Zetasizer 3000 HSA (Malvern, Inglaterra), na temperatura de 25°C, a um ângulo de 90°. Com a medida do potencial zeta pode-se estimar a estabilidade das dispersões coloidais. Em geral, a agregação de partículas eletricamente carregadas é menos provável que as não carregadas devido à repulsão eletrostática.

#### 4.4 Ensaio microbiológico

O método utilizado para o doseamento da PA é o ensaio de difusão em ágar, baseado na Farmacopéia Americana – USP 24 (THE UNITED..., 2000) e modificado por Ferreira *et al.* (2004).

Para a obtenção da curva-padrão, pesaram-se 34,3 mg de sulfato de PA (Padrão USP) equivalente a 25 mg de PA base (balança analítica BP221S – Sartorius, Alemanha), previamente dessecado em estufa a vácuo retilínea (FANEM, Brasil) a 60°C durante 3 horas. Transferiu-se quantitativamente para um balão volumétrico de 25 mL e completou-se o volume com tampão fosfato pH 8,0. Obteve-se assim, uma solução estoque da PA a 1000 µg/mL, que pôde ser mantida em um refrigerador durante um período de 21 dias (THE UNITED..., 2006).

Transferiu-se 1 mL da solução estoque para um balão volumétrico de 100 mL e completou-se o volume com tampão fosfato pH 8,0, obtendo-se uma solução de PA de 10 µg/mL, denominada P10. Alíquotas de 0,5; 1; 2; 4 e 8 mL desta solução foram transferidas para balões volumétricos de 25 mL. Completou-se o volume com tampão fosfato pH 8,0 e foram obtidas concentrações de 0,2; 0,4; 0,8; 1,6 e 3,2 µg/mL de PA base, denominadas respectivamente P1, P2, P3, P4 e P5.

Para a execução do ensaio, o *B. subtilis* (ATCC 6633) foi repicado na superfície inclinada do meio antibiótico n° 1 e incubado a 36 ± 0,5°C em estufa para cultura microbiológica (Forma Scientific Inc., USA). Após 24 horas de incubação,

parte da cultura foi transferida para um tubo de ensaio estéril contendo 10 mL de salina, Tween 80 (0,2% p/v) e pérolas de vidro. Procedeu-se a agitação em agitador de tubos do tipo vórtex (Phoenix AP56, Brasil) para completa homogeneização das células. Uma suspensão estoque de microrganismo foi obtida em espectrofotômetro (Jenway 6400, Inglaterra) com  $7,0 \pm 1,0\%$  de transmitância a 580 nm, equivalendo a  $3,4 \times 10^7$  UFC/mL. Esta suspensão padronizada foi diluída 10 vezes em salina e incorporada a 0,05 % (v/v) no meio para antibióticos n° 5, fundido e mantido a 48 - 50°C em banho-maria (Lauda E100, Alemanha) acoplado a agitador magnético (IKA, Labortechnik, Alemanha).

Alíquotas de 10 mL de meio para antibióticos n° 5 inoculado foram distribuídas em placas de Petri estéreis. Após a solidificação do meio, seis cilindros de aço inoxidável, estéreis (10 mm de altura, 8 mm de diâmetro externo e 6 mm de diâmetro interno) foram colocados em cada placa, com o auxílio de uma pinça metálica estéril. Em cada cilindro, adicionou-se 200 µL da solução de antibiótico, utilizando pipeta automática (Gilson, França). Foram preparadas placas em triplicata para cada concentração (0,2; 0,4; 1,6 e 3,2 µg/mL de PA), sendo que a concentração de 0,8 µg/mL (P3) denominada de referência, foi colocada em todas as placas de maneira alternada em três dos seis cilindros.

As placas permaneceram à temperatura ambiente durante uma hora, para permitir a difusão do antibiótico no ágar, antes de iniciar o crescimento do microrganismo-teste. Após esse período, foram colocadas na estufa à temperatura de  $36 \pm 0,5$  °C (Forma Scientific Inc., USA) por um período de 18 horas. A leitura do diâmetro dos halos de inibição (Figura 12) foi realizada utilizando paquímetro digital (Mitutoyo, Brasil). Os experimentos foram executados em dois dias distintos para a obtenção de duas curvas.

Cada curva padrão foi traçada com os valores dos diâmetros dos halos de inibição na abscissa e o logaritmo das concentrações de PA na ordenada. A equação da reta foi calculada pelo método dos mínimos quadrados. A análise estatística foi feita utilizando análise de variância da regressão para  $p \leq 0,05$ .



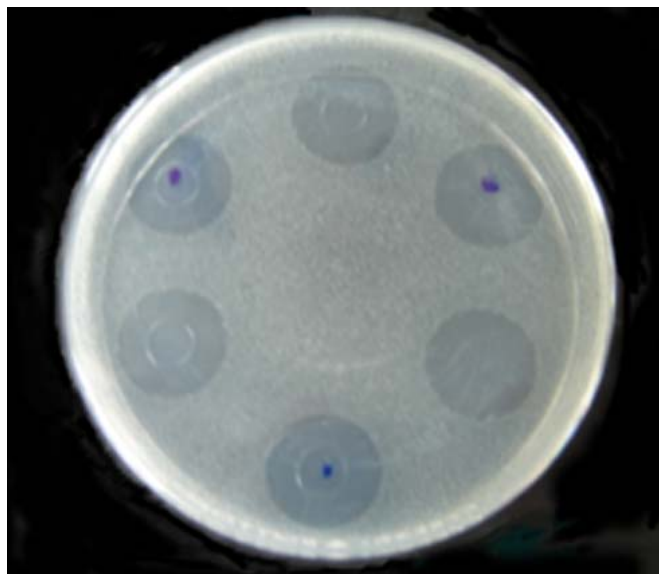


Figura 12 – Placa de Petri apresentando os halos de inibição referentes à concentração de 0,8  $\mu\text{g/mL}$

Para cálculo da concentração de PA, a média dos diâmetros dos halos de inibição obtidos para P3 em cada ensaio foi subtraída do valor do diâmetro do halo de inibição correspondente a essa concentração na curva-padrão, originando um fator de correção. A medida dos diâmetros dos halos de inibição de cada amostra foi corrigida de acordo com esse fator. As concentrações foram calculadas por interpolação na curva.

Para verificar se as duas curvas poderiam ser reunidas em uma única curva padrão, a ser utilizada para as interpolações em experimentos posteriores, foi realizada uma análise estatística, que incluiu: o teste de significância da regressão de ambas as curvas e a comparação estatística entre elas. Após a comprovação estatística da possibilidade de se traçar uma única curva-padrão, foi realizada uma análise estatística da curva-padrão, que inclui o teste de significância da regressão, do intercepto e da inclinação da reta.

#### **4.5 Permeação e penetração cutânea *in vitro***

Os estudos de permeação e penetração cutânea *in vitro* de PA foram realizados em células de difusão de Franz (CDF) modificadas constituídas por um compartimento doador, um compartimento receptor com volume de  $6,7\text{cm}^3$  e área de superfície da membrana de  $1,77\text{cm}^2$ . Para este estudo foram utilizadas peles de orelha de porco, com 3 a 6 meses, sacrificados em abatedouro.

#### 4.5.1 Preparação da pele

Após a excisão das orelhas dos animais, essas foram submetidas à limpeza sob água corrente. A região externa das orelhas foi depilada com o auxílio de um tricotomizador elétrico 9603 (3M, EUA) e a pele removida cuidadosamente da cartilagem com o auxílio de um bisturi. Em seguida, o tecido adiposo subcutâneo foi removido também com o auxílio de um bisturi e as peles foram inspecionadas visualmente para detecção de possíveis danos.

Os fragmentos da pele foram acondicionados em papel filme e colocados em sacos plásticos de polietileno hermeticamente fechados e estocados a  $-18^{\circ}\text{C}$  por no máximo 4 semanas. Os fragmentos foram transferidos para  $4^{\circ}\text{C}$ , 12 horas antes dos experimentos e, duas horas antes de serem montados nas células de difusão de Franz, foram mantidos à temperatura ambiente.

##### 4.5.1.1 Retirada da epiderme

A retirada da epiderme dos fragmentos de pele foi realizada imediatamente antes da montagem das células, no dia do experimento. Os fragmentos de pele foram imersos em água a  $60^{\circ}\text{C}$  durante 1 minuto. Em seguida, os fragmentos foram colocados em um suporte e fixados com agulhas. A epiderme foi cuidadosamente retirada com o auxílio de uma lâmina de bisturi, simulando uma raspagem. A remoção total da epiderme foi confirmada por meio de análises histológicas.

##### 4.5.1.2 Retirada do estrato córneo

O EC foi removido, no dia do experimento, por meio de desgaste realizado com fita adesiva Scotch 845 Book Tape 2" x 540 (3M, EUA). Esta fita foi aderida ao lado epidérmico do fragmento de pele, com o auxílio de um cilindro que realiza uma pressão de  $140\text{ g/cm}^2$ , sendo posteriormente retirada (*tape stripping*). O *stripping* foi realizado por 30 vezes para a remoção completa do EC. A remoção completa do EC foi confirmada por meio de análises histológicas e medidas da perda de água transepidérmica (PAT) (itens 4.6 e 4.7).

#### 4.5.2 Montagem das células de Franz

Os fragmentos de pele (intacta, sem EC ou sem epiderme), após atingirem a temperatura ambiente, foram hidratados em tampão fosfato salina (PBS), pH 7,4 e colocados horizontalmente na CDF, dividindo-a em compartimentos doador e receptor. O compartimento receptor foi preenchido e mantido por 1 hora com tampão fosfato salina (PBS), pH 7,4 contendo 0,01% de cloreto de mercúrio como conservante. Após este período, o compartimento receptor foi lavado 3 vezes com tampão fosfato salina (PBS), pH 7,4 sem conservante, a fim de evitar a interferência no método analítico de doseamento da PA. Este procedimento de limpeza foi validado previamente por GOMES *et al.* (1998). Durante o experimento, a temperatura da pele foi mantida a 32°C por meio de um sistema de circulação de água a 37°C e agitação magnética.

#### 4.5.3 Aplicação das preparações

Os experimentos foram conduzidos em dose finita, a qual imita as condições normais de aplicação. Nesses experimentos, o compartimento doador foi mantido aberto, permitindo a evaporação da fase aquosa volátil das preparações simulando as condições normais de aplicação de formulações tópicas.

Amostras de 100 µL das preparações foram aplicadas sobre as peles com pipetador automático (Gilson, França) e, após a aplicação das formulações, um cotonete de vidro foi usado para homogeneizar a distribuição das formulações sobre a pele.

#### 4.5.4 Determinação da difusão

As amostras foram coletadas em intervalos de 2, 4, 6 e 8 horas para os experimentos sem EC e sem epiderme, por meio da remoção total do fluido receptor e preenchimento com nova solução. Nos experimentos utilizando pele intacta, uma vez que permeação da PA foi desprezível, as amostras foram coletadas somente após 8 horas. Em seguida, procedeu-se a extração da PA que penetrou na pele de acordo com procedimento previamente validado por FERREIRA *et al.* (2004) e que

se encontra descrito em 4.5.4.1 e 4.5.4.2. A concentração de PA no líquido receptor foi determinada por ensaio microbiológico.

#### **4.5.4.1 Remoção da PA não absorvida**

Em experimento com pele intacta, a quantidade de PA não absorvida, a qual permaneceu na superfície da pele e não penetrou no tecido cutâneo após 8 horas, foi removida utilizando-se 0,5 mL de uma solução aquosa a 1% de um tensoativo não iônico (éter oléico de polioxietileno 20 – Volpo 20), seguido da aplicação de 0,5 mL de água destilada. Esse procedimento foi repetido por mais duas vezes. O chapéu da célula de difusão de Franz foi retirado e o excesso da formulação da pele foi removido com o auxílio de um cotonete umedecido na solução aquosa do tensoativo. Por último, um cotonete seco foi utilizado para remover o excesso da umidade.

#### **4.5.4.2 Extração da PA na pele**

Após a limpeza, descrita em 4.5.4.1, os fragmentos de pele foram removidos da célula, recortados na região demarcada pelo chapéu com o auxílio de um bisturi e acondicionados em frascos de penicilina a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 12 horas. Após este período, os fragmentos foram gradualmente descongelados e 4 mL de tampão fosfato pH 8,0 foram adicionados em cada um dos frascos. Após 2 horas de contato, os frascos foram submetidos ao vórtex (IKA Laubotechnik, Alemanha) por 5 minutos. O sobrenadante foi filtrado por meio da passagem por uma membrana de  $1,2\ \mu\text{m}$  e submetido ao doseamento microbiológico. Esse procedimento de extração da PA na pele foi validado, conforme item 4.5.4.2.1.

##### **4.5.4.2.1 Validação da extração da PA da pele**

Para a validação da extração da PA da pele, foram preparadas soluções de PA com concentrações equivalentes a 0,1 e 1,0 mg/mL utilizando tampão fosfato pH 8,0 como diluente. Foram montadas duas células de Franz utilizando pele intacta, conforme descrito em 4.5.2. Em cada célula foram aplicados 50  $\mu\text{L}$  de cada solução. Após aproximadamente 3 horas (tempo necessário para que a solução evapore), os

fragmentos de pele foram removidos da célula, recortados na região demarcada pelo chapéu com o auxílio de um bisturi e acondicionados em frascos de penicilina a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 12 horas. Em seguida, procedeu-se conforme descrito em 4.5.4.2. A recuperação foi satisfatória e ela representou  $107 \pm 10\%$  ( $n=3$ ) da dose aplicada.

#### 4.5.5 Análise estatística

A comparação entre as médias dos valores dos experimentos de permeação cutânea foi realizada pela análise de variância (ANOVA). As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas ao nível  $p < 0,05$ .

#### 4.6 Análise histológica

Foram retiradas amostras de 8 mm de diâmetro de fragmentos de pele intacta, sem epiderme e com 30 *strippings*. As amostras foram fixadas em formalina neutra tamponada a 10% por 48 horas a temperatura ambiente. Após a desidratação em séries crescentes de álcool (etanol 70 %, 80 %, 90 %, absoluto), as peças foram diafanizadas em banhos de xilol e incluídas em parafina. Seções de 6  $\mu\text{m}$  foram coradas com hematoxilina e eosina. A avaliação histológica e a documentação fotográfica foram realizadas em microscópio ótico BX-41 (Olympus, Alemanha) acoplado a equipamento para microfotografia.

#### 4.7 Determinação de perda de água transepidérmica

A perda de água transepidérmica (PAT) é a difusão da água através da pele desde as camadas mais profundas até a superfície. A PAT é um parâmetro importante para avaliar a eficiência da função barreira da pele, sendo que valores baixos correspondem a uma pele com barreira eficiente, enquanto que valores altos indicam comprometimento da função barreira (LEVIN & MAIBACH, 2005). As medidas foram realizadas com o auxílio do aparelho Tewameter/Corneometer TC 350 (Courage-Khazaka, Alemanha).

As peles foram obtidas no dia do experimento e utilizadas após poucas horas da morte dos animais. Foi realizado o procedimento de preparo das peles, como descrito anteriormente. Todas as manipulações e medidas subseqüentes foram

---

realizadas em condições ambientais controladas: temperatura ( $23 \pm 2^\circ\text{C}$ ) e umidade relativa ( $50 \pm 5\%$ ).

Um fragmento de pele, com dimensões de aproximadamente 60 x 108 mm, foi cortado e fixado com agulhas numa placa de cortiça revestida com papel alumínio. Em seguida, foi marcado o centro de cada uma das três regiões a serem medidas para que fosse possível direcionar a posição do eletrodo do equipamento.

As medidas foram realizadas em função do número de *strippings* a fim de investigar a influência da remoção do EC sobre a PAT. Foram realizadas três medidas em cada uma das três regiões distintas do fragmento nos seguintes intervalos: 0, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 *strippings*. Em cada medida, o eletrodo foi posicionado levemente sobre a pele durante 2 minutos antes de iniciar as leituras para equilíbrio com a umidade local. Cada medida foi feita durante 30 segundos e o valor obtido corresponde a uma média de 15 leituras realizadas neste intervalo de tempo.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Obtenção da curva-padrão

Na figura 13 estão apresentadas as duas curvas-padrão de PA, com as respectivas equações da reta e coeficientes de determinação ( $r^2$ ), obtidas em dias diferentes.

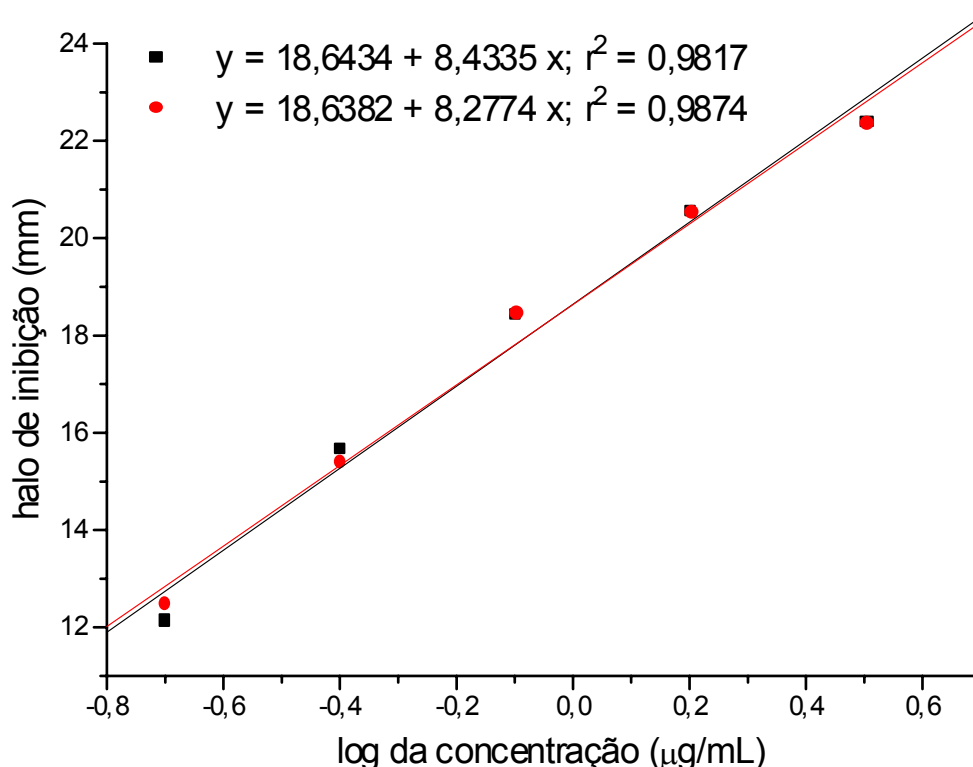


Figura 13 – Representação gráfica de duas curvas padrão de PA, obtidas por doseamento microbiológico, em dias diferentes.

A análise de regressão para cada curva revelou linearidade adequada dentro da faixa de concentração trabalhada, concluindo-se que a regressão é estatisticamente significativa ( $P < 0,05$ ).

Para que se pudesse traçar uma curva comum, foi necessário comprovar que as duas curvas não diferiam estatisticamente entre si. Para isso, foi formulada hipótese nula de que tanto os valores de  $a$  (coeficiente linear), quanto aqueles de  $b$  (inclinação), não diferiam estatisticamente. A hipótese nula foi aceita e concluiu-se que as curvas não são estatisticamente diferentes.

Desta forma, traçou-se uma curva comum (Figura 14) a partir da média dos pontos das duas curvas. A análise de regressão da curva revelou linearidade adequada dentro da faixa de concentração trabalhada.

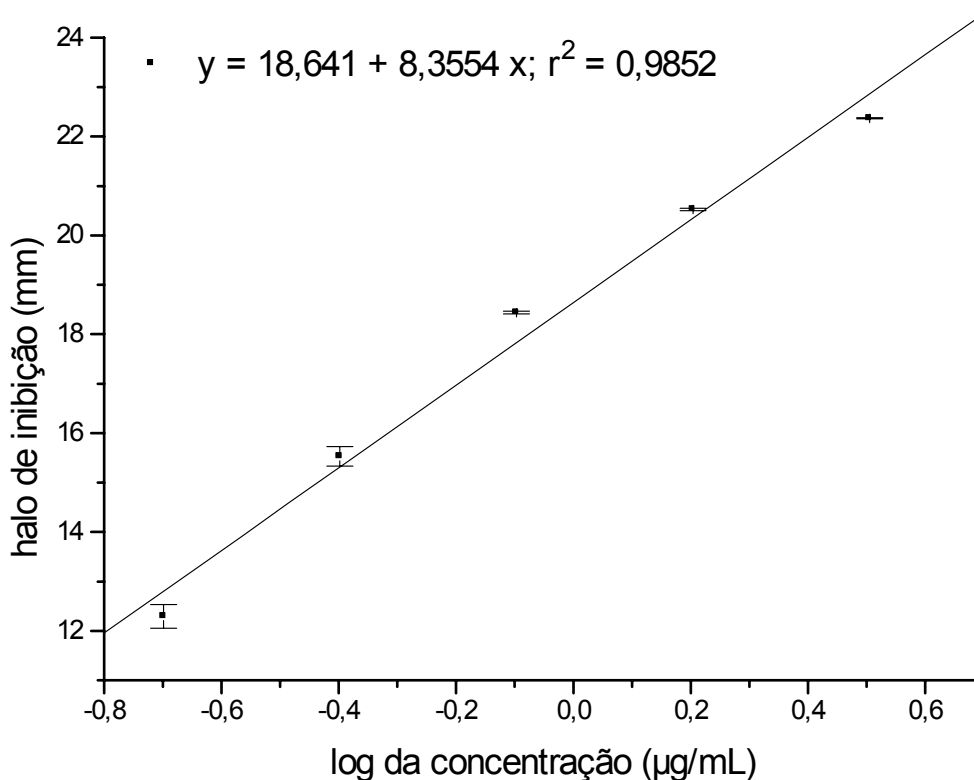


Figura 14 – Representação gráfica da curva-padrão de PA (média  $\pm$  dp), obtida por ensaio microbiológico, na faixa de 0,2 a 3,2  $\mu\text{g/mL}$

## 5.2 Caracterização química e físico-química dos lipossomas

Na Tabela 1 estão descritos os resultados obtidos para a encapsulação da PA nos lipossomas LUV preparados pelo método REV, com composição lipídica de PC, PC/Chol (60/40), DPPC e DPPC/Chol (60/40) contendo ou não a PA. Os lipossomas que não contêm PA são denominados “brancos”. Adicionalmente, estão descritos os dados obtidos na caracterização destes lipossomas quanto ao potencial zeta, diâmetro das vesículas e o índice de polidispersão.

Tabela 1 – Caracterização das formulações lipossomais quanto ao teor de encapsulação, diâmetro e índice de polidispersão (IP).



Lipossomas	Lipossomas branco		Lipossomas com PA		
	Diâmetro* (nm) (IP)	Potencial Zeta (mV)	Diâmetro ** (nm) (IP)	Potencial Zeta (mV)	Teor Encapsulação (%)
PC	269±88 (0,4±0,1)	-25,6±0,1	516±57 (0,7±0,0)	-3,8±0,1	13,3±1,9
PC/Chol	382±1 (0,5±0,0)	-32,8±0,4	362±32 (0,4±0,1)	-6,0±0,2	10,5±1,8
DPPC	301±29 (0,4±0,1)	-10,3±0,2	1367±83 (1±0)	0,2±0,1	13,1±5,4
DPPC/Chol	537±11 (0,1±0,1)	-27,6±0,2	531±20 (0,8±0,1)	-3,5±0,1	12,6±4,4

\* Os valores expressos correspondem à média (n=2) ± dp (desvio padrão)

\*\*Os valores expressos correspondem à média (n=3) ± dp (desvio padrão)

O teor de encapsulação da PA foi de 13,3 e 13,1% para os lipossomas PC e DPPC, respectivamente. A encapsulação da PA para os lipossomas contendo colesterol foi menor do que aquela observada para as formulações sem este lípide, no entanto, as diferenças não foram significativas ( $P > 0,05$ ). O teor de encapsulação foi de 10,5 e 12,6% para os lipossomas PC/Chol e DPPC/Chol, respectivamente. É interessante observar que a variabilidade, expressa pelo desvio padrão, foi muito menor para os lipossomas “fluidos” (PC e PC/Chol) em comparação com aqueles “rígidos” (DPPC e DPPC/Chol) (Tabela 1). O desvio padrão relativo (DPR) foi de aproximadamente 15% e 40% para os lipossomas fluidos e rígidos, respectivamente.

O teor de encapsulação da PA observado por FERREIRA *et al.* (2004) para lipossomas LUV compostos de PC e PC/Chol foi maior do que o obtido no presente trabalho (24,2% para PC e 16% para PC/Chol). Isto pode ser explicado pelo fato de que a concentração de PA na solução de hidratação do filme de lípides foi maior naquele estudo e as vesículas não foram calibradas. Ao se promover, na extrusão, a passagem das vesículas por membranas de policarbonato, parte do material encapsulado pode ser perdido no processo, o que se traduz em menor teor de encapsulação.

A incorporação da PA nos lipossomas fluidos e rígidos compostos por PC e DPPC, respectivamente, conduziu ao aumento do diâmetro das vesículas e da heterogeneidade ( $IP \geq 0,7$ ) da distribuição do tamanho (Tabela 1). No entanto, não foi observada alteração do diâmetro das vesículas, nas quais o colesterol estava presente na composição da bicamada lipídica ( $P > 0,05$ ).

Por outro lado, o potencial zeta dos lipossomas brancos formados por PC e DPPC é negativo, o que pode ser explicado pela presença de ácidos graxos livres na composição das matérias-primas de PC e DPPC. Convém destacar que a adição de Chol nas composições dos lipossomas conduz a um aumento dos valores absolutos desses respectivos valores de potencial zeta, tornando-se, portanto mais negativos. Isto pode também ser justificado pela presença de resíduos de ácidos graxos livres na constituição do colesterol. Entretanto, a incorporação de PA em todas as formulações de lipossomas investigadas resultou na redução dos valores absolutos do potencial zeta. Isto sugere a ocorrência de interação entre a PA e a monocamada externa das vesículas.

Sabe-se que a PA apresenta cinco grupamentos amino ( $pK_{a1} = 6,50$ ;  $pK_{a2} = 7,91$ ;  $pK_{a3} = 8,07$ ;  $pK_{a4} = 8,20$ ;  $pK_{a5} = 9,13$ , determinados a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) (BARBIERI, 2006). Assim sendo, quatro grupos aminos estarão protonados no pH da preparação lipossomal (pH 7,0), o que pode levar ao surgimento de interações eletrostáticas com os grupamentos carboxílicos dos componentes de ácidos graxos livres presentes na monocamada lipídica, reduzindo a carga superficial negativa das vesículas.

Outra evidência que sugere a existência de interação entre a PA e a membrana lipossomal é a dificuldade observada na redução do diâmetro das vesículas constituídas unicamente por fosfolípides (PC e DPPC). Pode-se supor que a interação entre a PA e a PC ou DPPC torna a bicamada lipídica mais rígida, com conseqüente dificuldade na diminuição do diâmetro das vesículas. A incorporação de colesterol e PA em ambas formulações parece contribuir com uma maior fluidez na membrana, o que justificaria a obtenção de vesículas de menor diâmetro. No entanto, estudos de caracterização físico-química (calorimetria exploratória diferencial e difração de raios X) são requeridos para a confirmação dessas hipóteses.

Considerando que o objetivo inicial deste trabalho foi de avaliar a influência da fluidez na permeação e penetração cutânea e devido à heterogeneidade do

lipossoma DPPC, os estudos posteriores de estabilidade, permeação e penetração cutânea foram conduzidos somente com os lipossomas PC e PC/Chol, representativos de uma composição lipídica fluida e rígida, respectivamente.

### 5.3 Estudo de estabilidade dos lipossomas

A fim de investigar a estabilidade das formulações, um determinado volume dos lipossomas foi preparado, acondicionado em frascos âmbar sob ambiente de nitrogênio gasoso (N<sub>2</sub>) e conservado sob refrigeração a 4°C. Os lipossomas foram preparados contendo os seguintes antioxidantes: BHT a 0,01%, adicionado na fase orgânica, bissulfito de sódio a 0,1 % e EDTA a 0,01 %, ambos na solução aquosa de PA. Em intervalos regulares (0, 10, 20 e 30 dias), uma alíquota foi retirada e teor de PA total e encapsulada foi avaliado.

O teor de PA total é a quantidade de PA presente no meio, independente se dentro ou fora do lipossoma e sua análise durante os 30 dias indica a influência dos componentes do meio na estabilidade ou na degradação da PA. O teor de PA encapsulada é a quantidade de PA presente no interior da vesícula, ou seja, a quantidade de PA dosada uma vez que se tenha removido o material não-encapsulado e pode ser um indicador da estabilidade das vesículas e possível liberação de material encapsulado.

A Figura 15 mostra a estabilidade da PA (teor total) em função do tempo para as diferentes formulações lipossomais. Os valores expressos correspondem à média (n=3) ± desvio padrão. A concentração de PA se mantém estável em função do tempo, exceto para o lipossoma constituído por PC, onde se observou uma diminuição da concentração de PA para  $80 \pm 0,1$  % do valor inicial. Na formulação de PC/Chol, os valores permanecem em torno de 100 % a despeito de uma oscilação observada.

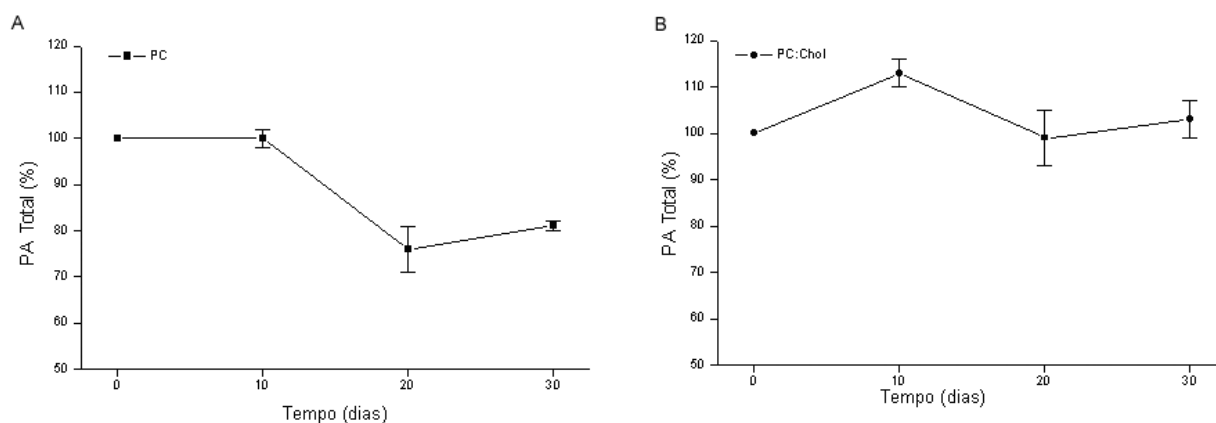


Figura 15 – Perfil de estabilidade do teor total de PA (%) nas formulações lipossomais conforme o tempo. A – Lipossoma de PC e B – Lipossoma de PC/Chol.

A Figura 16 apresenta o teor de PA encapsulada nos diferentes lipossomas em função do tempo. Os valores expressos correspondem à média (n=3) ± desvio padrão.

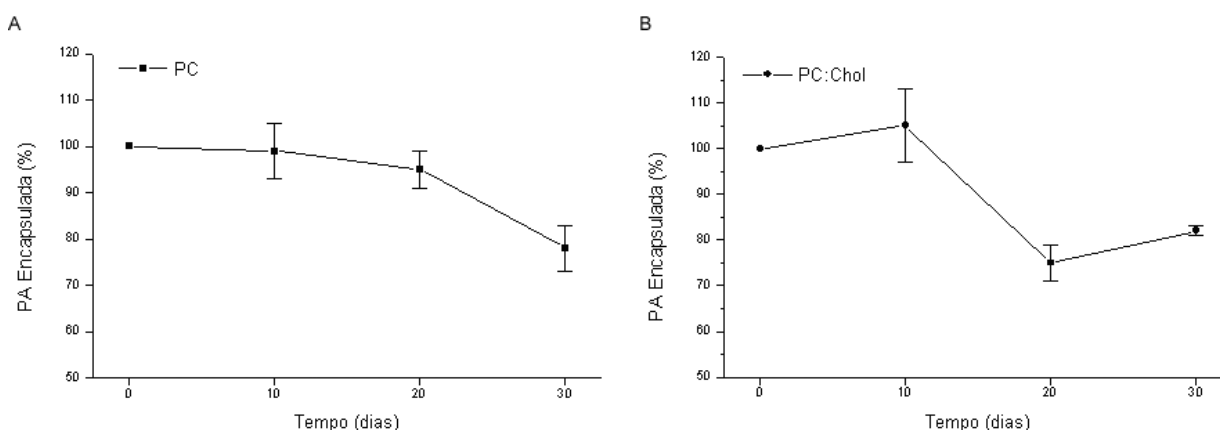


Figura 16 – Perfil de estabilidade da encapsulação da PA (%) nas formulações lipossomais conforme o tempo. A – Lipossoma de PC e B – Lipossoma de PC/Chol.

Os lipossomas PC e PC/Chol apresentaram uma ligeira diminuição da concentração de PA encapsulada em comparação com os valores iniciais. O teor de encapsulação, ao final de 30 dias, foi de  $78 \pm 5\%$  e  $82 \pm 1\%$  do valor inicial para os lipossomas PC e PC/Chol, respectivamente.

## 5.4 Validação da retirada de estrato córneo e epiderme

### 5.4.1 Análises histológicas

As análises histológicas foram feitas a fim de caracterizar os diversos procedimentos de tratamento prévio dos fragmentos de pele. A retirada do EC foi feita com *strippings* e a da epiderme com aquecimento a 60 °C. A Figura 17 representa imagens microscópicas de seções histológicas de pele de orelha de porco.

Observa-se que na Figura 17A (pele intacta), a presença do EC é nítida, sendo caracterizado por uma série de camadas sobrepostas à epiderme. Na Figura 17B (30 *strippings*) observa-se uma remoção quase completa do EC, com retirada de grande parte das camadas na superfície da pele, enquanto que, nas invaginações (Figura 17C) ainda observa-se um pequeno número de camadas. Nessas regiões (invaginações), o contato da fita adesiva com a pele não é completo e isto dificulta a remoção do EC. Assim sendo, a utilização de um rolo de pressão elevada (140 g/cm<sup>2</sup>) foi capaz de remover praticamente toda a camada córnea exceto nas regiões de invaginação onde a topografia dificulta a adesão da fita. A Figura 17D mostra claramente que o epitélio pavimentoso estratificado, que caracteriza a epiderme, foi removido completamente e que o tecido conjuntivo rico em colágeno e elastina, que caracteriza a derme, foi preservado. Assim, o procedimento adotado (aquecimento a 60 °C com remoção da epiderme com um bisturi) foi efetivo para remoção da epiderme e preservação da derme.

LADEMANN *et al.* (2005) utilizaram uma fita adesiva diferente e mais de 90 *strippings* em pele humana e não foi possível eliminar totalmente o EC da região das invaginações, por causa da perda de flexibilidade e elasticidade da pele que ocorre durante a realização da técnica de *tape stripping*. O número de camadas do EC da pele da orelha suína foi avaliado antes e após diversos *strippings* conduzidos com uma fita adesiva (JACOBI *et al.* 2005). O EC foi constituído de  $21 \pm 5$  camadas, antes do *stripping* e uma média de  $13 \pm 3$  camadas de células foi removida após 20 *strippings*, correspondendo a cerca de 62 %.

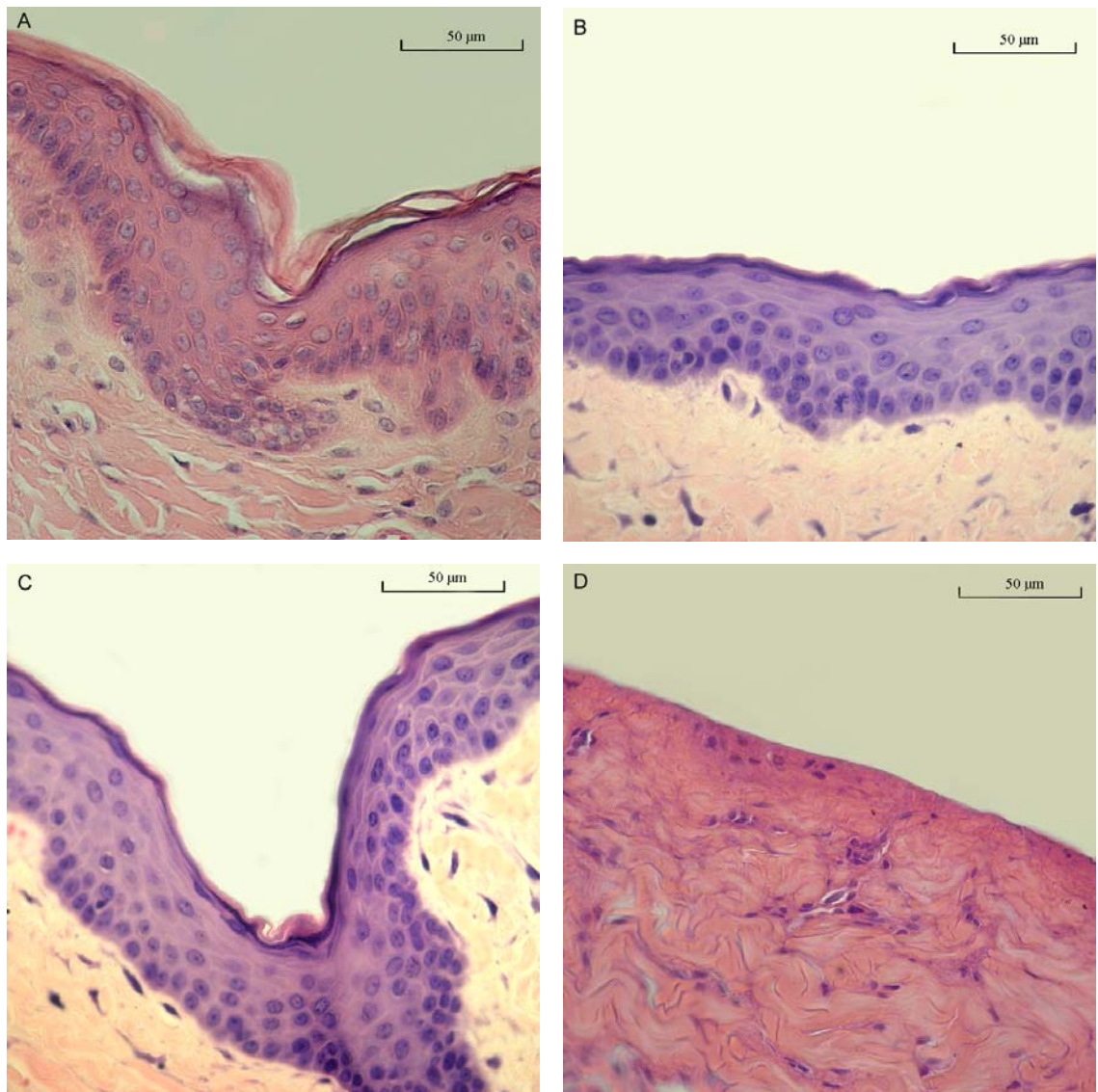


Figura 17 – Análises histológicas de pele de orelha de porco, observadas sob aumento de 40 x. A – pele intacta, B – pele sem EC em área sem invaginação (30 *strippings*), C – pele sem EC em área com invaginação (30 *strippings*), D – pele sem epiderme.

### 5.4.2 Determinação da Perda de Água Transepidermica (PAT)

A determinação da PAT teve como objetivo a avaliação da eficiência da função barreira da pele. Os valores baixos da PAT correspondem a uma pele com barreira eficiente, enquanto que valores altos indicam comprometimento da função barreira. A Figura 18 ilustra esse fenômeno representando a PAT em  $\text{g/h.m}^2$  em função do número de *strippings*, ou seja, em função da redução da espessura do EC.

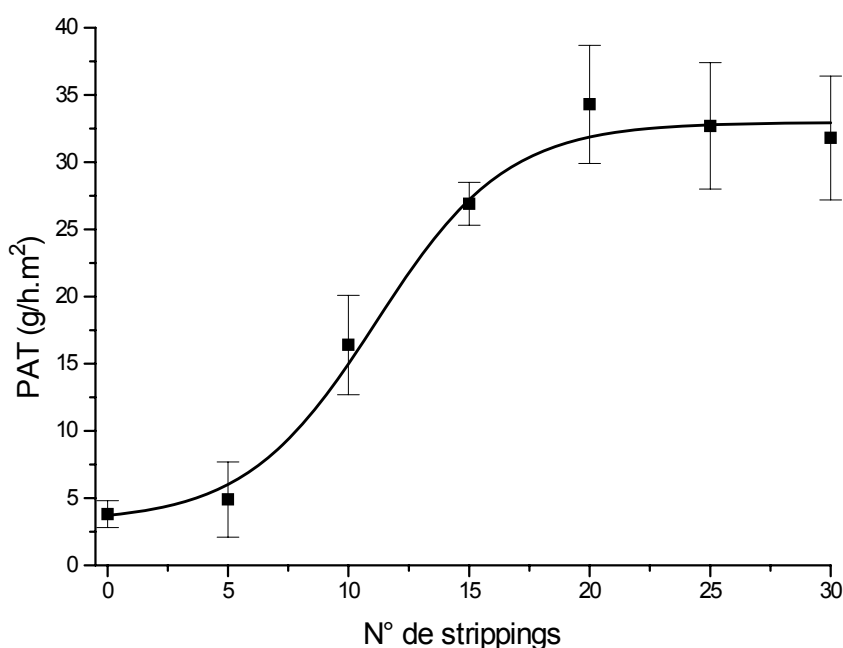


Figura 18 – Determinação da Perda de Água Transepidermica

Observa-se que no intervalo entre o 5º e o 15º *stripping* o aumento da PAT foi significativo, alcançando um valor próximo de  $30 \text{ g/h.m}^2$ . A partir daí, pequenos aumentos ocorreram até a obtenção de um patamar em torno de  $32 \text{ g/h.m}^2$ . Portanto, pela análise do gráfico pode-se sugerir que a realização de 30 *strippings* foi capaz de remover totalmente a principal barreira à difusão do vapor de água. Considerando que esta barreira é atribuída ao EC, pode-se concluir que ele tenha sido completamente removido, embora, pelas análises histológicas, tenham mostrado que nas regiões de invaginação da pele ainda houve persistência de algumas camadas do EC.

---

As medidas da PAT têm sido usadas para avaliação da função barreira do EC e, em particular, da remoção do EC através da técnica do tape stripping. SEKKAT *et al.* (2002) demonstraram que o valor da PAT apresentou um pequeno aumento com a retirada dos primeiros 40% do EC, mas aumentou cerca de 5 vezes em relação ao seu valor inicial após a realização de 20 *strippings* com uma fita similar aquela usada em nossos experimentos. No entanto, as análises histológicas realizadas demonstraram uma remoção quase completa do EC, com a presença de um maior número de camadas na região das invaginações. Estes resultados são similares àqueles obtidos em nossos estudos.

No estudo de WEIGMANN *et al.* (2005), foi estabelecida uma comparação entre a quantificação das mudanças no EC após tape stripping por meio de determinação de PAT e por espectroscopia por absorbância, utilizando uma fita transparente (Tesa film nº 5529) e um cilindro para promover pressão constante. Observou-se que a PAT aumentou continuamente até o 30º *stripping* e, em seguida, tendeu para a formação de um platô de forma similar ao que foi observado em nossos experimentos.



## 5.5 Permeação e penetração cutânea *in vitro* da PA

### 5.5.1 Permeação e penetração da PA através da pele intacta

Os dados obtidos nos estudos de permeação cutânea da PA a partir das diferentes formulações podem ser visualizados na Tabela 2.

A permeação cutânea *in vitro* da PA através da pele intacta (Tabela 2) a partir das diferentes preparações lipossomais foi abaixo do limite de detecção do método. Assim sendo, a PA não foi detectada no líquido receptor 8 horas após aplicação dos lipossomas, ou seja, não ocorreu permeação significativa da PA através da pele. Isto pode ser explicado pelo caráter fortemente hidrofílico do fármaco e pela sua incapacidade de permear a barreira hidrofóbica representada pelo EC. Por outro lado, nenhuma das formulações avaliadas foi capaz de induzir aumento da sua permeação.

Dados publicados previamente mostraram que a permeação da PA através da pele de camundongos glabros foi baixa, independente da formulação testada. No entanto, a permeação a partir de lipossomas LUV PC e PC/Chol (aproximadamente 1% da dose aplicada) foi maior do que aquela observada para uma solução aquosa do antibiótico (FERREIRA *et al.* 2004). Assim sendo, quando comparamos os dados obtidos naquele trabalho com os do presente estudo, pode-se observar que a permeação foi detectada com pele de camundongos, mas não com pele de porco. Essas diferenças podem ser atribuídas ao fato de que a pele de camundongos é mais permeável do que a pele suína (ROY *et al.*, 1994; SIMON & MAIBACH, 2000).

Diversos estudos previamente publicados demonstraram o potencial dos lipossomas para aumento da penetração e permeação de substâncias hidrofílicas. A penetração da carboxifluoresceína nas camadas mais profundas da pele humana aumentou em 280% (VERMA *et al.*, 2003). A sua permeação foi desprezível a partir de uma solução, mas detectada a partir dos lipossomas contendo Phospholipon® 90 (PC). A penetração de inulina, um carboidrato do grupo dos polissacarídeos chamados frutanas, nas camadas mais profundas da pele de camundongo aumentou em 300% a partir de lipossomas LUV contendo PC/Chol/sulfato de colesterila (razão molar 1/0,5/0,1) em comparação com uma solução (du PLESSIS *et al.*, 1994). Em outro estudo, HONZAK *et al.* (2000) demonstraram aumento na penetração de um marcador hidrofílico conhecido como GluSL (N-(1-oxil-2,2,6,6-

tetrametil-4-piperidinil)-2,3,4,5,6-pentahidroxi-hexanoamida), tanto em lipossomas com lecitina não-hidrogenada como com lecitina hidrogenada em relação à solução.

Os valores da penetração cutânea da PA a partir das três formulações podem ser visualizados também na Tabela 2. Os dados são descritos em porcentagem acumulada da dose aplicada (% da dose aplicada) e quantidade de PA penetrada por área de aplicação ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ).

Tabela 2 – Permeação e penetração cutânea *in vitro* da PA, a partir das formulações lipossomais e em solução, através da pele intacta

Formulação	Permeação (8h)	Penetração cutânea	
		$\mu\text{g}/\text{cm}^2$	% dose aplicada
PC	ND	$3,6 \pm 0,1^*$	$7,2 \pm 0,2^*$
PC/Chol	ND	$3,8 \pm 0,2$	$4,8 \pm 0,2$
Solução	ND	$1,6 \pm 0,1$	$1,9 \pm 0,1$

Os valores expressos correspondem à média (n=3)  $\pm$  dp (desvio padrão)

\* Os valores expressos correspondem à média (n=5)  $\pm$  dp (desvio padrão)

Concentração da PA nas formulações: 0,9 (PC), 1,4 (PC/Chol) e 1,5 mg/mL (solução), respectivamente.

A penetração da PA a partir dos lipossomas PC e PC/Chol ( $7,2 \pm 0,2\%$  e  $4,8 \pm 0,2\%$ , respectivamente) foi aproximadamente 4 vezes e 2 vezes maior que aquela observada para solução aquosa ( $1,9 \pm 0,1\%$ ). Estes dados mostram claramente que a formulação lipossomal foi capaz de induzir aumento da penetração da PA em comparação com uma solução aquosa. As diferenças entre as formulações lipossomais e a solução aquosa foram estatisticamente significativas ( $P < 0,001$ ). No entanto, quando as duas formulações lipossomais foram comparadas observa-se que a penetração foi favorecida para o lipossoma PC em comparação com o PC/Chol. A diferença entre os lipossomas foi também estatisticamente significativa ( $P < 0,001$ ). Assim sendo, o lipossoma PC proporcionou maior penetração da PA em comparação com o lipossoma PC/Chol.

O Chol reduz a fluidez dos fosfolipídios de baixa temperatura de transição de fase (PC, por exemplo). As mudanças da fluidez causada pelo Chol são proporcionais às mudanças na permeabilidade de membrana, ou seja, a redução na fluidez gera diminuição na permeabilidade. Assim sendo, a presença do Chol

poderia diminuir a liberação da PA a partir dos lipossomas. Por outro lado, estas mudanças podem também afetar a capacidade de interação dos lipossomas com a pele e o EC, em particular.

Diversos estudos têm avaliado a influência da composição lipossomal e da presença do Chol, em particular, sobre a penetração de fármacos na pele. CODERCH *et al.* (2000) investigaram a correlação entre a fluidez da membrana modulada pelo colesterol e o transporte de fluoresceína de sódio encapsulada em lipossomas de diversas composições na pele. A penetração obtida foi maior para lipossomas fluidos como PC e PC/Chol (80/20) do que para lipossomas rígidos constituídos por fosfatidilcolina hidrogenada (PCH) e PCH/Chol (80/20). Os autores observaram que o aumento da rigidez da membrana lipossomal, modulado pela presença de colesterol, diminuiu a penetração do fármaco encapsulado na pele. Esta modificação da rigidez da membrana induzida pelo Chol foi caracterizada por meio de ressonância paramagnética eletrônica, que monitorou a dinâmica molecular dos lípides.

Assim sendo, vesículas fluídas (“liquid-state”) aumentam a penetração nas camadas mais profundas da pele, enquanto que vesículas rígidas (“gel-state”) promovem menor taxa de transporte do fármaco através do EC e, conseqüentemente, menor permeação cutânea. No entanto, estas vesículas rígidas proporcionam liberação controlada (BOWSTRA & HONEYWELL-NGUYEN, 2002; VERMA, 2003).

Os mecanismos através dos quais os lipossomas proporcionam aumento de penetração ainda não são bem estabelecidos, mas sugere-se que isto seja devido principalmente às modificações estruturais no EC, produzindo uma mudança na função barreira da pele (VERMA, 2003; CODERCH, 2000).

### **5.5.2 Permeação e penetração da PA através da pele sem EC**

Na Tabela 3 estão descritos os dados de permeação cutânea (em % da dose aplicada e  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) através da pele sem EC após 8 horas.

Tabela 3 – Permeação cutânea in vitro da PA, a partir das formulações lipossomais e em solução, através da pele sem EC, após 8h.

Formulação	Permeação cutânea	
	$\mu\text{g}/\text{cm}^2$	% dose aplicada
PC	$14,6 \pm 0,6$	$19,6 \pm 0,8$
PC/Chol	$4,5 \pm 0,4$	$6,1 \pm 0,5$
Solução	$0,9 \pm 0,5^*$	$1,0 \pm 0,6^*$

Os valores expressos correspondem à média (n=4)  $\pm$  dp (desvio padrão)

\* Os valores expressos correspondem à média (n=5)  $\pm$  dp (desvio padrão)

Concentração da PA nas formulações: 1,6 (PC), 1,4 (PC/Chol) e 1,5 mg/mL (solução), respectivamente.

Limite de detecção: 0,15  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

A permeação da PA a partir dos lipossomas PC ( $19,6 \pm 0,8\%$ ) e PC/Chol ( $6,1 \pm 0,5\%$ ) foi cerca de 20 e 6 vezes, respectivamente, maior do que aquela observada para solução aquosa ( $1,0 \pm 0,6\%$ ). Portanto, as formulações lipossomais foram capazes de induzir aumento considerável na permeação da PA em comparação com uma solução aquosa através da pele sem EC. As diferenças entre as formulações lipossomais e a solução foram estatisticamente significativas ( $P < 0,001$ ). No entanto, este efeito acelerador e promotor de permeação foi mais evidente para o lipossoma PC em comparação com o PC/Chol. A diferença entre as formulações lipossomais foi estatisticamente significativa ( $P < 0,001$ ).

A despeito da remoção quase completa do EC, a principal barreira à difusão de fármacos, a permeação da PA a partir da solução foi baixa representando somente cerca de 1% da dose aplicada. Assim sendo, a epiderme sem ou com uma pequena quantidade residual de EC ainda constitui uma barreira importante para a permeação da PA. Isto pode ser explicado pelo caráter fortemente hidrofílico e massa molecular elevada deste antibiótico criando um obstáculo para a difusão através das camadas da epiderme. FERREIRA *et al.* (2004) observaram que a permeação da PA através da pele de camundongos sem EC foi alta representando cerca de 90% da dose aplicada a partir de uma solução. Isto pode ser explicado, conforme mencionado anteriormente, pelo fato de que a pele de camundongos é mais permeável do que a pele suína oferecendo menor resistência à difusão da PA.

Por outro lado, a incorporação em lipossomas favoreceu a difusão da PA através da pele sem EC. Estes dados estão correlacionados com diversos trabalhos publicados previamente. VORAUER-UHL *et al.* (2001) sugerem que os efeitos benéficos causados em processos inflamatórios pós-queimadura pela Cu/Zn-superóxido dismutase encapsulada em lipossomas podem ser atribuídos ao aumento na penetração e liberação controlada na pele lesionada de coelhos. ROESKEN *et al.* (2000) também observaram que lipossomas contendo cloridrato de buflomedil, um promotor da cicatrização de caráter hidrofílico que atua aumentando a perfusão microvascular, promoveram maior reparo tecidual de feridas em pele de camundongos. Estes dados sugerem que os lipossomas aumentam a concentração da substância na derme e epiderme diminuindo sua concentração plasmática.

Os dados obtidos nos estudos de penetração cutânea da PA através da pele sem EC a partir das diferentes formulações podem ser visualizados na Tabela 4. Os dados são descritos em porcentagem acumulada da dose aplicada (% dose aplicada) e razão da quantidade acumulada de PA permeada pela área de aplicação ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ).

Tabela 4 – Penetração cutânea *in vitro* da PA, a partir das formulações lipossomais, através da pele sem EC.

Formulação	Penetração cutânea	
	$\mu\text{g}/\text{cm}^2$	% dose aplicada
PC	5,5 ± 0,3	6,1 ± 0,3
PC/Chol	3,8 ± 0,7	4,8 ± 0,9
Solução	5,3 ± 0,5*	6,3 ± 0,6*

Os valores expressos correspondem à média (n=4) ± dp (desvio padrão)

\* Os valores expressos correspondem à média (n=5) ± dp (desvio padrão)

Concentração da PA nas formulações: 1,6 (PC), 1,4 (PC/Chol) e 1,5 mg/mL (solução), respectivamente.

A penetração da PA a partir do lipossoma PC (6,1 ± 0,3%) e da solução (6,3 ± 0,6%) foi maior do que aquela observada para o lipossoma PC/Chol (4,8 ± 0,9%). No entanto, a diferença entre o lipossoma PC e a solução não foi estatisticamente significativa ( $P > 0,05$ ), mas há diferença estatística entre essas formulações e a do PC/Chol ( $P < 0,001$ ).

### 5.5.3 Permeação cutânea da PA através da pele sem epiderme

As Figuras 19 e 20 mostram o perfil da permeação cutânea da PA a partir das diferentes formulações através da pele sem epiderme. As permeações, em  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  e em porcentagem da dose aplicada, no líquido receptor em função do tempo podem ser observadas. Os valores expressos correspondem à média ( $n=3$ )  $\pm$  desvio padrão.

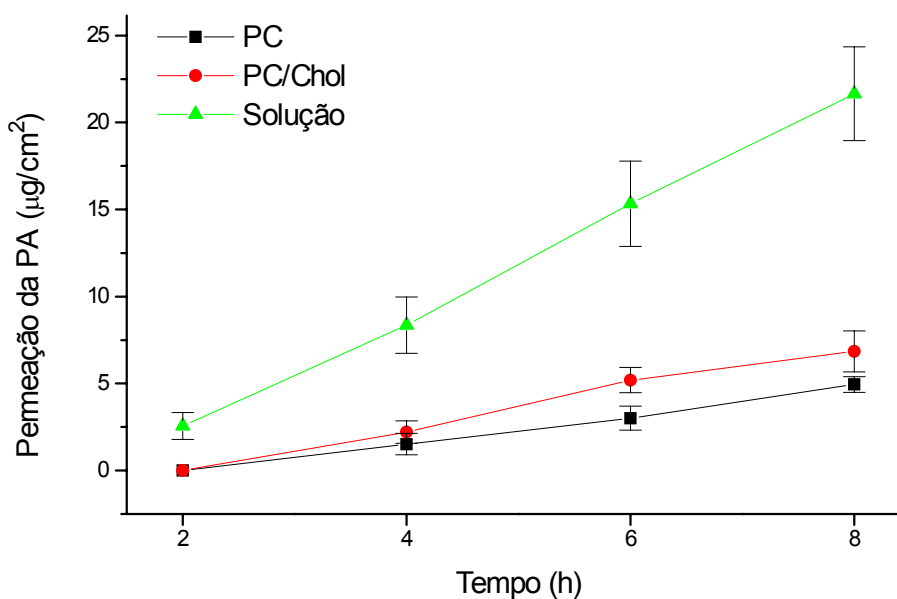


Figura 19 – Permeação cutânea (em  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) *in vitro* da PA a partir das formulações lipossomais e da solução, através de pele de orelha de porco sem epiderme.

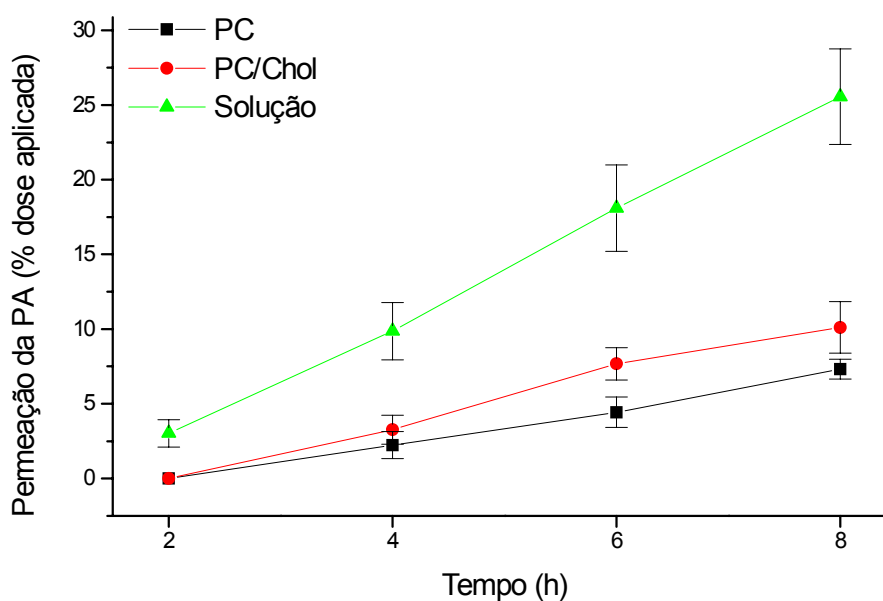


Figura 20 – Permeação cutânea (em porcentagem de dose aplicada) *in vitro* da PA a partir das formulações lipossomais e da solução, através de pele de orelha de porco sem epiderme.

A permeação da PA a partir da solução aquosa após 8 horas ( $22 \pm 3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) foi maior do que aquela observada para os lipossomas PC ( $5,0 \pm 0,4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) e PC/Chol ( $6,8 \pm 1,2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ). Assim, os lipossomas proporcionaram um perfil de liberação controlada da PA na ausência da epiderme (Figuras 19 e 20). A permeação da PA a partir das formulações foi na seguinte ordem: solução > PC > PC/Chol. Estes dados sugerem que as formulações lipossomais podem contribuir para manutenção do fármaco no local de aplicação contribuindo para diminuir sua difusão e absorção sistêmica na ausência de uma barreira importante para a permeação do fármaco.

A Tabela 5 mostra os dados de permeação da PA (em % da dose aplicada e  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) através da pele sem epiderme após 8 horas.

Tabela 5 – Permeação cutânea in vitro da PA, após 8h, a partir das formulações lipossomais e em solução, através da pele de orelha de porco sem epiderme

Formulação	Permeação cutânea	
	$\mu\text{g}/\text{cm}^2$	% dose aplicada
PC	$5,0 \pm 0,4$	$7,3 \pm 0,7$
PC/Chol	$6,8 \pm 1,2$	$10 \pm 2$
Solução	$22 \pm 3$	$26 \pm 3$

Os valores expressos correspondem à média ( $n=3$ )  $\pm$  dp (desvio padrão)

Concentração da PA nas formulações: 1,2 (PC e PC/Chol) e 1,5 mg/mL (solução), respectivamente.

Após 8h, a permeação de PA a partir da solução ( $26 \pm 3\%$ ) foi cerca de 4 vezes maior que aquela observada a partir das formulações lipossomais (PC e PC/Chol, com  $7,3 \pm 0,7$  e  $10 \pm 2\%$ , respectivamente), havendo diferença estatística significativa ( $P < 0,001$ ). Entretanto, apesar do perfil da permeação das formulações lipossomais serem diferentes, conforme mostrado nas figuras 18 e 19, não há diferença estatística significativa entre a permeação cutânea média dos lipossomas entre si ( $P > 0,05$ ) após 8h de permeação.

A permeação da PA através da pele sem epiderme foi maior do que aquela observada com a pele intacta ou sem EC. Entretanto, isto foi mais evidente para a forma livre (solução) do que para as formulações lipossomais (Tabelas 2, 3 e 5). A permeação a partir da solução, por exemplo, não foi detectada na pele intacta e foi

de somente 1% da dose aplicada na pele sem EC, enquanto que, para a pele sem epiderme, ela foi de 26%. Pode-se observar, portanto, um aumento de 26 vezes. Assim sendo, a remoção da principal barreira (epiderme) permitiu maior permeação da PA. Para o lipossoma PC, no entanto, a permeação através da pele sem EC (19,6% dose aplicada) foi maior do que aquela observada para a pele sem epiderme (7,3% da dose aplicada). A remoção da epiderme promove maior perda de água através das camadas da pele, o que pode contribuir para aumentar a estabilidade da estrutura do lipossoma contendo PC, a qual é diminuída pela evaporação da fase aquosa dispersante que normalmente é observada após a aplicação das formulações. A maior estabilidade dos lipossomas neste ambiente promove a liberação de seu conteúdo de forma controlada.

A encapsulação da PA resultou em transporte transdérmico controlado através da pele sem epiderme quando comparado com uma solução aquosa do fármaco. Esses dados indicam que na ausência de barreira para a permeação da PA, os lipossomas mostraram habilidade para modular a difusão do antibiótico. Os resultados obtidos com pele sem epiderme estão em consonância com dados previamente publicados, nos quais a liberação tópica da hidrocortisona através da pele sem EC foi sustentada e local quando comparada com formulações convencionais (KIM et al., 1997).

O conjunto dos dados obtidos mostrou que a encapsulação da PA em lipossomas permitiu aumento da permeação e penetração cutânea através da pele intacta e sem EC, enquanto que uma liberação controlada foi observada na pele sem barreira à difusão do fármaco. Esses dados são particularmente relevantes para o tratamento tópico da LC com a PA, uma vez que as formulações podem ser aplicadas em lesões ulceradas, as quais perderam a barreira que limita a difusão do fármaco ou em lesões com hiperqueratose, que representam uma barreira adicional à absorção. Nestas duas situações, os lipossomas representariam uma alternativa interessante para aumento da biodisponibilidade da PA no local de ação.



## 6 CONCLUSÃO GERAL

Este trabalho teve como objetivo desenvolver lipossomas contendo PA para tratamento tópico da LC e avaliar sua permeação cutânea *in vitro* através da pele de orelha de porco.

Lipossomas fluidos (PC e PC/Chol) e rígidos (DPPC e DPPC/Chol) foram desenvolvidos e caracterizados quanto ao tamanho, potencial zeta e taxa de encapsulação. A taxa de encapsulação da PA variou de 10 a 13% e o tipo de vesícula tem pouca influência neste parâmetro. O tamanho dos lipossomas rígidos e sua heterogeneidade foram altos ( $IP > 0,7$ ), enquanto que para os lipossomas fluidos, o tamanho variou de  $516 \pm 57$  a  $362 \pm 32$  nm e a heterogeneidade, de 0,7 a 0,4, respectivamente para PC e PC/Chol. A encapsulação da PA promoveu diminuição do valor negativo do potencial zeta do lipossoma, o que sugere uma provável interação entre a PA e a membrana lipossomal.

Para simular as condições de uso, os experimentos de permeação da PA a partir dos lipossomas fluidos foram conduzidos com pele intacta, sem EC e sem epiderme. A remoção do EC foi confirmada por meio da determinação da PAT e de análises histológicas, as quais demonstraram uma remoção quase completa do EC. A retirada da epiderme foi confirmada por meio das análises histológicas.

A permeação da PA através da pele intacta foi baixa, independente da formulação avaliada. Entretanto, a penetração cutânea a partir dos lipossomas PC e PC/Chol foi maior do que aquela observada para a solução, sendo que o lipossoma PC promoveu maior penetração do que o PC/Chol. Na ausência do EC, a permeação a partir dos lipossomas foi significativamente maior do que aquela observada para a solução, sendo que o efeito promotor foi maior para o lipossoma constituído por PC em comparação com vesículas de PC/Chol. Por outro lado, a permeação através da pele sem epiderme a partir da solução aquosa foi maior do que aquela observada para os lipossomas, sendo que a encapsulação proporcionou um perfil de liberação controlada.

O conjunto dos dados obtidos mostrou que a encapsulação da PA em lipossomas permitiu aumento da penetração e permeação da PA na pele. Estes dados sugerem que os lipossomas representam uma alternativa interessante para o tratamento tópico da LC com PA.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARANA, B.A., MENDOZA, C.E., RIZZO, N.R., KROEGER, A. Randomized, controlled, double-blind trial of topical treatment of cutaneous leishmaniasis with paromomycin plus methylbenzethonium chloride ointment in Guatemala. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 65, p. 466-70, 2001.
- ARMIJOS, R., WEIGEL, M., CALVOPIÑA, M., MANCHENO, M., RODRIGUEZ, R. Comparison of the effectiveness of two topical paromomycin treatments versus meglumine antimoniate for New World cutaneous leishmaniasis. *Acta Tropica*, v. 91, p. 153-160, 2004.
- ASILIAN, A., JALAYER, T., WHITWORTH, J.A.G., GHASEMI, R.L., NILFOROOSHZADEH, M., OLLIARO, P. A randomized, placebo-controlled trial of a two-week regimen of aminosidine (paromomycin) ointment for treatment of cutaneous leishmaniasis in Iran. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 53, p. 648-651, 1995.
- ASILIAN, A., JALAYER, NILFOROOSHZADEH, M., GHASEMI, R.L., PETO, R., WAYLING, S., OLLIARO, P., MODABBER, F. Treatment of cutaneous leishmaniasis with aminosidine (paromomycin) ointment: double-blind, randomized trial in the Islamic Republic of Iran. *Bulletin of the World Health Organization*, v. 81, p. 353-359, 2003.
- BARBIERI, C.M & PILCH, D.S. Complete thermodynamic characterization of the multiple protonation equilibria of the aminoglycoside antibiotic paromomycin: a calorimetric and natural abundance  $^{15}\text{N}$  NMR study. *Biophysical Journal*, v. 90, p. 1338-1349, 2006.
- BARRY, B. W. Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 14, p. 101-114, 2001.
- BENECH-KIEFFER, F., WEGRICH, P., SCHWARZENBACH, R., KLECAK, G., WEBER, T., LECLAIR, J., SCHAEFER, H. Percutaneous absorption of sunscreens in vitro: interspecies comparison, skin models and reproducibility aspects. *Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology*, v. 13, p. 324-335, 2000.
- BEN SALAH, A., ZAKRAOUI H., ZAATOUR A., FTAITI A., ZAAFOURI B., GARRAOUI A., OLLIARO P. L., DELLAGI K., ISMAIL R. B. A randomized, placebo-controlled trial in Tunisia treating cutaneous leishmaniasis with paromomycin ointment. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 53, p.162-166, 1995.
- BERMAN, F. Clinical status of agents being developed for leishmaniasis. *Expert opinion on investigational drugs*, v. 14, p. 1337-1346, 2005.
- BOWSTRA, J. A., HONEYWELL-NGUYEN, P. L. Skin structure and mode of action of vesicles. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 54, n. 1, p. s41-s55, 2002.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. *Manual de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana*. Brasília: 2000, 62 p.
- BRONAUGH, R.L. Methods for in vitro percutaneous absorption. *Toxicology Methods*, v. 5, n. 4, p. 265-273, 1995.

- BRYCESON, A. D., MURPHY, A., MOODY, A. H. Treatment of 'Old World' cutaneous leishmaniasis with aminosidine ointment: results of an open study in London. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 88, n. 2, p. 226-228, 1994.
- CARTER, K.C., ALEXANDER, J., BAILLE, A.J. Studies on the tropical treatment of experimental cutaneous leishmaniasis: the therapeutic of methyl benzethonium chloride and aminoglycosides, gentamicin and paromomycin. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, v. 83, n. 3, p. 233-239, 1989.
- CASTRO, G.A., NASCIMENTO, D.S., NUNAN, E.A., FERNANDES, A.P., FERREIRA, L.A.M. *In vitro* skin permeation of paromomycin from topical formulations across normal and stripped hairless mouse skin. *S.T.P. Pharma Sciences*. v. 13, p. 203-208, 2003.
- CODERCH, L., FONOLLOSA, J., DE PERA, M. ESTELRICH, J., DE LA MAZA, A., PARRA, J. L. Influence of cholesterol on liposome fluidity by EPR. Relationship with percutaneous absorption. *Journal of Controlled Release*, v. 68, p. 85-95, 2000.
- CORRÊA, J. R.; BRAZIL, R. P.; SOARES, M. J. Leishmania (Viannia) lainsoni (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), a divergent Leishmania of the Viannia subgenus – A mini review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 100, n. 6, p. 687-692, 2005.
- CROFT, S.L., COOMBS, G.H. Leishmaniasis – current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends in Parasitology*, v. 19, n. 11, p. 502-208, 2003.
- CROFT, S.L., SEIFERT, K., YARDLEY, V. Current scenario of drug development for leishmaniasis. *The Indian Journal of Medical Research*, v. 123, p. 399-410, 2006.
- DAVIES, C. R., KAYE, P., CROFT, S. L., SUNDAR, S. Leishmaniasis: new approaches to disease control. *British Medical Journal*, v. 326, p. 377-82, 2003.
- DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*, v. 27, p. 305-318, 2004.
- DICK, I.P., SCOTT, R.C. Pig ear skin as an *in vitro* model for human skin permeability. *Journal of Pharmaceutical Pharmacology*, v. 44, p. 640-645, 1992.
- DIEMBECK, W., BECK, H., BENECH-KIEFFER, COURTELLEMONT, P., DUPUIS, J., LOVELL, W., PAYE, M., SPENGLER, J., STEILING, W. Test Guidelines for *in vitro* assessment of dermal absorption and percutaneous penetration of cosmetic ingredients. *Food and Chemical Toxicology*, v. 37, p. 191-205, 1999.
- DING, W.-x, QI, X.-r., LI, P., MAITANI, Y., NAGAI, T. Cholesteryl hemisuccinate as a membrane stabilizer in dipalmitoylphosphatidylcholine liposomes containing saikosaponin-d. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 300, p. 38–47, 2005.
- EL-ON, J., GREENBLATT, C.L. An *in vitro* model for testing the effect of anti-leishmanial drugs of possible use in topical treatment. *Current Therapeutic Research*, v. 33, p. 660-669, 1983.
- EL-ON, J., JACOBS, G.P., WITZTUM, E., GREENBLATT, C.L. Development of topical treatment for cutaneous leishmaniasis caused by leishmania major in experimental animals. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 26, n. 2, p. 745-751, 1984.

- EL-ON, J., WEINRAUCH, L., LIVSHIN R., JACOBS, G.P., EVEN-PAZ, Z. Topical treatment of recurrent cutaneous leishmaniasis with ointment containing paromomycin and methylbenzethonium chloride. *British Medical Journal*, v. 291, p. 704-705, 1985.
- EL-ON, J., LIVSHIN R., EVEN-PAZ, Z., HAMBURGER, D., WEINRAUCH, L. Topical treatment of cutaneous leishmaniasis. *The Society for Investigative Dermatology*, p. 284-288, 1986.
- EL-ON, J. & HAMBURGER, D. Topical treatment of New and Old World cutaneous leishmaniasis in experimental animals. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 81, p. 734-737, 1987.
- EL-ON, J., LANG, E., KUPERMAN, A., AVINOACH, I. Leishmania major: histopathological responses before and after topical treatment in experimental animals. *Experimental Parasitology*, v. 68, p. 144-154, 1989.
- EL-ON, J., HALEVY, S., GRUNWALD, M.H., WEINRAUCH, L. Topical treatment of Old World cutaneous leishmaniasis caused by Leishmania major: a double-blind control study. *Journal of Academy of Dermatology*, v. 27, p. 227-231, 1992.
- EL-SAFI, S.H., MURPHY, A.G., BRYCESON, A.D.M., NEAL, R.A. A double-blind trial of treatment of cutaneous leishmaniasis with paromomycin ointment. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 84. 690-691, 1990.
- FAGHIHI, G., TAVAKOLI-KIA, R. Treatment of cutaneous leishmaniasis with either topical paromomycin or intralesional meglumine antimoniate. *Clinical and Experimental Dermatology*, v. 28, p. 13-16, 2003.
- FERREIRA, L. S., RAMALDES, G. A., NUNAN, E. A., FERREIRA, L. A. In vitro Skin Permeation and Retention of Paromomycin from Liposomes for Topical Treatment of the Cutaneous Leishmaniasis. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 30, p. 1-8, 2004.
- FLORENCE, A. T., ATTWOOD, D. Emulsões, suspensões e dispersões. In: *Princípios físico-químicos em farmácia*. 3 ed. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2003. Cap. 7, p. 345-411
- GOMES, S. F. O., GAZINELLI, R. T., TAVARES C. A. P., CARVALHO, F. A. A., FERNANDES, A. P. M. S., FERREIRA, L. A. M., Treatment of experimental cutaneous leishmaniasis with topical formulations of paromomycin. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 93, p. 314, 1998.
- GONÇALVES, G.S., FERNANDES, A.P., SOUZA, R.C.C., CARDOSO, J.E., OLIVEIRA-SILVA, F., MACIEL, F.C., RABELLO, A., FERREIRA, L.A.M. Activity of paromomycin hydrophilic formulation for topical treatment of infections by Leishmania (Leishmania) amazonensis and Leishmania (Viannia) braziliensis. *Acta Tropica*, v. 93, p. 161-167, 2005.
- GROGL, M., SCHUSTER, B.G., ELLIS, W.Y., BERMAN, J.D. Successful topical treatment of murine cutaneous leishmaniasis with a combination of paromomycin (aminosidine) and gentamicin. *Journal of Parasitology*, v. 85, n. 2, p. 354-359, 1999.

- GUPTA, V.K., ZATZ, J.L., REREK, M. Percutaneous absorption of sunscreens through Micro-Yucatan pig skin in vitro. *Pharmaceutical Research*, v. 16, n. 10, p. 1602-1607, 1999.
- HEPBURN, N.C. Cutaneous leishmaniasis: an overview. *Journal of Postgraduate Medicine*, v. 49, n. 1, p. 50-54, 2003.
- HONZAK, L., Šentjura, M., Swartz, H. M. In vivo EPR of topical delivery of a hydrophilic substance encapsulated in multilamellar liposomes applies to the skin of hairless and normal mice. *Journal of Controlled Release*, v. 66, p. 221-228, 2000.
- IRAJI, F., SADEGHINIA, A. Efficacy of paromomycin ointment in the treatment of cutaneous leishmaniasis: results of a double-blind, randomized trial in Isfahan, Iran. *Annals of Topical Medicine of Parasitology*, v. 99, n. 1, p. 3-9, 2005.
- JACOBI, U., KAISER, M., RICHTER, H., AUDRING, H., STERRY, W., LADEMANN, J. The number of stratum corneum cell layers correlates with the pseudo-absorption of the corneocytes. *Skin Pharmacology and Physiology*, v. 18, p. 175-179, 2005.
- JACOBI, U., KAISER, M., TOLL, R., MANGELSDORF, S., AUDRING, H., OTBERG, N., STERRY, W., LADEMANN, L. Porcine ear skin: an in vitro model for human skin. *Skin Research and Technology*, v. 13, p. 19-24, 2007.
- JUNGINGER, H. E.; HOFLAND, H. E. J.; BOWSTRA, J. A. Liposomes and niosomes: interactions with human skin. *Cosmetics & Toiletries*, v. 106, p. 45-50, 1991.
- KRAUSE, G., KROEGER, A. Topical treatment of American cutaneous leishmaniasis with paramomycin and methylbenzethonium chloride: a clinical study under field conditions in Ecuador. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 88, p. 92-94, 1994.
- KRAUSE, G., KROEGER, A. Topical paramomycin/methylbenzethonium chloride plus meglumine antimoniate as treatment of American cutaneous leishmaniasis: controlled study. *Clinical Infectious Diseases*, v. 29, p. 466, 1999.
- KIM, M.-K., CHUNG, S.-J., LEE, M.-H., CHO, A.-R., SHIN, C.-K.. Targeted and sustained delivery of hydrocortisone to normal and stratum corneum-removed skin without enhanced skin absorption using a liposome gel. *Journal of Controlled Release*, v. 46, p. 243-251, 1997.
- KIRJAVAINEN, M. *et al.* Phospholipids affect stratum corneum lipid bilayer fluidity and drug partitioning into the bilayers. *Journal of Controlled Release*, v. 58, p.207-214, 1999.
- LADEMANN, J., WEIGMANN, H.-J., SCHANZER, S, RICHTER, H., AUDRING, H. Optical investigations to avoid the disturbing influences of furrows and wrinkles quantifying penetration of drugs and cosmetics into the skin by tape stripping. *Journal of Biomedical Optics*, v. 10 (5), p. 054015-1 – 054015-8, 2005.
- LASIC, D. D. Novel application of liposomes. *Trends in Biotechnology*, v. 16, p. 307-321, 1998.
- LEVIN, J., MAIBACH, H. The correlation between transepidermal water loss and percutaneous absorption: an overview. *Journal of Controlled Release*, v. 103, p. 291-299, 2005.

- MORGANTI, P. RUOCCO, E., WOLF, R., RUOCCO, V. Percutaneous absorption and delivery systems. *Clinics in Dermatology*, v. 19, p. 489-501, 2001.
- 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.
- MURRAY, H.W., BERMAN, J.D., DAVIES, C.R., SARAIVIA, N.G. Advances in leishmaniasis. Acessado em [www.lancet.com](http://www.lancet.com). v. 36, 2005.
- MUSSI, S.S., FERREIRA, L.A.M. Comparative study of the efficacy of formulations containing fluconazole or paromomycin for topical treatment of infections by *Leishmania (Leishmania) major* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Parasitological Research*, v. 100, p. 1221-1226, 2007.
- NEAL, R.A., MURPHY, A.G., OLLIARO, P., CROFT, S.L. Aminosidine ointments for the treatment experimental cutaneous leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 88, p. 223-225, 1994.
- NEAL, R.A., ALLEN, S., MCCOY, N., OLLIARO, P., CROFT, S.L. *The sensitivity of Leishmania species to aminosidine*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 35, p. 577-584, 1995.
- NEVA, A.F., PONCE, C., PONCE, E., KREUTZER, R., MODABBER, F. OLLIARO, P. Non-ulcerative cutaneous leishmaniasis in Honduras fails to respond to topical paromomycin. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 91, p. 473-475, 1997.
- NEW, R. R. C. *Liposomes – a practical approach*. New York: Oxford University Press, 1990, 299 p.
- OMS – Organização Mundial de Saúde. Disponível em: [www.who.int/leishmaniasis/burden/magnitude/burden\\_magnitude/em/index.html](http://www.who.int/leishmaniasis/burden/magnitude/burden_magnitude/em/index.html). Acessado em 29-05-2007.
- du PLESSIS, J., WEINER, N., MÜLLER, D. G. The influence of in vivo treatment of skin with liposomes on the topical absorption of a hydrophilic and a hydrophobic drug in vitro. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 103, p. r1-r5, 1994.
- ROESKEN, F., UHL, E., CURRI, S. B., MENGER, M. D., MESSMER, K. Acceleration of wound healing by topical drug delivery via liposomes. *Langenbeck's Archives of Surgery*, v. 385, p.42-49, 2000.
- ROY, S. D., HOU, S. -Y., WITHAM, S. L., GLYNN, G. L. Transdermal delivery of narcotic analgesics: comparative metabolism and permeability of human cadaver and hairless mouse skin. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 83, p. 1723-1728, 1994.
- RUOZI, B., TOSI, G., FORNI, F., FRESTA, M., VANDELLI, M. A. Atomic force microscopy and photon correlation spectroscopy: Two techniques for rapid characterization of liposomes. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 25, p. 81-89, 2005.
- SEKKAT, N., KALIA, Y. N., GUY, R. H. Biophysical study of porcine ear skin in vitro and its comparison to human skin in vivo. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 91, n. 11, p. 2376-2381, 2002.

- 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.
- SOTO, J., HERNANDEZ, N., MEJIA, H., GROGI, M., BERMAN, J. Successful treatment of New World cutaneous leishmaniasis with a combination of topical paromomycin/methylbenzethonium chloride and injectable meglumine antimonate. *Clinical Infectious Diseases*, v. 20, p. 47-51, 1995.
- SOTO, J., FUYA, P., HERRERA, R., BERMAN, J. Topical paromomycin/methylbenzethonium chloride plus parenteral meglumine antimonate as treatment of american cutaneous leishmaniasis: controlled study. *Clinical Infectious Diseases*, v. 26, p. 56-58, 1998.
- SOTO, J., TOLEDO, J., GUTIERREZ, P., ARBOLEDA, M., NICHOLLS, R., PADILLA, J., BERMAN, J., ENGLISH, C., GROGL, M. Treatment of cutaneous leishmaniasis with a topical antileishmanial drug (WR279396): phase 2 pilot study. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 66, p. 147-151, 2002.
- SWEETMAN, S. C. (ed.) *Martindale: the complete drug reference*. Londres, 34 ed., 2005. 2756 p.
- THE UNITED States Pharmacopeia – USP 24 / The National Formulary – NF 19. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2000, 2391 p.
- THE UNITED States Pharmacopeia – USP 29 / The National Formulary – NF 24. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention, 2006. 3539 p.
- VERMA, D. D., VERMA, S., BLUME, G., FAHR, A. Liposomes increase skin penetration of entrapped and non-entrapped hydrophilic substances into human skin: a skin penetration and confocal laser scanning microscopy study. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 55, p. 271-277, 2003
- VORAUER-UHL, K., FÜRNSCHLIEF, E., WAGNER, A., FERKO, B., KATINGER, H. Topically applied liposome encapsulated superoxide dismutase reduces postburn wound size and edema formation. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 14 p. 63–67, 2001.
- WALKER, M., HULME, T. A., RIPPON, M. G., WALMSLEY, R. S., GUNNIGLE, S., LEWIN, M., WINSEY, S. In Vitro Models for the Percutaneous Delivery of Active Tissue Repair Agents. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 86, p. 1379-1384, 1997.
- WEIGMANN, H.-J., ULRICH, J., SCHANZER, S., JACOBI, U., SCHAEFER, H., STERRY, W., LADEMANN, J. Comparison of Transepidermal Water Loss and Spectroscopic Absorbance to Quantify Changes of the Stratum Corneum after Tape Stripping. *Skin Pharmacology and Physiology*, v. 18, p. 180-185, 2005.
- WEINRAUCH, L., CAWICH, F., CRAIG, P., SOSA, J.X., EL-ON, J. Topical treatment of New World cutaneous leishmaniasis in Belize: a clinical study. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 29, p. 443-446, 1993.