

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ISABEL RAMADAS LEITE NOGUEIRA

**FORMAÇÃO DE PAR IÔNICO COMO UMA POSSÍVEL
ESTRATÉGIA DE AUMENTO DA PERMEAÇÃO
CUTÂNEA DA PAROMOMICINA**

BELO HORIZONTE - MG

2008

ISABEL RAMADAS LEITE NOGUEIRA

**FORMAÇÃO DE PAR IÔNICO COMO UMA POSSÍVEL
ESTRATÉGIA DE AUMENTO DA PERMEAÇÃO
CUTÂNEA DA PAROMOMICINA**

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-orientadora: Prof. Dra Renata Barbosa de Oliveira

BELO HORIZONTE - MG

2008

N778f Nogueira, Isabel Ramadas Leite
Formação de par iônico como uma possível estratégia de aumento da permeação cutânea da paromomicina / Isabel Ramadas Leite Nogueira. – 2009.
74 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Lucas Antônio de Miranda Ferreira
Co-Orientadora: Prof^a Dr^a Renata Barbosa de Oliveira
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais.
Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1.Paromomicina - Teses. 2. Pele – Permeabilidade - Teses. 3. Leishmaniose - Teses. 4. Tecnologia farmacêutica - Teses. 5. Glicodendrimeros – Teses. I. Ferreira, Lucas Antônio de Miranda. II. Oliveira, Renata Barbosa de. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD 615.329

Este trabalho contou com a colaboração de:

Prof^a Dr^a Elzária de Aguiar Nunan
Laboratório de Controle de Qualidade, UFMG

Dedico este trabalho:

À minha querida avó Carlinda,
minha grande conselheira e incentivadora,
mulher forte e a frente de seu tempo,
a quem admiro profundamente em todos os sentidos.

“Para ser grande, sê inteiro: nada
Teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa. Põe quanto és
No mínimo que fazes.
Assim em cada lago a lua toda
Brilha, porque alta vive”.

(Fernando Pessoa)

AGRADECIMENTOS

À Deus, por guiar sempre o meu caminho, por me confortar em todos os momentos difíceis e por ter colocado tantas pessoas especiais ao meu lado.

Ao professor Lucas, meu orientador, pela convivência tão agradável e enriquecedora e por todos os ensinamentos dispensados. Obrigado por ter confiado em mim desde o início e sempre ter acreditado que seria possível.

À professora Renata, minha co-orientadora, pela realização e interpretação dos espectros de RMN. Suas sugestões e observações foram fundamentais para a realização deste trabalho. Agradeço imensamente por todo o convívio e aprendizado.

À professora Elzília pelo acompanhamento nos ensaios microbiológicos e por todas as sugestões dadas.

Ao Gui, por ser a pessoa mais prestativa e disponível que conheço. Este trabalho não seria o mesmo sem você. Obrigada por todas as sugestões e auxílio no laboratório. Seu apoio, sua amizade, companheirismo, bom humor fizeram deste trabalho um tempo que vai deixar saudades.

Aos meus pais. À minha mãe, por me apoiar incondicionalmente em todas as coisas que faço e por sempre acreditar em mim. Ao meu pai por ter me ensinado há muito tempo o significado das palavras disciplina e dedicação. Sem vocês, eu jamais teria chegado até aqui.

À minha família. Meus irmãos por tornarem meus dias mais alegres e menos difíceis, Minha avó Carlinda e Fran por todas as orações e a Nana por ser a única pessoa da família com quem pude discutir todas as minhas dúvidas e aflições do mestrado.

Ao Claudinho, que com paciência e amor me acompanha há muito tempo em todas as minhas conquistas.

Ao Fernandinho, por todas as sugestões, pela amizade, por me ajudar em todos os momentos que precisei e por tornar a rotina no laboratório mais divertida.

Às minhas amigas Josi e Natália, por todo o apoio e amizade. Obrigada por dividirem comigo todos estes momentos. Sem vocês eu talvez nem teria começado este trabalho.

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

Aos alunos de iniciação científica, Diana, Fernando e Tiago, pelo auxílio nos experimentos de doseamento microbiológico. A contribuição de vocês foi muito importante.

Ao Eduardo, técnico responsável do LTF pela ajuda diária e por sua disponibilidade.

Aos amigos do Laboratório de Controle de Qualidade, Ana Gabriela, Larissa e Michele e José Antônio, pela convivência e pela ajuda no laboratório.

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

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

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	12
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	13
LISTA DE TABELAS.....	14
LISTA DE FIGURAS.....	15
1 INTRODUÇÃO.....	17
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	18
2.1 Leishmanioses.....	18
2.2 Leishmaniose cutânea.....	19
2.3 Quimioterapia da leishmaniose cutânea.....	19
2.3.1 Paromomicina.....	20
2.3.1.1 Estudos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> envolvendo PA.....	21
2.3.1.2 Estudos clínicos envolvendo PA.....	22
2.3.1.3 Permeação cutânea <i>in vitro</i> da PA.....	23
2.4 Pele.....	24
2.4.1 Estrutura da pele.....	24
2.4.2 Rotas de permeação de substâncias através da pele.....	26
2.4.3 Avaliação da permeação cutânea <i>in vitro</i>	26
2.4.3.1 Método de remoção do EC.....	28
2.5 Estratégias de aumento da permeação cutânea de fármacos.....	28
2.5.1 Formação do par iônico.....	29
2.5.2 Estudos envolvendo o par iônico como estratégia de aumento da lipofilia de fármacos.....	31
3 OBJETIVOS.....	34
3.1 Objetivo geral.....	34
3.2 Objetivos específicos.....	34
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
4.1 Obtenção da PA na forma de base livre.....	36
4.2 Ensaio microbiológico para doseamento da PA.....	37
4.3 Caracterização da PA base livre.....	39

4.3.1 Teste de identificação de sulfato.....	39
4.3.2 Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	39
4.3.3 Atividade da PA após processo de troca iônica.....	39
4.3.3.1 Obtenção da curva padrão do sulfato de PA.....	40
4.3.3.2 Obtenção das curvas analíticas da PA base livre.....	41
4.4 Síntese de sais de PA.....	41
4.5 Caracterização da formação dos pares iônicos.....	42
4.6 Determinação do coeficiente de partição octanol/água (log K) da PA.....	42
4.6.1 Influência do pH.....	42
4.6.2 Influência da adição de contra-íons – formação do par iônico.....	43
4.7 Determinação da solubilidade da PA e seus sais em diferentes solventes.....	43
4.8 Permeação e penetração cutânea <i>in vitro</i>	44
4.8.1 Preparação da pele.....	44
4.8.1.1 Retirada do estrato córneo.....	44
4.8.2 Montagem das células de Franz.....	45
4.8.3 Preparo e aplicação das formulações (soluções).....	45
4.8.4 Determinação da difusão.....	46
4.8.4.1 Remoção da PA não absorvida.....	46
4.8.4.2 Extração da PA na pele.....	46
4.8.4.2.1 Validação da extração do BUT – PA da pele.....	47
4.8.5 Análise estatística	47
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
5.1 Obtenção da PA na forma de base livre.....	48
5.2 Caracterização da PA base livre.....	48
5.2.1 Teste de identificação de sulfato.....	48
5.2.2 RMN.....	48
5.2.3 Atividade da PA base livre após processo de troca iônica.....	52
5.2.3.1 Obtenção da curva padrão do sulfato de PA.....	52
5.2.3.2 Obtenção das curvas analíticas da PA base livre.....	53
5.2.3.3 Obtenção da curva padrão de PA base livre.....	54
5.3 Síntese dos sais de PA.....	55
5.3.1 Caracterização da formação dos pares iônicos.....	56

5.4 Determinação do coeficiente de partição octanol/água ($\log K$) da PA base livre	59
5.4.1 Influência do pH.....	59
5.4.2 Influencia da adição de contra íons.....	60
5.5 Determinação da solubilidade da PA base livre e dos sais em diferentes solventes.....	61
5.6 Permeação e penetração cutânea <i>in vitro</i> da PA base livre e dos sais.....	62
5.6.1 Validação da extração do butirato de PA da pele.....	62
5.6.2 Permeação e penetração através da pele intacta.....	63
5.6.3 Permeação através da pele sem EC.....	64
6 CONCLUSÃO.....	70
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71

RESUMO

A paromomicina (PA), um antibiótico aminoglicosídeo hidrofílico, tem sido utilizada como alternativa para o tratamento tópico de leishmaniose cutânea (LC). Apesar de esta alternativa ter mostrado resultados promissores, não tem acelerado a recuperação em muitos casos. Isto pode ser atribuído, pelo menos em parte, à baixa penetração da PA na pele devido à sua hidrofilia. Uma alternativa para aumentar sua permeação/penetração seria a formação de um par iônico neutro, formado pela PA na forma de base livre e ácidos orgânicos, uma vez que lipofilicidade do par iônico é maior do que aquela dos íons individualmente. Neste trabalho foram sintetizados e caracterizados os sais (pares iônicos): lactato, butirato, benzoato e cinamato de PA. Avaliou-se o impacto da formação dos pares iônicos sobre o coeficiente de partição octanol/água ($\log K$), solubilidade em solventes de polaridades diferentes e permeação/penetração cutânea *in vitro* da PA. Os experimentos de permeação cutânea foram realizados utilizando pele de orelha de porco montadas em células de difusão de Franz. Dois modelos foram usados: pele intacta e sem estrato córneo (EC). A formação dos pares iônicos não foi suficiente para aumentar o $\log K$, porém promoveu aumento na solubilidade dos sais em solventes menos polares, mostrando que houve um pequeno aumento na lipofilia das moléculas, porém insuficiente para aumentar os valores de $\log K$. A permeação da PA base livre e dos pares iônicos através da pele intacta foi baixa. Entretanto, houve aumento da penetração cutânea da PA quando esta estava sob a forma de par iônico com o lactato e o benzoato. Na ausência do EC, não houve aumento da permeação dos sais em relação à PA base livre. Por outro lado comparando cada sal com a PA base livre individualmente, observa-se que a quantidade de butirato de PA e de cinamato de PA que permeou através da pele sem EC foi maior do que aquela observada para a PA base livre. Os sais que apresentaram maior permeação na pele sem EC (butirato de PA e cinamato de PA) foram aqueles cuja penetração na pele intacta foi menor. Os dados obtidos neste trabalho sugerem que a escolha do contra-íon que irá favorecer efetivamente a permeação/penetração da PA deve ser baseada no fato de o aumento da massa molecular do contra íon ser um fator limitante.

Palavras chave: Paromomicina, leishmaniose cutânea, par iônico, permeação / penetração cutânea.

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 due to its hydrophilicity. An alternative to increase its skin permeation / penetration would be the formation of a neutral ion pair, formed by PA in free base form and organic acids, since lipophilicity of the ionic pair is higher than that of ions individually. This work aimed to synthesise and characterize the following PA salts (ion pairs): lactate, butyrate, benzoate and cinnamate. The impact of the formation of ion pairs on the PA partition coefficient octanol / water ($\log K$), on the PA solubility in solvents of different polarities and on the *in vitro* skin permeation / penetration of PA, was evaluated. Permeation experiments using pig ear skin were performed in Franz diffusion cells. Two models of skin were used: intact and stripped skin. The formation of ion pairs was insufficient to increase the $\log K$, but increased the solubility of salts in less polar solvents, showing that there was an increase in lipophilicity of the molecules, but insufficient to increase the values of $\log K$. The permeation of the PA free base and ion pairs across intact skin was low. However, there was increased skin penetration when PA was in the form of ionic pair with lactate and benzoate. In the absence of the SC, there was no increase in the permeation of salts on the PA free base. Although, when the individual salt was compared with PA free base form, it is observed that the amount of PA butyrate and PA cinnamate that permeated through the stripped skin was higher. The salts that showed higher permeation on stripped skin (PA butyrate and PA cinnamate) were those whose penetration into the intact skin was lower. Data obtained in this study suggest that the choice of counter-ion that will effectively promote the permeation / penetration of the PA must be based on the fact that increasing the molecular weight of counter ion be a limiting factor.

Keywords: Paromomycin, cutaneous leishmaniasis, ion pairing, skin permeation / penetration.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CDF	célula de difusão de Franz
COSY	Correlation spectroscopy
CMB	cloreto de metilbenzetônio
D	distância entre os íons
dp	desvio padrão
DEPT	Distortionless enhancement by polarization transfer
EC	estrato córneo
e	carga do elétron
ϵ	constante dielétrica
HMBC	Heteronuclear multiple bond correlation
HMQC	Heteronuclear multiple quantum coherence
k	constante de Boltzmann's
LC	leishmaniose cutânea
LCD	Leishmaniose cutânea difusa
LM	Leishmaniose mucocutânea
log K	coeficiente de partição octanol/água
LV	leishmaniose visceral
ND	não detectado
PA	paromomicina
PAT	perda de água transepidérmica
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
T	temperatura absoluta
UFC	unidades formadoras de colônia
USP	<i>United States Pharmacopeia</i>
Z	cargas iônicas

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Atribuição dos sinais referentes aos hidrogênios da PA base livre e do sulfato de PA.	51
Tabela 2 – Massa molecular dos ácidos orgânicos e dos sais sintetizados.....	55
Tabela 3 – Estrutura molecular dos ácidos orgânicos e comparação entre os deslocamentos químicos dos sinais referentes aos hidrogênios do ácido <i>versus</i> sal	56
Tabela 4 – Determinação de $\log K$ da PA base livre, em função do pH.....	60
Tabela 5 – Determinação de $\log K$ da PA base livre e dos sais em pH igual a 6,0....	60
Tabela 6 – Determinação da solubilidade da PA base livre e seus sais em diferentes solventes.....	61
Tabela 7 – Permeação e penetração cutânea <i>in vitro</i> da PA e seus sais, a partir das soluções etanólicas, através da pele intacta.....	63
Tabela 8 – Permeação cutânea <i>in vitro</i> da PA e seus sais, a partir das soluções etanólicas, através da pele sem EC.....	65
Tabela 9 – Dados selecionados no estudo de permeação cutânea <i>in vitro</i> da PA e seus sais, através da pele sem EC, de acordo com o fragmento de orelha que apresentou menor desvio padrão.....	67

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fórmula estrutural da PA base livre – conversão da forma não ionizada à forma ionizada.....	20
Figura 2 – Representação das camadas da pele e suas estruturas.....	25
Figura 3 – Diagrama simplificado do estrato córneo e duas micro-rotas de penetração de fármacos (BARRY, 2001).....	26
Figura 4 – Representação esquemática de uma célula de difusão de Franz.....	27
Figura 5 – Representação esquemática da retirada do EC por meio da técnica do <i>tape stripping</i>	29
Figura 6 – Resina Amberlite IRA-402 (imagem ampliada).....	36
Figura 7 – Desenho esquemático do sistema de troca iônica.....	37
Figura 8 – Espectro de RMN de ¹ H da PA base livre.....	49
Figura 9 - Espectro de RMN de ¹ H do sulfato de PA.....	49
Figura 10 – Estrutura da PA usada para atribuição dos sinais referentes aos hidrogênios da PA base livre e do sulfato de PA.....	50
Figura 11 – Comparação entre os espectros de RMN de ¹ H do sulfato de PA (vermelho) e da PA base livre (azul).....	50
Figura 12 – Representação gráfica de duas curvas analíticas do sulfato de PA, obtidas por doseamento microbiológico, em dias diferentes.....	52
Figura 13 – Representação gráfica da curva padrão de sulfato de PA (média ± dp), obtida por doseamento microbiológico, na faixa de 0,2 a 3,2 µg/mL.....	53
Figura 14 – Representação gráfica de três curvas padrão de PA base livre, obtidas por doseamento microbiológico, em dias diferentes.....	53
Figura 15 – Representação gráfica da curva padrão da PA base livre (média ± dp), obtida por doseamento microbiológico, na faixa de 0,2 a 3,2 µg/mL.....	55
Figura 16 – Comparação entre os espectros de RMN de ¹ H do ácido láctico (vermelho) e do lactato de PA (azul).....	57
Figura 17 – Comparação entre os espectros de RMN de ¹ H do ácido butírico (vermelho) e do butirato de PA (azul).....	58
Figura 18 – Comparação entre os espectros de RMN de ¹ H do ácido benzóico (vermelho) e do benzoato de PA (azul).....	58

Figura 19 – Comparação entre os espectros de RMN de ^1H do ácido cinâmico (vermelho) e do cinamato de PA (azul)..... 59

1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses representam um complexo de doenças com grande diversidade clínica e epidemiológica. A doença é mais facilmente reconhecida quando se apresenta na forma cutânea, não fatal, em que causa sérias lesões, porém atualmente a forma visceral da doença é responsável por milhares de mortes.

Os compostos antimoniais pentavalentes, administrados por via parenteral, vêm sendo utilizados há sessenta anos como fármacos de primeira escolha para o tratamento das leishmanioses. Este regime apresenta reações adversas freqüentes e muitas vezes preocupantes. Além disso, as dificuldades relacionadas à aplicação de injetáveis em seguimentos populacionais de baixo nível sócio-econômico, e o acesso restrito aos serviços de saúde, constituem as principais causas de não adesão ao tratamento.

Uma tentativa inovadora para tratamento da forma cutânea da doença (leishmaniose cutânea) 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, normalmente utilizado na forma de sulfato, vem sendo o fármaco mais usado para a terapia tópica da LC. No entanto, a penetração cutânea de fármacos hidrofílicos, tais como a PA, através de pele intacta, geralmente é dificultada pela sua incapacidade de penetrar no estrato córneo (EC). Neste sentido, uma alternativa para aumentar da atividade leishmanicida da PA tópica é aumentar a sua absorção e penetração na pele. Uma possível estratégia seria a formação de um par iônico entre a PA na forma de base livre e um íon orgânico de carga oposta, uma vez que a lipofilicidade do par iônico é maior que a lipofilicidade dos íons individualmente, portanto, a penetração na pele seria aumentada.

Assim sendo, este trabalho tem como objetivo comparar a permeação cutânea *in vitro* da PA base livre com a permeação de pares iônicos contendo PA através da pele de orelha de porco, um modelo relevante para a pele humana.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Leishmanioses

As leishmanioses representam hoje um grave problema para a saúde pública. As atuais perspectivas para o controle da doença ainda estão altamente ligadas ao desenvolvimento de estratégias com melhor custo-benefício para o tratamento dos doentes e controle do vetor (DESJEUX, 2004).

Segundo a Organização Mundial de Saúde doze milhões de pessoas estão infectadas atualmente em todo o mundo e aproximadamente 350 milhões estão em situação de risco. São relatados cerca de dois milhões de novos casos de leishmaniose a cada ano, dentre os quais 50% a 75% correspondem à leishmaniose cutânea (LC). Porém estes dados podem ser ainda piores, uma vez que há uma grande diferença entre o número de casos relatados e o real número de doentes no mundo (DESJEUX, 2004; OMS, 2008).

Apesar de a leishmaniose afetar 88 países, cerca de 90% dos casos de LC ocorre 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 (OMS, 2008).

As leishmanioses são causadas por protozoários do gênero *Leishmania ssp.* Após serem inoculados na pele, pela picada da fêmea do flebotomíneo (*Phlebotomus spp.* e *Lutzomyia spp.*), estes microorganismos rapidamente se deslocam para células do sistema fagocitário mononuclear de humanos e outros mamíferos, principalmente macrófagos (BERMAN, 2003). A multiplicação das leishmanias nos macrófagos da pele causa a forma cutânea da doença (LC) enquanto a multiplicação nos macrófagos do fígado, baço e medula óssea causa a leishmaniose visceral (LV), que é grave e fatal quando não tratada (MURRAY *et al.*, 2005).

A LC pode ainda evoluir para leishmaniose mucocutânea (LM) ou para a leishmaniose cutânea difusa (LCD). A LM começa com uma úlcera evoluindo para sérias lesões com destruição drástica dos tecidos principalmente do nariz e da boca ou para a LCD que causa lesões crônicas e disseminadas na pele, de difícil tratamento (DESJEUX, 2004).

2.2 Leishmaniose cutânea

A LC é a forma mais comum da doença podendo causar lesões únicas ou múltiplas na pele. As lesões podem ser de difícil tratamento, sendo que neste caso podem acarretar deformidades e seqüelas (OMS, 2008).

Múltiplas espécies causam LC em crianças e adultos, primariamente *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).

As lesões associadas à LC se localizam, principalmente, em partes expostas do corpo, em que o vetor tem mais fácil acesso. As lesões podem ser únicas, mais comuns no Novo Mundo, ou múltiplas, encontradas no Velho Mundo. Após um período médio de incubação, que varia de uma semana a três meses, aparece uma pápula vermelha que aumenta de tamanho formando uma placa ou um nódulo. A lesão freqüentemente se desenvolve levando à formação de uma úlcera bem circunscrita com uma borda violácea. A base da úlcera é granulomatosa, apresenta crosta, e as margens são hipertróficas, porém, sem extensão determinada. Nódulos subcutâneos indolores podem se desenvolver ao redor da úlcera em decorrência da expansão linfática local do organismo (GREVELINK & LERNER, 1996).

2.3 Quimioterapia da leishmaniose cutânea

O tratamento da LC é necessário essencialmente para acelerar o tempo de cura das lesões, reduzindo o tamanho das úlceras e prevenindo sua disseminação pelo corpo e reincidência (MURRAY *et al.*, 2005).

O tratamento de primeira escolha para a LC tem sido a administração parenteral de antimoniais pentavalentes, na forma de estibogluconato de sódio (Pentostam[®]) e antimoniato de n-metilglucamina (Glucantime[®]), em uma dose diária de 20 mg/kg/dia de antimônio durante vinte dias. Entretanto, a toxicidade destes medicamentos é muito alta, sendo relatados sintomas como mal-estar, anorexia, mialgia, artralgia e sintomas abdominais como pancreatite química, cardiotoxicidade e hepatoesplenomegalia. Além disso, ultimamente, sinais de resistência aos antimoniais têm sido relatados. (MURRAY *et al.*, 2005).

A anfotericina B e a pentamidina, administradas por via parenteral, constituem os fármacos de segunda escolha. No entanto, estes fármacos também estão associados com incidência elevada de reações adversas.

Por isso, uma grande diversidade de tratamentos alternativos (sistêmicos ou tópicos) vem sendo estudada para o tratamento da LC. Uma tentativa inovadora para um problema dermatológico como a LC é um agente tópico que pode ser aplicado diretamente sobre a lesão.

Na década passada, vários estudos foram realizados na tentativa de encontrar um tratamento tópico seguro e eficaz, e o fármaco mais empregado nestes estudos foi a paromomicina (WEINRAUCH *et al.*, 1993).

2.3.1 Paromomicina

A paromomicina, um antibiótico aminoglicosídeo comumente encontrado na forma de sulfato, é um pó amorfo branco a amarelado, inodoro ou praticamente inodoro, muito higroscópico e apresenta gosto de sal. Sua solubilidade em água é alta (> 1 g/ml) e é baixa em álcool ou solventes orgânicos (< 0,1 mg/ml) (SWEETMAN, 2006). A PA vem sendo considerada um dos principais alvos de estudo para o tratamento tópico da LC. Na Figura 1 é apresentada a fórmula estrutural da PA na forma de base livre, convertida da forma não ionizada à forma ionizada.

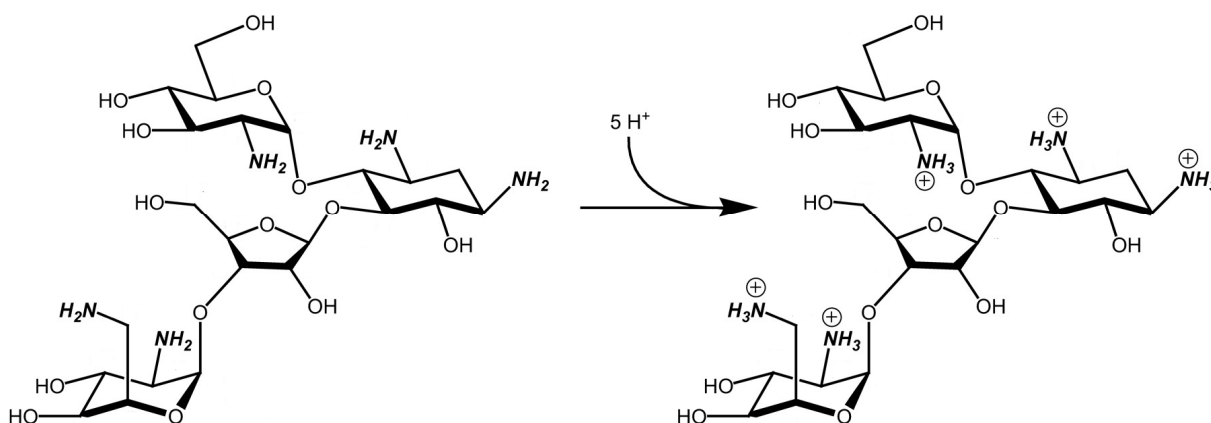


Figura 1 – Fórmula estrutural da PA base livre – conversão da forma não ionizada à forma ionizada.

2.3.1.1 Estudos *in vitro* e *in vivo* envolvendo PA

Com o objetivo de selecionar um fármaco leishmanicida a ser incorporado em uma formulação tópica, EL-ON & GRENBLATT (1983) conduziram estudos *in vitro* utilizando amastigotas de *L. (L.) major* em macrófagos peritonias de camundongos. Somente a PA, na concentração de 10 µg/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 leishmanias na forma de amastigotas, em macrófagos peritonias 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*.

Diversos estudos *in vivo*, utilizando animais experimentalmente infectados, foram realizados a fim de avaliar a atividade leishmanicida da PA. 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. major*. Somente formulações contendo PA a 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; 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) e pela gentamicina (GROGL *et al.*, 1999). Estas formulações mostraram alta taxa de cura em camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) major*.

Em outro estudo avaliou-se a eficácia de um gel hidrofílico contendo PA. A eficácia desta nova formulação foi maior do que o antimônio em camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis* (GONÇALVES *et al.*, 2005). A formulação inovadora do gel hidrofílico de PA apresentou vantagens em relação à pomada contendo a associação 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%).

2.3.1.2 Estudos clínicos envolvendo PA

EL-ON *et al.* (1986) foram os primeiros a realizar um estudo clínico para avaliar a eficácia de formulações contendo PA para o tratamento tópico de LC. Pacientes infectados por *L. (L.) major* e tratados com uma pomada contendo PA a 15% associada ao CMB a 12%, obtiveram 72% de cura (EL-ON *et al.*, 1986). A eficácia desta mesma formulação foi avaliada posteriormente em estudos clínicos, em pacientes infectados por *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) mexicana* (WEINRAUCH *et al.*, 1993). Os autores relataram 68% de cura dos pacientes. ARANA *et al.* (2001) obtiveram 91,4% de cura clínica dos pacientes, contra 39,4% de cura no grupo que recebeu o placebo. Avaliando ainda a mesma formulação, no Equador, 72% dos pacientes infectados com *L. (V.) panamensis* obtiveram cura (KRAUSE & KROEGER, 1994).

Outros dois estudos clínicos avaliaram formulações contendo 15% de PA e CMB em concentrações menores do que aquela descrita anteriormente. 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 (EL-ON *et al.*, 1985). 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 apenas PA a 15% foi realizada em pacientes infectados por *L. (L.) major*, porém, o resultado deste estudo não revelou diferenças significativas entre o grupo tratado e o placebo (EL-SAFI *et al.*, 1990). ASILIAN *et al.* (2003) também trataram pacientes com uma pomada contendo PA, a fim de comparar a eficácia clínica e parasitológica de um tratamento de duas semanas com outro 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.

Preparações tópicas contendo PA associada à uréia foram avaliadas em estudos clínicos. 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 SALAH *et al.* (1995). 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). 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).

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 *et al.*, 2003; IRAJI *et al.*, 2005).

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

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 de 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. Por outro lado, essas substâncias têm sido incorporadas em bases hidrofóbicas, as quais limitam a permeação cutânea de PA, sobretudo através da pele lesionada (CASTRO *et al.*, 2003).

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.

Uma alternativa interessante para o aumento da eficácia do tratamento tópico da LC usando formulações contendo PA seria facilitar sua absorção através da pele.

2.3.1.3 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 (CASTRO *et al.*, 2003; FERREIRA *et al.*, 2004). 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. O uso de pele humana em estudos de permeação *in vitro* apresenta limitações inerentes às dificuldades de obtenção. A pele suína é uma alternativa interessante, uma vez que este modelo tem sido considerado relevante para a pele humana (WALKER *et al.*, 1997; JACOBI *et al.*, 2007).

Por outro lado, nossos dados prévios mostraram que a permeação da PA, através da pele de porco sem EC, foi baixa indicando que mesmo na ausência da principal barreira à penetração sua difusão foi lenta. A incorporação da PA em lipossomas aumentou consideravelmente sua permeação, o que sugere que os dados observados quando a PA foi aplicada na forma livre podem atribuídos ao seu caráter fortemente hidrofílico (CARNEIRO, 2007).

2.4 Pele

A pele humana é uma barreira eficaz e seletiva para a permeação de agentes químicos. Sendo assim, a eficácia de fármacos de uso tópicos é freqüentemente limitada devido à baixa penetração destes fármacos na pele (MOSER *et al.*, 2001).

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 2).

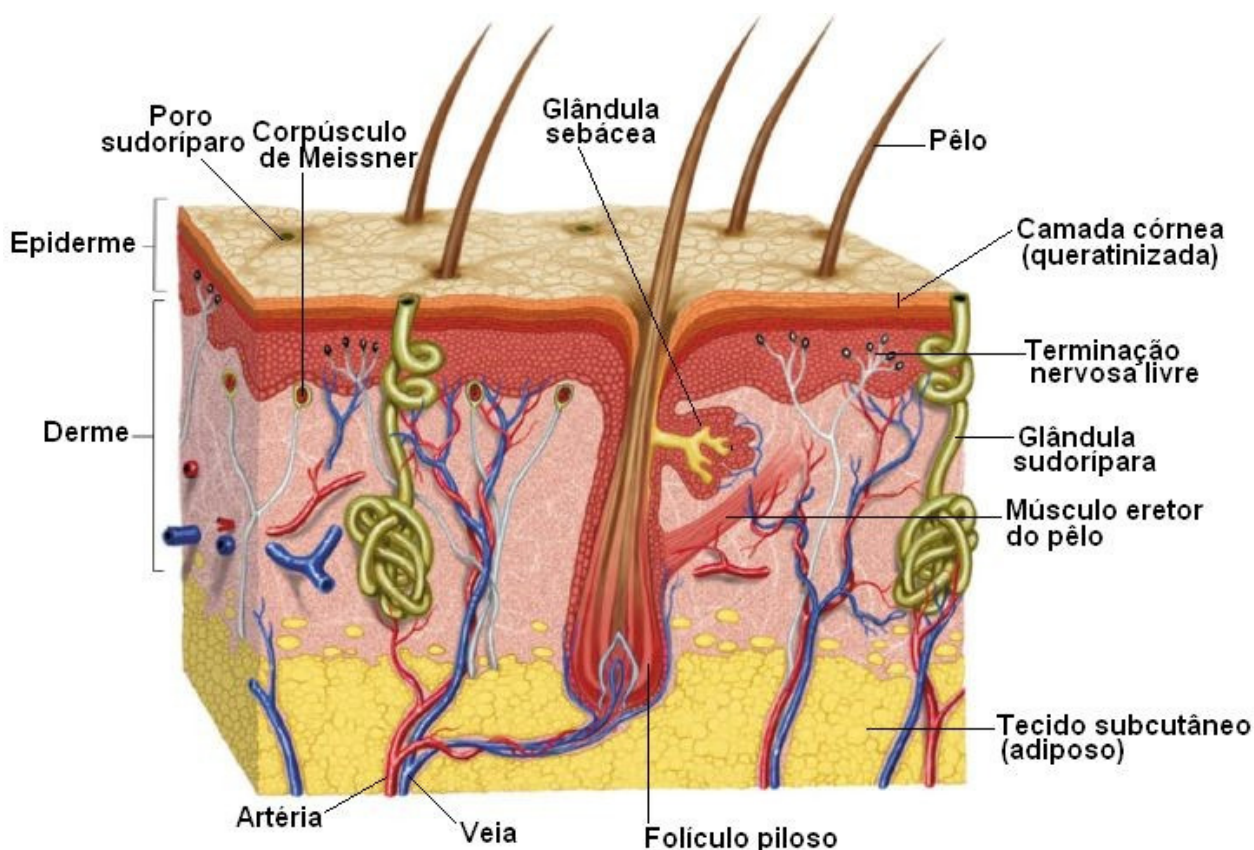


Figura 2 – Representação das camadas da pele e suas estruturas.

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 μm de espessura, e é composto por células funcionalmente mortas e queratinizadas, denominadas corneócitos.

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 permeação de substâncias através da pele

Há três vias potenciais de penetração de moléculas na pele: através dos folículos pilosos associados às glândulas sebáceas; através das glândulas sudoríparas; ou através do EC entre esses apêndices (Figura 3) (BARRY, 2001). Porém, esses apêndices ocupam apenas 0,1% da superfície total da pele e a contribuição dessa via de permeação é normalmente considerada pequena (MOSER *et al.*, 2001).

Neste sentido, a via transepidérmica (através do EC), é considerada a mais importante. Há duas vias possíveis rotas de permeação através do EC intacto: a rota lipídica intercelular que ocorre entre os corneócitos, e a rota transcelular que ocorre através dos corneócitos e lipídeos (Figura 3) (MOSER *et al.*, 2001).

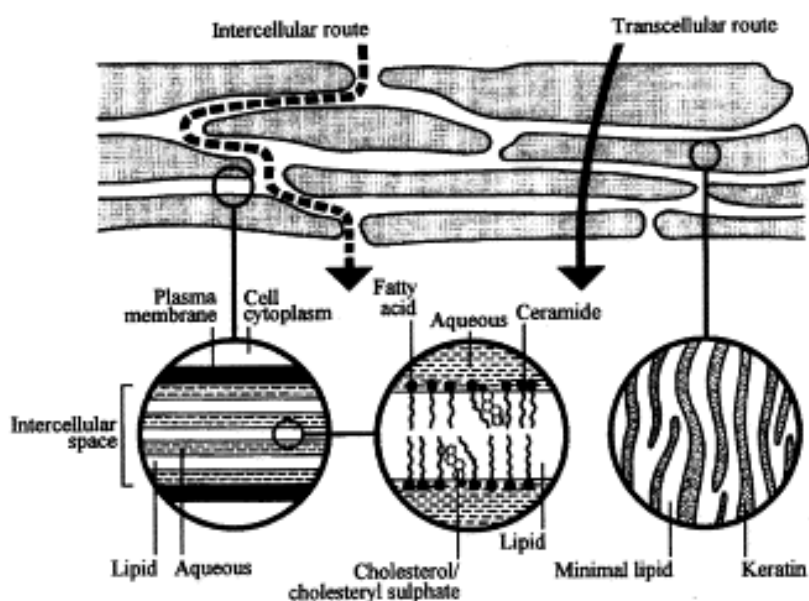


Figura 3 – Diagrama simplificado do estrato córneo e duas micro-rotas de penetração de fármacos (BARRY, 2001).

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 4).

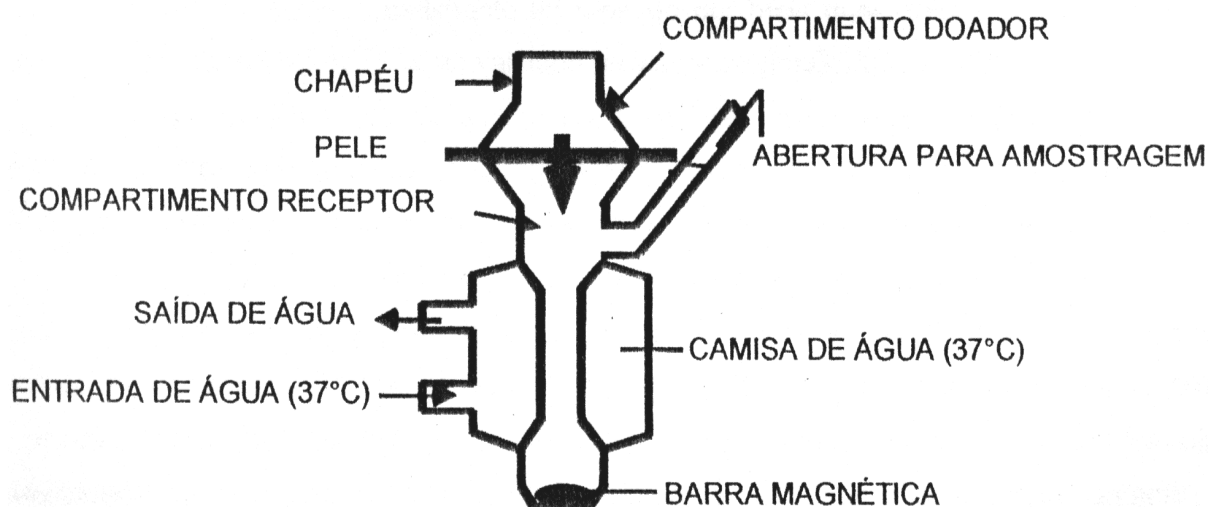


Figura 4 – Representação esquemática de uma célula de difusão de Franz.

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 (WALKER *et al.*, 1997; SIMON & MAIBACH, 2000).

A pele de porco apresenta similaridades fisiológicas e histológicas em relação à pele humana como: 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 (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, como por exemplo, a LC em que há desenvolvimento 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. No tratamento da LC, 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.

2.4.3.1 Método de remoção do EC

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 (tape) firmemente aderida ao fragmento de pele (Figura 5).

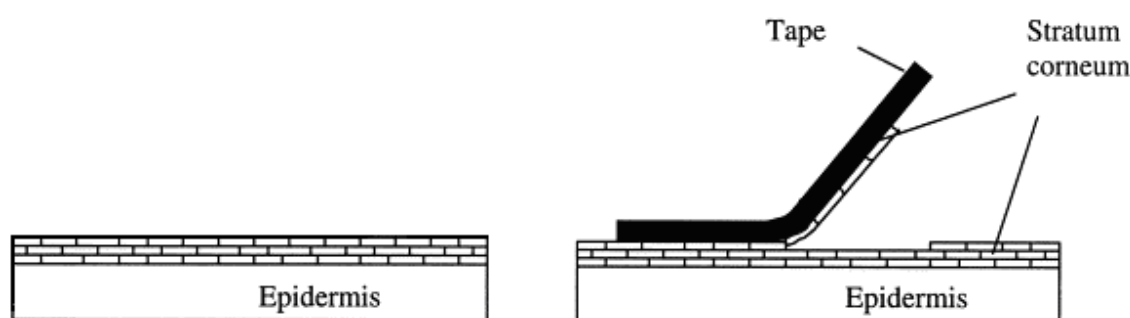


Figura 5 – Representação esquemática da retirada do EC por meio da técnica do *tape stripping*.

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 transepidérmica (PAT).

2.5 Estratégias de aumento da permeação cutânea de fármacos

As principais propriedades dos fármacos que influenciam sua absorção, distribuição e transporte através de sistemas biológicos são a massa molecular, solubilidade, lipofilicidade, estabilidade e caráter ácido-básico. Para que fármacos possam permear através da pele, uma avaliação preliminar destas propriedades é importante.

A penetração através do EC é favorável a moléculas lipofílicas de baixo peso molecular, enquanto moléculas polares e eletricamente carregadas apresentam baixo potencial para penetrar na ou através da pele (SARVEIYA *et al.*, 2005). Assim, a penetração cutânea de fármacos hidrofílicos, tais como a PA, é dificultada pela sua incapacidade de penetrar no EC.

Em geral, os fármacos apresentam propriedades desfavoráveis à penetração cutânea, e, portanto, a eficácia de formulações tópicas é geralmente limitada. Diversas alternativas vêm sendo estudadas para que fármacos possam penetrar efetivamente na pele, entre elas o uso de pró-fármacos, de lipossomas e microemulsões, além do desenvolvimento de estratégias físicas tais como iontoforese e o emprego de substâncias capazes de modificar o EC (BARRY, 2001; MOSER *et al.*, 2001). Uma estratégia interessante para o aumento da penetração e permeação de fármacos na pele é o uso de um pró-fármaco lipofílico ou a formação de um par iônico.

2.5.1 Formação do par iônico

Preconiza-se o uso de fármacos na forma de sal, ao invés da forma não ionizada devido a algumas vantagens como melhora da solubilidade e assim da velocidade de difusão (NEUBERT, 1989). Porém, quando o sal é formado por um cátion e um ânion orgânicos, pode apresentar certo grau de hidrofobicidade residual apesar de seu caráter iônico. Estes sais se comportam como pares iônicos e podem ser transportados através de membranas hidrofóbicas (FINI *et al.*, 1999; VALENTA *et al.*, 2000).

O par iônico é definido como uma espécie neutra, formada por íons de cargas opostas e que freqüentemente é capaz de se dissolver em solventes não aquosos. Os íons são ligados por interações eletrostáticas e não pela formação de ligações covalentes. A notação A^+ , B^- é geralmente usada para descrever o par iônico que existe como uma espécie estável e termodinamicamente diferente dos íons isoladamente (QUINTANAR-GUERRERO *et al.*, 1997). Experimentalmente, o par iônico se comporta como uma unidade na determinação da condutividade, cinética, propriedades osmóticas e etc.

O par iônico se apresenta como uma molécula cuja lipofilicidade é maior do que aquela dos íons individualmente. Portanto, a formação do par iônico aumenta a

sua permeabilidade na pele (QUINTANAR-GUERRERO *et al.*, 1997; SARVEIYA *et al.*, 2005). Além disso, a capacidade do par iônico influenciar a permeação cutânea de fármacos está intimamente ligada às propriedades físico-químicas de ambos, fármaco e contra-íon.

O contra-íon, para ser adequado ao transporte através de membranas biológicas como a pele, deve apresentar propriedades como alta lipofilia, solubilidade adequada, compatibilidade fisiológica e estabilidade metabólica (NEUBERT, 1989).

O tamanho do par iônico é um fator que interfere de forma direta na sua permeação cutânea. Contra-íons de grande massa molecular contribuem significativamente para o aumento do tamanho do par iônico, podendo diminuir sua permeação através da pele (NEUBERT, 1989). Apesar disso, o aumento da cadeia carbônica dos contra-íons contribui para o aumento de sua lipofilicidade e, conseqüentemente, para a lipofilicidade do par iônico.

A determinação do coeficiente de partição octanol/água ($\log K$) vem sendo amplamente usada como medida da lipofilicidade de fármacos. GREEN & HADGRAFT (1987) usaram $\log K$ como parâmetro para avaliar o aumento da lipofilicidade de pares iônicos formados entre diferentes β -bloqueadores e ácidos orgânicos. O valor de $\log K$ para o par iônico formado entre o metoprolol e ácido láurico foi 45 vezes maior que aquele para o metoprolol na forma de base. Em outro estudo, comparou-se o $\log K$ do ácido salicílico com aqueles de pares iônicos formados com várias aminas. Um aumento de 41 vezes no $\log K$ do par iônico contendo dodecilamina foi observado (MEGWA *et al.*, 2000). SARVEIYA *et al.* (2005) compararam os valores de $\log K$ de pares iônicos entre benzidamina e ácidos orgânicos, encontrando um aumento de seis vezes no $\log K$ do par iônico envolvendo benzidamina e ibuprofeno.

O aumento de $\log K$ se deve ao aumento da lipofilicidade do fármaco devido à formação do par iônico. GREEN & HADGRAFT (1987) tentaram promover o aumento $\log K$ do atenolol (um fármaco β -bloqueador bastante hidrofílico) através da formação de par iônico com ácidos orgânicos. Porém, mesmo na presença de contra íons lipofílicos, isto é, na forma de um par iônico, não houve aumento de $\log K$, devido à solvatação destas moléculas na fase aquosa. Para que moléculas passem da fase aquosa para a fase orgânica, estas devem superar a energia de hidratação e devem ser estabilizadas na fase orgânica. Neste mesmo estudo o

maior aumento de log K obtido com a formação de par iônico, foi obtido para β -bloqueadores com características de partição intermediárias (metoprolol e oxprenolol) (HADGRAFT & GREEN, 1987).

Em 1926, Bjerrum introduziu o conceito de par iônico e mostrou que, a sua formação só é possível se os íons se aproximarem e atingirem uma distância crítica de separação (D). A equação de Bjerrum diz que:

$$D = |Z^+ Z^-| e^2 / 2\epsilon kT$$

Onde $Z^+ Z^-$ são as cargas iônicas, e é a carga do elétron, ϵ é a constante dielétrica, k é a constante de Boltzmann's e T é a temperatura absoluta. Segundo esta equação, solventes com baixa constante dielétrica favorecem a formação do par iônico. Solventes como a água, que possui alta constante dielétrica ($\epsilon = 78,5$), desfavorecem, mas não impossibilitam a formação do par iônico. Lee *et al.* (1987) mostraram que a constante de formação de pares iônicos usando diclofenaco de sódio foi igual a zero em água, enquanto que, em etanol e i-propanol, esta foi igual a 1115 e 2969, respectivamente.

O EC apresenta baixa constante dielétrica e, portanto é possível inferir que o par iônico atravesse o EC sem se dissociar e que a separação só ocorra provavelmente, quando o par iônico alcance uma região da pele com alta constante dielétrica (KAMAL *et al.*, 2006).

Estudos anteriormente realizados mostraram que o par iônico pode existir sob duas formas: coesa ou fluida. A primeira consiste em íons fortemente ligados entre si. Já a forma fluida representa íons livres, separados e solvatados pelo solvente. A forma fluida apresenta menor estabilidade, o que pode resultar em pares iônicos que só existem em determinado solvente e que se dissociam consideravelmente. Este tipo de par iônico apresenta instabilidade frente a interfaces e por isso apresentam menor capacidade de penetrar em membranas (QUINTANAR-GUERRERO *et al.*, 1997).

2.5.2 Estudos envolvendo o par iônico como estratégia de aumento da lipofilia de fármacos

A formação de um par iônico tem sido descrita como estratégia para aumentar a lipofilia de fármacos o que pode favorecer a sua permeação cutânea (MEGWA *et al.*, 2000b; BARRY *et al.*, 2001; SARVEIYA *et al.*, 2005; KAMAL *et al.*, 2006).

VALENTA *et al.* (2000) demonstraram um aumento de 2,5 vezes na difusão de lignocaína através de uma membrana de silicone (polidimetilsiloxano – PDMS), através da formação de um par iônico com contra íons ácidos. Em diversos trabalhos a membrana de PDMS é usada como um modelo de EC (VALENTA *et al.*, 2000; SARVEIYA *et al.*, 2004; SARVEIYA *et al.*, 2005).

Foi realizado um estudo em que se demonstrou que o par iônico formado entre ibuprofeno e trietilamina, penetrou 16 vezes mais em membrana de PMDS que o ibuprofeno de sódio. As interações intermoleculares entre o fármaco e o contra íon foram confirmadas por ressonância magnética nuclear (RMN), evidenciando a formação do par iônico (SARVEIYA *et al.*, 2004).

Em outro estudo, SARVEIYA *et al.* (2005) confirmaram por RMN a formação de pares iônicos contendo benzidamina e contra-íons ácidos. Foram comparados os coeficientes de partição octanol/água do cloridrato de benzidamina e dos pares iônicos. Também foi comparada a difusão em membrana de PDMS dos pares iônicos e do cloridrato de benzidamina. Observou-se um aumento de 7,3 e 6,3 vezes no coeficiente de partição e de 144 e 129 vezes na difusão em membrana de PDMS, para o ibuprofenato de benzidamina e o benzoato de benzidamina, respectivamente.

Foi realizado um estudo em que se mostrou que aminas secundárias, terciárias e quaternárias aumentaram a permeação *in vitro* de salicilato na pele humana, sendo que o maior aumento foi observado com a trietilamina, uma amina terciária. A permeação de pares iônicos formados entre o ácido salicílico e alquilaminas em pele humana, foi comparada à permeação do salicilato isoladamente. Houve um aumento de até 4,8 vezes na permeação do par iônico (contendo tridodecilamina, uma amina terciária), em relação à permeação do fármaco isolado. Além disso, as mudanças no fluxo através da pele humana devido à formação dos pares iônicos foram relacionadas às propriedades físico-químicas dos contra-íons usados. Os resultados destes estudos mostraram que a formação do par iônico como estratégia de aumento da permeação de fármacos depende fortemente das propriedades físico-químicas (massa molecular, tamanho da cadeia carbônica e lipofilia – expressa pelo log K) de ambos, fármaco e contra-íon (MEGWA *et al.*, 2000b).

Assim sendo, este trabalho tem por objetivo investigar a influência da formação de um par iônico entre a PA na forma de base livre e diversos ácidos de lipofilicidade variável (ácido láctico – C₃; ácido butírico – C₄; ácido benzóico – C₇ e

ácido cinâmico – C₉) sobre a permeação e penetração cutânea *in vitro* da PA. Considerando que na LC as formulações podem ser aplicadas tanto na pele com EC (lesões nodulares que não formam uma úlcera), quanto na pele ulcerada, na qual a principal barreira (EC) foi pedida, os estudos de permeação serão conduzidos com dois modelos *in vitro*: pele intacta com EC e pele sem EC.

Espera-se que o aumento da lipofilicidade da PA quando na forma de par iônico possa contribuir para aumento do seu transporte tópico aumentando a sua penetração cutânea. Por outro lado, a PA base livre tem um pKa igual a 8,0 e, portanto, em condições fisiológicas (pH da pele é cerca de 5) este fármaco está na forma protonada, o que limita sua permeação através da pele. Desta maneira, a formação do par iônico neutralizaria sua carga contribuindo assim para aumento da permeação/penetração.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a influência da formação de um par iônico entre PA na forma de base livre e diversos ácidos orgânicos sobre a permeação cutânea *in vitro* deste antibiótico.

3.2 Objetivos específicos

- Obtenção da PA base livre a partir do sulfato de PA por processo de troca iônica.
- Caracterização da PA base livre por testes físico-químicos, doseamento microbiológico e por ressonância magnética nuclear (RMN).
- Síntese de sais (pares iônicos) a partir da PA base livre e ácidos orgânicos.
- Caracterização da formação dos pares iônicos por RMN.
- Determinação de $\log K$ da PA base livre em função do pH.
- Determinação de $\log K$ de pares iônicos (sais) formados pela PA base livre e ácidos orgânicos, em pH fixo.
- Determinação da solubilidade da PA base livre e dos sais em solventes com polaridades diferentes.
- Avaliação da permeação cutânea *in vitro*, na pele intacta e na pele sem EC, da PA base livre e dos pares iônicos a partir de soluções etanólicas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais

O sulfato de paromomicina foi obtido da Antibióticos (Milão, Itália), na potência 757 mg/g. O padrão usado foi o sulfato de paromomicina, potência 730 mg/g (Padrão USP). O ácido cinâmico foi obtido por síntese a partir do benzaldeído. Todos os ácidos foram analisados por RMN e os espectros comprovam suas estruturas e purezas. Todos os demais reagentes e solventes usados tinham 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).

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 (KH_2PO_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 (K_2HPO_4), 0,523 g de fosfato monobásico de potássio (KH_2PO_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 8,0 com HCl 1 mol/L ou NaOH 1 mol/L conforme a necessidade.

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

4.1 Obtenção da PA na forma de base livre

A PA base livre foi obtida a partir do sulfato de PA, usando uma resina aniônica Amberlite IRA 402 (OH) (Figura 6), conforme descrito previamente por BARBIERI & PILCH, 2006. Estes autores usaram uma resina Amberlite IRA-400 na forma OH que é muito semelhante à resina Amberlite IRA-402, e a substituição de uma pela outra não acarreta mudanças no produto final, após a troca iônica.



Figura 6 – Resina Amberlite IRA-402 (imagem ampliada)

Em um béquer de 100 mL, mediu-se 70 mL de uma resina Amberlite IRA-402. Foi adicionada água destilada ao béquer em quantidade suficiente para cobrir a resina, aguardou-se sua decantação e quando necessário o volume da resina foi corrigido. Descartou-se a água, inclusive o sobrenadante contendo partículas suspensas, e repetiu-se esse procedimento cinco vezes, sendo que na última vez não se descartou a água.

Transferiu-se a resina juntamente com a água para uma coluna de vidro de 2,5 cm de diâmetro e 30 cm de comprimento, e lavou-se com 50 ml de água, deixando-se sempre um volume morto na coluna (aproximadamente 0,5 cm) (Figura 7).

Transferiu-se 1,0 ml de uma solução 0,5 M de sulfato de PA para a coluna. A PA foi eluída com 300 mL de água num fluxo aproximado de 1,0 mL/min. Foram coletadas 10 frações de 30 mL, sendo que a primeira foi descartada. Mediu-se o pH das frações com o objetivo de se verificar a ocorrência da troca iônica ($\text{pH} > 9,0$). As frações foram congeladas e liofilizadas (Liofilizador EC – Modulyo) por 72

horas. As frações foram reunidas, dessecadas em estufa a vácuo retilínea (FANEM, Brasil) a 60 °C durante 3 horas e armazenadas em dessecador a vácuo, ao abrigo da luz.

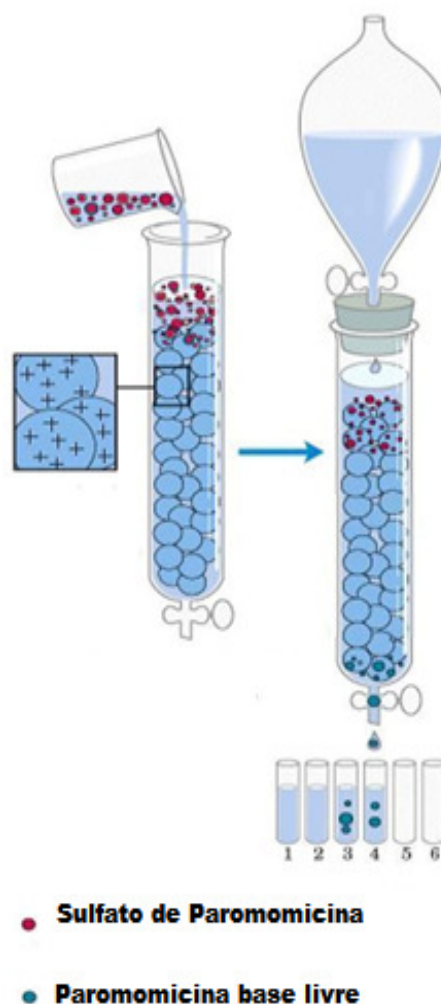


Figura 7 – Desenho esquemático do sistema de troca iônica.

4.2 Ensaio microbiológico para doseamento da PA

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 execução do ensaio, o *B. subtilis* (ATCC 6633) foi repicado na superfície inclinada do meio antibiótico n° 1 e incubado a $36 \pm 0,5$ °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. Nos cilindros adicionou-se 200 µL da amostra de maneira alternada em três dos seis cilindros utilizando pipeta automática (Gilson, França). Nos outros três cilindros adicionou-se 200 µL de solução padrão de PA na concentração de 0,8 µg/mL (P3) denominada de referência. 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 $36 \pm 0,5^\circ\text{C}$ (Forma Scientific Inc., USA) por um período de 18 horas. A leitura do diâmetro dos halos de inibição foi realizada utilizando paquímetro digital (Mitutoyo, Brasil).

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 de PA nas amostras foram calculadas por interpolação na curva padrão correspondente (PA base livre ou PA sulfato).

4.3 Caracterização da PA base livre

4.3.1 Teste de identificação de sulfato

As alíquotas de PA base livre obtidas após troca iônica foram submetidas ao teste de identificação de sulfato conforme descrito na Farmacopéia Americana – USP 31 (THE UNITED..., 2008). Segundo esse teste de identificação, a adição de cloreto de bário às soluções contendo sulfato, forma um precipitado branco que é insolúvel em ácido clorídrico e ácido nítrico. A PA na forma de base livre não contém sulfato, portanto após troca iônica, os resultados desse teste devem ser negativos. O mesmo teste foi realizado com a PA sulfato para que os resultados (positivo e negativo) pudessem ser comparados.

4.3.2 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A obtenção da PA base livre foi confirmada com base nas análises dos espectros de RMN de ^1H , de ^{13}C , DEPT135 e dos mapas de contornos COSY, HMQC e HMBC e por comparação com os espectros correspondentes do sulfato de PA. Os espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C foram registrados no espectrômetro *Bruker Avance DRX400* (Depto. de Química - ICEX - UFMG), utilizando-se água deuterada (D_2O) como solvente, sendo o próprio solvente deuterado empregado como padrão interno. Os valores de deslocamento químico foram descritos em ppm.

4.3.3 Atividade da PA após processo de troca iônica

Durante o processo de troca iônica, usado para a conversão do sulfato de PA em PA base livre, a amostra foi submetida a algumas condições de estresse (meio fortemente alcalino, exposição à luz e o processo de congelamento), o que poderia causar uma diminuição da atividade da PA. A manutenção da atividade da PA, após o processo de troca iônica, foi avaliada pela comparação estatística entre três curvas analíticas obtidas a partir da PA base livre, e uma curva padrão, obtida a partir do sulfato de PA (Padrão USP).

A metodologia utilizada para determinação da atividade de PA foi o ensaio de difusão em ágar, baseado na Farmacopéia Americana – USP 24 (THE UNITED..., 2000) e modificado por FERREIRA *et al.*, 2004.

4.3.3.1 Obtenção da curva padrão do sulfato de PA

A curva padrão do sulfato de PA foi traçada a partir da média dos pontos de duas curvas analíticas, realizadas em dias diferentes.

Para a obtenção das duas curvas analíticas pesou-se 0,0343 g de sulfato de PA (quantidade de Padrão UPS correspondente a 0,025 g de PA base livre) (balança analítica Sartorius BP221S, Alemanha). A PA foi previamente dessecada em estufa retilínea a vácuo (FANEM, Brasil), a 60°C durante 3 horas e transferida quantitativamente para um balão volumétrico âmbar de 25 mL completando-se o volume com tampão fosfato pH 8,0.

Obteve-se assim, uma solução estoque correspondente a 1000 µg/mL de PA base livre, que pode ser mantida em refrigerador por 21 dias sem alteração da sua atividade (THE UNITED..., 2000). 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. 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.

Em cada cilindro, foram adicionados 200 µL da solução de antibiótico, utilizando pipeta automática (Gilson, França). Foram preparadas placas em triplicatas para as concentrações de 0,2; 0,4; 1,6 e 3,2 µg/mL de PA. A concentração de 0,8 µg/mL (P3) foi utilizada como referência em três dos seis cilindros de cada placa.

Foi realizada análise estatística para verificar se as curvas analíticas obtidas a partir da PA sulfato poderiam ser reunidas em uma única curva padrão. A análise estatística realizada incluiu os seguintes testes: o teste de significância da regressão de ambas as curvas e a comparação estatística entre elas. Após a comprovação estatística da possibilidade de reunir os dados em uma só curva-padrão para o sulfato de PA, esta foi traçada com os valores dos diâmetros médios 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. Foi realizada uma análise estatística utilizando análise de variância da regressão para $p \leq 0,05$, que incluiu o teste de significância da regressão, do intercepto e da inclinação da reta comum.

4.3.3.2 Obtenção da curva analítica da PA base livre

Foram obtidas três curvas analíticas para PA base livre, em dias diferentes. Para isso, pesou-se 0,025 g de PA base livre (balança analítica Sartorius BP221S, Alemanha), previamente dessecada em estufa retilínea a vácuo (FANEM, Brasil), a 60°C durante 3 horas, e procedeu-se de forma idêntica àquela usada para o preparo das curvas analíticas do sulfato de PA, conforme descrito anteriormente. Estas curvas foram comparadas estatisticamente, uma a uma, com a curva padrão do sulfato de PA.

Para verificar se as três curvas analíticas obtidas para PA base livre poderiam ser reunidas em uma única curva padrão, a ser utilizada para as interpolações em doseamentos posteriores, foi realizada uma análise estatística, que incluiu os seguintes testes: o teste de significância da regressão das três curvas e a comparação estatística entre as elas. Após a comprovação estatística da possibilidade de se traçar uma curva padrão para PA base livre, esta foi traçada a partir da média dos pontos de três curvas analíticas. Foi realizada análise estatística da curva padrão da PA base livre, que incluiu o teste de significância da regressão, do intercepto e da inclinação da reta comum.

4.4 Síntese dos sais de PA

Quantidades estequiométricas de PA base livre e cada um dos ácidos orgânicos (ácido láctico, ácido butírico, ácido benzóico e ácido cinâmico) foram dissolvidas em metanol e submetidas à agitação magnética por 16 horas à temperatura de 25° C. Evaporou-se o solvente usando um rotavapor. Foram sintetizados os seguintes sais: lactato de paromomicina (lactato de PA), butirato de paromomicina (butirato de PA), benzoato de paromomicina (benzoato de PA) e cinamato de paromomicina (cinamato de PA).

4.5 Caracterização da formação dos pares iônicos

A caracterização inequívoca da formação dos pares iônicos entre a PA e os ácidos orgânicos foi realizada com base na análise e comparação dos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C do par iônico e seus respectivos ácidos livres. A diferença entre deslocamentos químicos dos sinais referentes aos hidrogênios e carbonos vizinhos ao grupamento carboxilato dos sais, e os sinais correspondentes no espectro dos ácidos orgânicos, serviu como evidência da formação dos pares iônicos.

Os espectros foram registrados no espectrômetro *Bruker Avance DRX400* (Depto. de Química - ICEX - UFMG), utilizando-se metanol deuterado (MeOD) como solvente. O próprio solvente deuterado foi empregado como padrão interno. Os valores de deslocamento químico foram descritos em ppm.

4.6 Determinação do coeficiente de partição octanol/água ($\log K$) da PA

Para a determinação de $\log K$ alguns fatores são muito importantes como a pré-saturação de ambas as fases orgânica e aquosa, a separação completa das fases após agitação e o uso de amostras em concentração abaixo da concentração micelar crítica (POOLE^a & POOLE^b, 2003).

4.6.1 Influência do pH

O coeficiente de partição foi avaliado entre *n*-octanol e tampão fosfato 0,05 M em diferentes valores de pH (5,0; 6,0; 7,0 e 8,5). O pH final do tampão fosfato 0,05M foi ajustado com adição de solução NaOH 0,1M em quantidade suficiente para obtenção dos diferentes valores. As fases aquosa e orgânica foram pré-saturadas, uma com a outra, por 24 horas, a 25 °C.

Pesou-se 50 mg da PA base livre, transferiu-se para balão volumétrico de 5 mL e completou-se o volume com água destilada. Obteve-se assim uma solução estoque de PA na concentração de 10 mg/mL. Transferiu-se 1,0 mL da solução estoque para balão volumétrico de 10 mL, completou-se o volume com tampão fosfato e ajustou-se o pH para o valor desejado, obtendo-se uma solução de concentração aproximadamente igual de 1,0 mg/mL. Retirou-se uma alíquota desta solução para posteriormente determinar-se a concentração inicial de PA. Adicionou-

se 9 ml de *n*-octanol à 9 ml da solução de PA e deixou-se sob agitação magnética contínua (agitador magnético IKA, Labortechnik, Alemanha) por 24 horas, a 25 °C. Em seguida, as fases foram separadas em centrífuga HIMAC CF-7D2 (Hitachi, Japão) por 5 minutos a 2800 rpm. As concentrações de PA no tampão, antes e após partição, foram determinadas por ensaio microbiológico conforme descrito anteriormente. Considerando que a concentração inicial de PA (antes da partição) é conhecida, a concentração de PA no octanol pode ser determinada por diferença.

4.6.2 Influência da adição de contra-íons – formação do par iônico

Foi avaliado o *log K* dos pares iônicos formados pela PA base livre e os ácidos orgânicos: ácido butírico, ácido benzóico e ácido láurico. O *log K* foi avaliado entre *n*-octanol e tampão fosfato 0,05 M em pH igual a 6,0. Neste valor de pH, a proporção de PA na forma não ionizada é muito pequena e sua contribuição pode ser considerada insignificante. As fases aquosa e orgânica foram pré-saturadas, uma com a outra, por 24 horas, a 25°C. A PA base livre e os ácidos orgânicos foram usados em proporção estequiométrica (razão molar igual a 1:5). A PA base livre e os ácidos hidrossolúveis (ácido butírico e ácido benzóico) foram adicionados ao tampão fosfato 0,05 M, enquanto o ácido láurico foi adicionado ao octanol. O coeficiente de partição dos pares iônicos foi determinado conforme descrito anteriormente.

4.7 Determinação da solubilidade da PA e seus sais em diferentes solventes

A solubilidade do sulfato de PA, da PA base livre e dos sais de PA, em três solventes com polaridades distintas (água, metanol e etanol), foi determinada e comparada a fim de avaliar a influência da formação do par iônico na lipofilicidade dos sais.

Foram pesadas quantidades de PA (base livre, sulfato e sais) suficientes para saturar o solvente e submeteu-se a mistura a agitação magnética por 24 horas, à temperatura de 25°C. Centrifugou-se a mistura, e com auxílio de uma seringa, retirou-se quantidade adequada do sobrenadante límpido. O sobrenadante foi em seguida filtrado (filtro de 0,45 µm; Millipore) e a concentração da PA foi determinada por ensaio microbiológico. A partir da concentração de PA, calcularam-se as

solubilidades de cada um dos sais, as quais foram expressas em função dos diferentes solventes usados.

4.8 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 6,7cm³ e área de superfície da membrana de 1,77cm². Para este estudo foram utilizadas peles de orelha de porco, com três a seis meses, sacrificados em abatedouro. Foram usadas amostras de pele intacta e pele sem EC.

4.8.1 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 tricotizador 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°C por no máximo quatro semanas. Uma hora antes de serem montados nas células de difusão de Franz, os fragmentos foram mantidos à temperatura ambiente. Os estudos de permeação foram conduzidos com pele intacta e pele sem EC. Os fragmentos com pele intacta foram obtidos conforme descrito acima, enquanto que aqueles sem EC foram obtidos conforme descrito abaixo.

4.8.1.1 Retirada do estrato córneo

O EC foi removido por meio de desgaste realizado com fita adesiva (Scotch 845 Book Tape 2" x 540; 3M, EUA) no dia do experimento. Esta fita foi aderida ao lado epidérmico do fragmento de pele, com o auxílio de um cilindro que realiza uma pressão de 140 g/cm², sendo posteriormente retirada (*tape stripping*). O *stripping* foi

realizado por 25 vezes para a remoção completa do EC. A validação da remoção completa do EC foi confirmada em um estudo anterior por meio de análises histológicas e medidas da perda de água transepidérmica (PAT) (CARNEIRO, 2007)

4.8.2 Montagem das células de Franz

Os fragmentos de pele (intacta ou sem EC), 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 três 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.

4.8.3 Preparo e aplicação das formulações (soluções)

Para avaliação da permeação dos sais de PA foram preparadas soluções na concentração de 1% (p/p), usando os sais de PA previamente sintetizados e etanol como solvente. Não foi possível preparar uma solução da PA base livre em etanol devido à sua baixa solubilidade neste solvente. Assim sendo, a solução de PA base livre foi preparada usando-se uma solução de etanol/água (80:20). A concentração de PA base livre e dos sais de PA nas soluções foi confirmada por ensaio microbiológico.

Os experimentos foram conduzidos em dose finita, a qual imita as condições normais de aplicação. Nesses experimentos, o compartimento doador será 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 soluções foram aplicadas sobre as peles com pipetador automático (Gilson, França) de forma a permitir o espalhamento homogêneo da solução sobre a pele.

4.8.4 Determinação da difusão

As amostras foram coletadas 8 horas após a aplicação das soluções por meio da remoção total do fluido receptor. A coleta somente após 8 horas se justifica uma vez que a concentração da PA a intervalos de tempo inferiores foi abaixo do limite de detecção. A concentração de PA no líquido receptor foi determinada por ensaio microbiológico. Nos experimentos utilizando pele intacta procedeu-se a extração da PA que penetrou na pele, conforme descrito em 4.8.4.1 e 4.8.4.2..

4.8.4.1 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. Este procedimento foi validado previamente por FERREIRA *et al.*, 2004.

4.8.4.2 Extração da PA na pele

Este procedimento foi previamente validado por FERREIRA *et al.* (2004) para o sulfato de PA. Após a limpeza, descrita em 4.8.4.1, 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°C por 12 horas. Após este período, os fragmentos foram gradualmente descongelados e 5 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.

A extração da PA base livre e dos sais PA na pele foi realizada conforme descrito para o sulfato de PA. Porém, devido às diferenças de solubilidade entre os

sais e o sulfato de PA, foi realizada a validação da extração de um dos sais (butirato de PA) conforme descrito em 4.8.4.2.1.

4.8.4.2.1 Validação da extração do butirato de PA da pele

Para a validação da extração do butirato de da pele, foi preparada uma solução na concentração de a 1,0 mg/mL utilizando tampão fosfato pH 8,0 como diluente. Foram montadas três células de Franz utilizando pele intacta, conforme descrito em 4.8.2. Em cada célula foram aplicados 50 μ L de cada solução. Após aproximadamente 3 horas (tempo necessário para evaporação do solvente e penetração da PA na pele), 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°C por 12 horas. Em seguida, procedeu-se conforme descrito em 4.8.4.2.

4.8.5 Análise estatística

A comparação entre as médias dos experimentos de permeação cutânea na pele intacta foi realizada pela análise de variância (ANOVA). As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas ao nível $p < 0,05$. Foi realizado pós teste de Tukey.

A comparação entre as médias dos valores de permeação cutânea na pele sem EC foi realizada pelo teste t. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas ao nível $p < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Obtenção da paromomicina na forma de base livre

Ao longo do procedimento de troca iônica, o pH das frações eluídas foi aferido, e em todas elas, seu valor foi maior que 9, confirmando o predomínio de íons OH^- na solução. Após serem liofilizadas, as frações foram pesadas para se calcular o rendimento do processo. A quantidade de PA base livre obtida foi equivalente a 70% do valor esperado.

5.2 Caracterização da PA base livre

5.2.1 Teste de identificação de sulfato

O resultado do teste para PA base livre foi negativo (ausência de sulfato), uma vez que não houve formação de precipitado branco ao se adicionar cloreto de bário às soluções ácidas da PA base livre obtida por troca iônica. O resultado do teste de identificação do sulfato realizado com o sulfato de PA foi positivo (presença de sulfato), uma vez que um precipitado branco foi observado.

5.2.2 RMN

Nas Figuras 8 e 9 estão representados os espectros de RMN de ^1H da PA base livre e do sulfato de PA respectivamente. A atribuição dos sinais foi realizada de acordo com a numeração proposta na Figura 10.

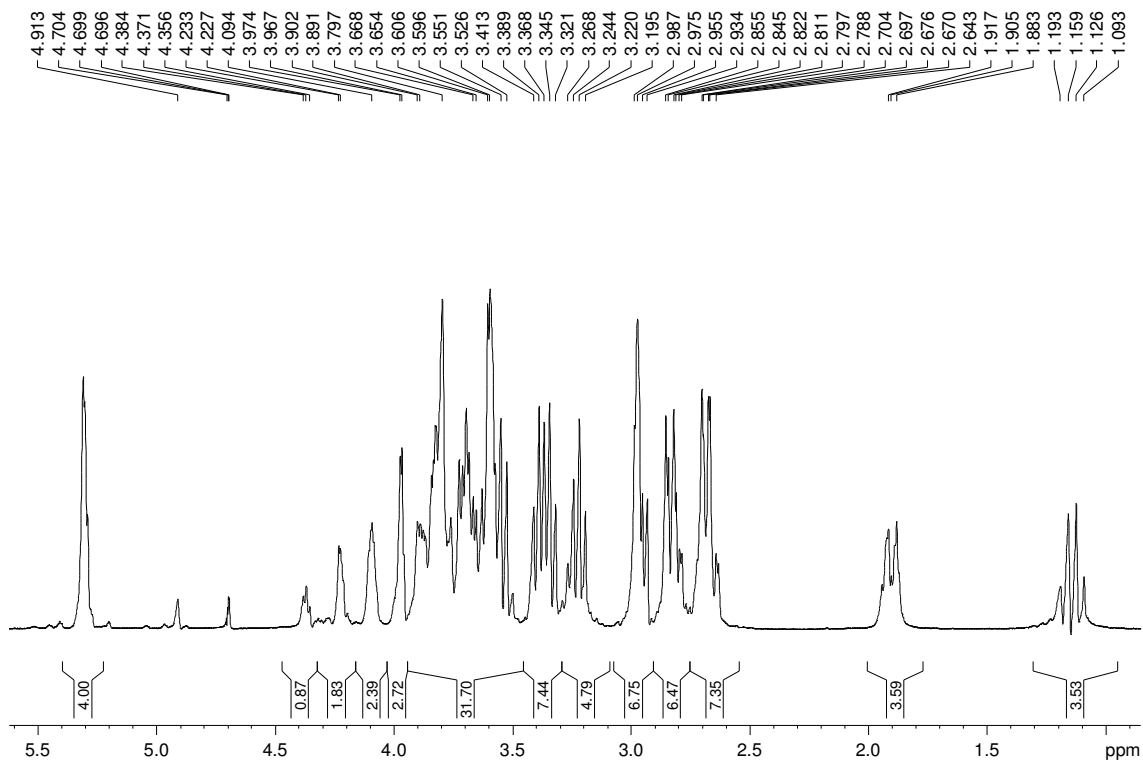


Figura 8 – Espectro de RMN de ^1H da PA base livre.

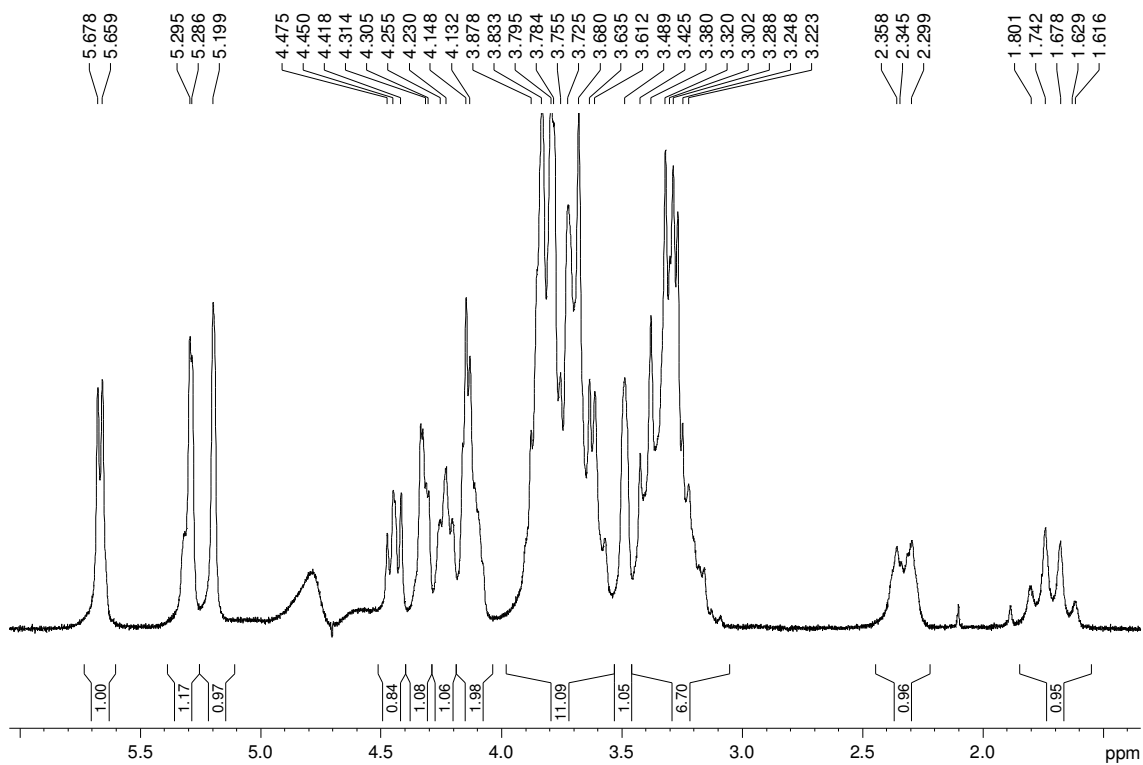


Figura 9 - Espectro de RMN de ^1H do sulfato de PA.

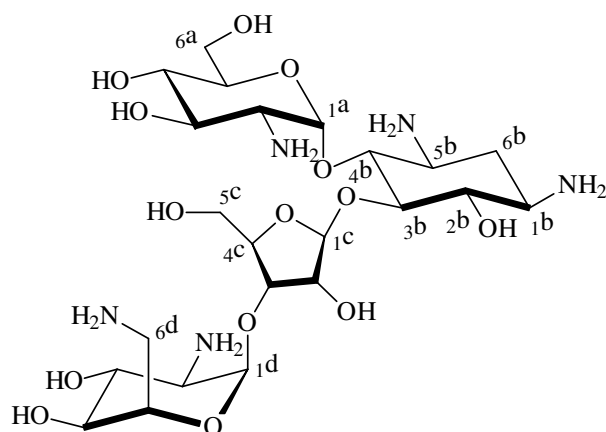


Figura 10 – Estrutura da PA usada para atribuição dos sinais referentes aos hidrogênios da PA base livre e do sulfato de PA

Na Figura 11 está representada a sobreposição entre os espectros de RMN de ^1H da PA base livre e do sulfato de PA de forma a facilitar a visualização das diferenças entre os deslocamentos químicos.

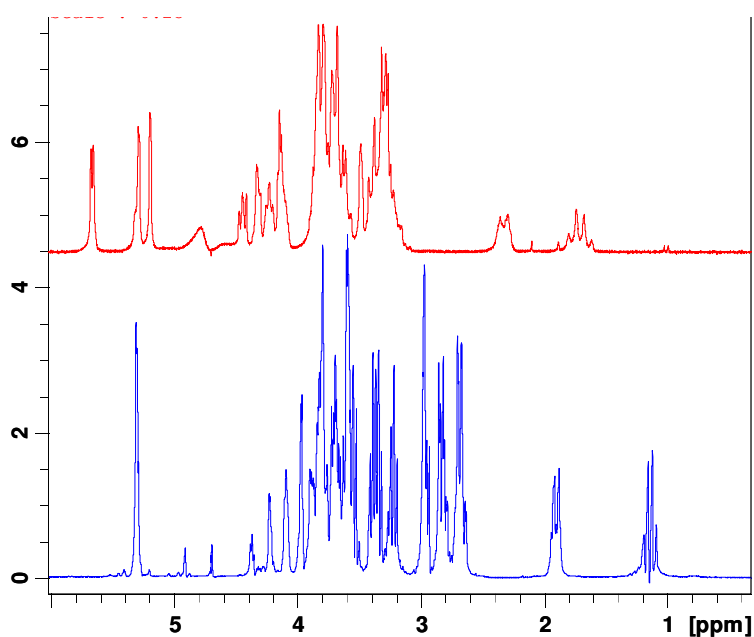


Figura 11 – Comparação entre os espectros de RMN de ^1H do sulfato de PA (vermelho) e da PA base livre (azul).

No espectro de RMN de ^1H da PA base livre (Figura 8) observa-se que todos os sinais relativos aos hidrogênios da molécula encontram-se mais blindados,

quando comparados com os respectivos sinais referentes aos hidrogênios do sulfato de PA (Figura 9).

Tabela 1 – Atribuição dos sinais referentes aos hidrogênios da PA base livre e do sulfato de PA.

Hidrogênio	Deslocamento químico (ppm)		Hidrogênio	Deslocamento químico (ppm)	
	Sulfato de PA	PA base livre		Sulfato de PA	PA base livre
H-1a	5,70	5,30	H-1c	5,24	4,91
H-2a	3,33	2,68	H-2c	3,53	2,98
H-3a	3,89	3,22	H-3c	4,19	3,97
H-4a	3,42	3,76 - 3,62	H-4c	3,74 - 3,63	3,61 - 3,59
H-5a	3,77 - 3,69	3,42 - 3,32	H-5c	3,74 - 3,63	2,86 - 2,78
H-6a	3,87 - 3,82	3,83 - 3,72	H-5c'	3,74 - 3,63	2,71 - 2,63
H-6a'	3,87 - 3,82	3,83 - 3,72	H-1d	5,33	5,31
H-1b	3,40 - 3,18	2,83 ou 2,71- 2,63	H-2d	4,36	4,23
H-2b	3,87 - 3,82	3,62 - 3,52	H-3d	4,48	4,38
H-3b	3,87 - 3,82	3,62 - 3,52	H-4d	4,15	4,09
H-4b	3,87 - 3,82	3,62 - 3,52	H-5d	3,73 - 3,63	3,90 - 3,77
H-5b	3,40 - 3,18	2,71 - 2,63 ou 2,83	H-6d	3,29 - 3,16	2,99 - 2,93
H-6b	1,75	1,14	H-6d'	3,29 - 3,16	2,86 - 2,63
H-6b'	2,37	1,91	-	-	-

Os sinais referentes aos hidrogênios do sulfato de PA encontram-se mais desblindados, ou seja, apresentam maior deslocamento químico quando comparados aos sinais da PA base livre. Essa diferença no deslocamento químico é devido à presença dos grupamentos amino carregados positivamente o que desprotege os hidrogênios vizinhos. As atribuições dos sinais referentes aos hidrogênios da PA base livre e do sulfato de PA encontram-se descritas na Tabela 1.

Devido à complexidade da estrutura da PA e, conseqüentemente, de seu espectro de RMN de ^1H , observa-se sobreposição de vários sinais (figuras 8 e 9), o que dificulta a sua atribuição. Portanto, a análise dos espectros de RMN de ^{13}C , sub-espectro de DEPT135 e dos mapas de contornos COSY, HMQC e HMBC foi fundamental para a atribuição dos sinais apresentados na Tabela 1.

5.2.3 Atividade da PA base livre após processo de troca iônica

5.2.3.1 Obtenção da curva padrão do sulfato de PA

Na figura 12 estão apresentadas as curvas-padrão obtidas em dias diferentes para o sulfato de PA, com as respectivas equações da reta e coeficientes de determinação (r^2).

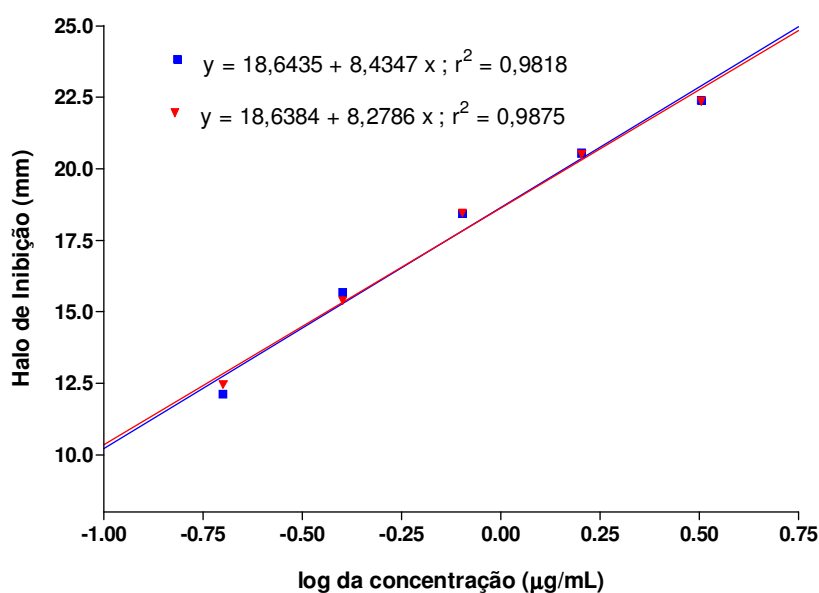


Figura 12 – Representação gráfica de duas curvas analíticas do sulfato de PA, obtidas por doseamento microbiológico, em dias diferentes.

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

A fim de traçar uma curva comum foi necessário comprovar que a curva 1 e a curva 2 não diferiam estatisticamente. Para isso, foi formulada hipótese nula de que tanto os valores de a (coeficiente linear) quanto os 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 13) a partir da média dos pontos das duas curvas. A análise de regressão da curva revelou linearidade adequada dentro da faixa de concentração trabalhada.

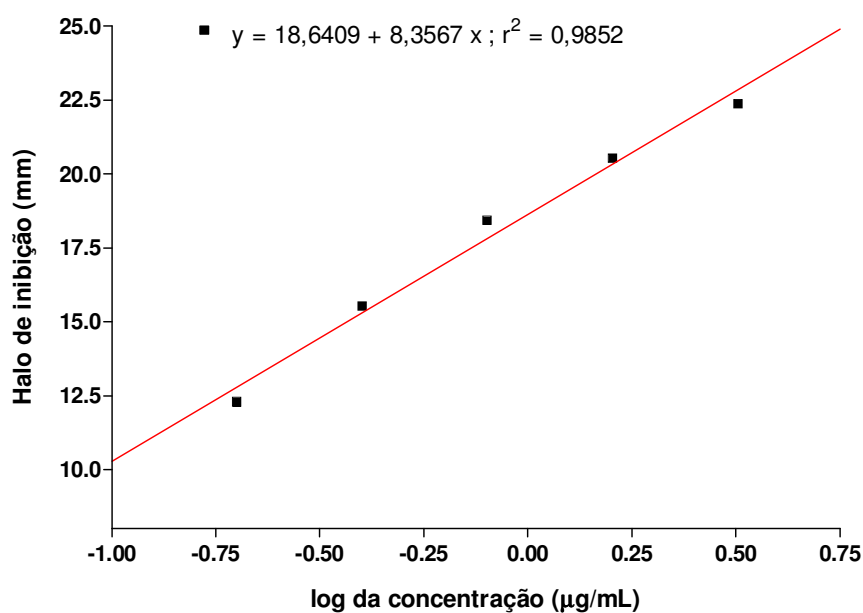


Figura 13 – Representação gráfica da curva padrão de sulfato de PA (média \pm dp), obtida por doseamento microbiológico, na faixa de 0,2 a 3,2 $\mu\text{g/mL}$.

5.2.3.2 Obtenção das curvas analíticas da PA base livre

Na Figura 14 estão apresentadas três curvas-padrão para a PA base livre, com as respectivas equações da reta e coeficientes de determinação (r^2), obtidas em dias diferentes.

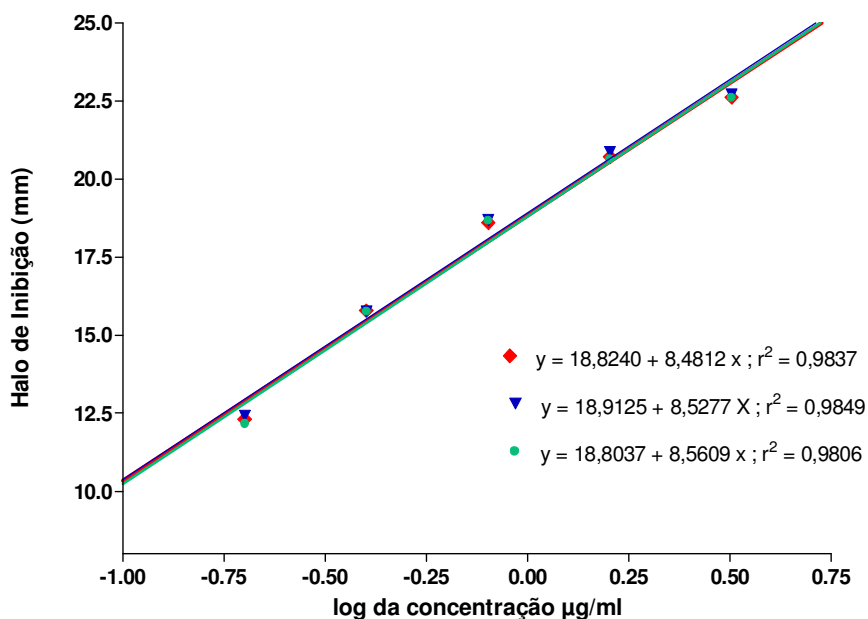


Figura 14 – Representação gráfica de três curvas padrão de PA base livre, obtidas por doseamento microbiológico, em dias diferentes.

A análise de regressão para cada curva revelou linearidade adequada dentro da faixa de concentração trabalhada e regressão significativa para $P \leq 0,05$. Foi realizada análise estatística para comparar cada uma das três curvas analíticas obtidas a partir da PA base livre, com a curva padrão do sulfato de PA. Para isso, foi formulada hipótese nula de que tanto os valores de a (coeficiente linear) quanto os de b (inclinação), não diferiam estatisticamente. A hipótese nula foi aceita e concluiu-se que as curvas não são estatisticamente diferentes.

Esta avaliação nos permitiu concluir que durante o processo de troca iônica não houve diminuição da atividade da PA base livre. Além disso, é possível inferir sobre a eficácia de obtenção da PA base livre. Além das evidências químicas, o fato de terem sido feitas pesagens de quantidades equivalentes de base e de sulfato (não iguais) para a obtenção das curvas e dessas curvas não terem diferido atesta não só a manutenção da atividade, mas também a retirada do sulfato.

5.2.3.3 Obtenção da curva padrão de PA base livre

Para que se pudesse traçar uma curva comum para PA base livre, foi necessário comprovar que as três curvas analíticas não diferiam estatisticamente. Para isso, foi formulada hipótese nula de que tanto os valores de a (coeficiente linear) quanto os de b (inclinação) não diferiam estatisticamente. A hipótese nula foi aceita e concluiu-se que as curvas são estatisticamente semelhantes. Desta forma, traçou-se uma curva comum (Figura 15) a partir da média dos pontos das duas curvas. A análise de regressão da curva revelou linearidade adequada dentro da faixa de concentração trabalhada.

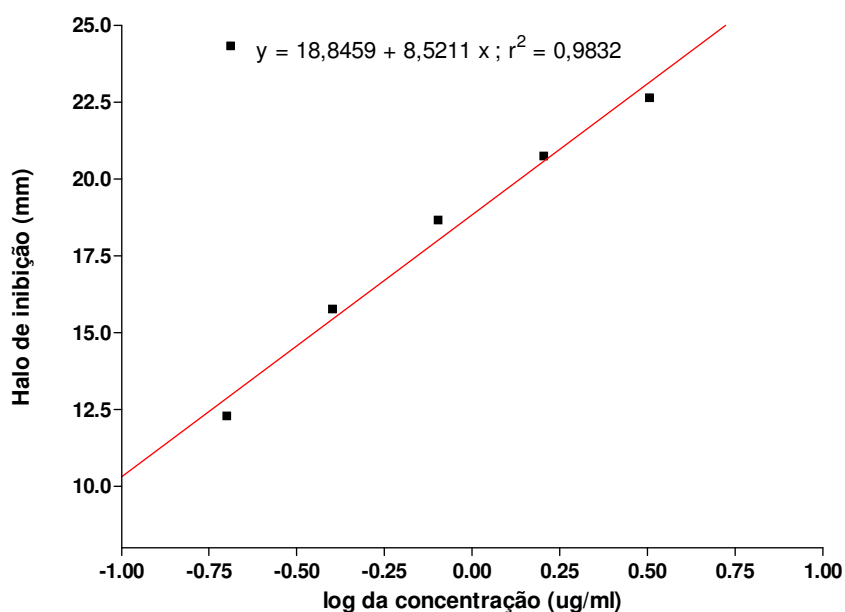


Figura 15 – Representação gráfica da curva padrão da PA base livre (média \pm dp), obtida por doseamento microbiológico, na faixa de 0,2 a 3,2 $\mu\text{g/mL}$.

5.3 Síntese dos sais de PA

Os sais foram sintetizados e armazenados em dessecador a vácuo até o uso. Na Tabela 2 as massas moleculares dos ácidos orgânicos e dos sais são apresentadas.

Tabela 2 – Massa molecular dos ácidos orgânicos e dos sais sintetizados.

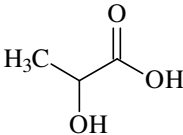
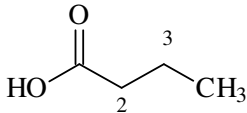
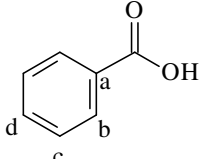
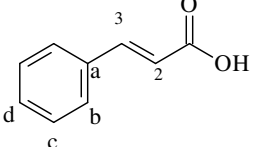
Substância	Massa Molecular (g)	Substância	Massa Molecular do sal (g)
Ácido Láctico	90,08	LAC – PA	1066,04
Ácido Butírico	88,11	BUT – PA	1056,19
Ácido Benzoico	122,0	BENZ – PA	1221,14
Ácido Cinâmico	148,17	CIN – PA	1356,44

O aumento da massa molecular dos ácidos orgânicos contribui significativamente para o aumento da massa molecular do sal uma vez que este contém cinco moléculas de ácido para uma molécula de base livre. Conforme mencionado anteriormente, o aumento da cadeia carbônica dos ácidos orgânicos contribui para o aumento da lipofilicidade do par iônico. Por outro lado o aumento da massa molecular e assim, do tamanho do par iônico, desfavorece sua permeação cutânea.

5.3.1 Caracterização da formação dos pares iônicos

Os deslocamentos químicos dos sinais referentes aos hidrogênios e carbonos próximos ao grupo carboxilato e dos sinais correspondentes no espectro dos ácidos orgânicos estão descritos na tabelas 3, assim como a diferença entre estes deslocamentos (Δ). Na Tabela 3 também são apresentadas as estruturas dos ácidos orgânicos.

Tabela 3 – Estrutura molecular dos ácidos orgânicos e comparação entre os deslocamentos químicos dos sinais referentes aos hidrogênios do ácido *versus* sal.

Estrutura Molecular	Atribuição	Deslocamento químico (ppm)		
		Acido Láctico	Lactato de PA	Δ
	COOH	5,01	-	-
	CH(OH)	4,22	4,04	<u>0,18</u>
	CH ₃	1,38	1,34	0,04
		Acido Butírico	Butirato de PA	Δ
	CH ₃	0,96	0,94	0,02
	2 x H-3	1,62	1,61	0,01
	2 x H-2	2,26	2,18	<u>0,08</u>
	OH	4,87	-	-
		Acido Benzoico	Benzoato de PA	Δ
	2 x H-b	8,03	7,96	0,07
	2 x H-c	7,46	7,38	0,08
	H-d	7,58	7,44	<u>0,14</u>
		Ácido Cinâmico	Cinamato de PA	Δ
	H-2	6,47	6,50	-0,03
	H-3	7,67	7,48	<u>0,19</u>
	2x H-c + H-d	7,4-7,37	7,37-7,32	0,04
	2 x H-d	7,58-7,56	7,53	0,04
	OH	4,97	-	-

Na Tabela 3 estão destacadas (sublinhado e em negrito) as maiores diferenças encontradas entre os deslocamentos químicos dos sinais correspondentes aos hidrogênios dos sais e dos ácidos. Esta diferença corresponde aos sinais referentes aos hidrogênios vizinhos ao grupo carboxilato (no caso do lactato de PA e do butirato de PA) ou hidrogênios em ressonância com esse grupo (benzoato de PA e cinamato de PA), pois estes sofrem maior influência da carga negativa.

Na Figuras 16, 17, 18 e 19 estão representadas as sobreposições entre os espectros de RMN de ^1H dos ácidos livres (ácido láctico, ácido butírico, ácido benzóico e ácido cinâmico, respectivamente) e do sais correspondentes, de forma a facilitar a visualização das diferenças entre os deslocamentos químicos. Além disso, em cada figura está representada a formula estrutural do respectivo ácido. Os sinais correspondentes aos mesmos hidrogênios, no espectro do ácido e do sal estão assinalados com a mesma cor.

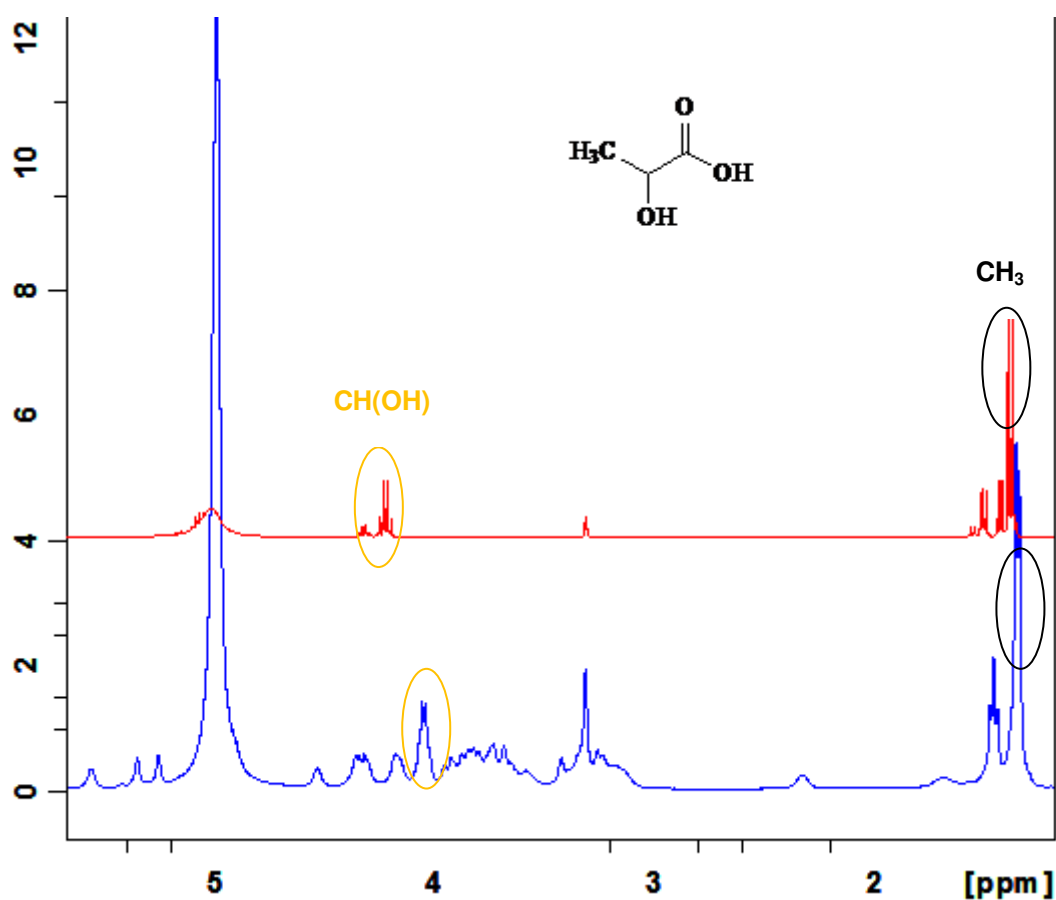


Figura 16 – Comparação entre os espectros de RMN de ^1H do ácido láctico (vermelho) e do lactato de PA (azul).

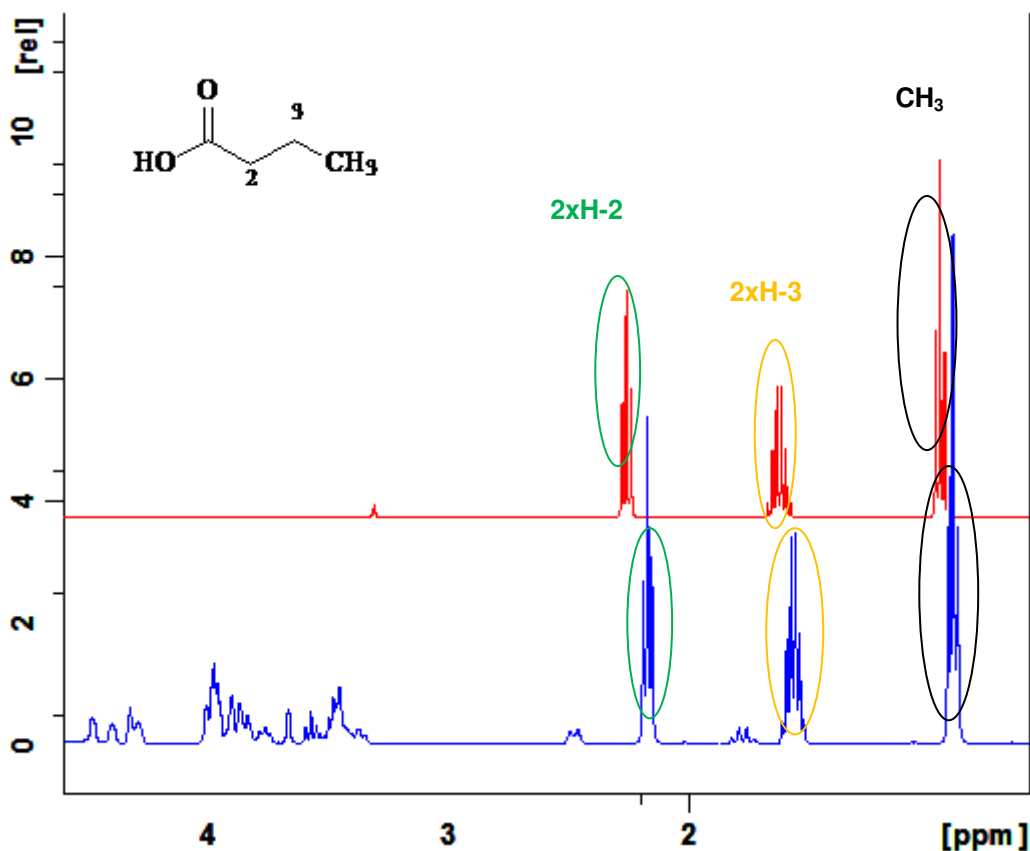


Figura 17 – Comparação entre os espectros de RMN de ^1H do ácido butírico (vermelho) e do butirato de PA (azul).

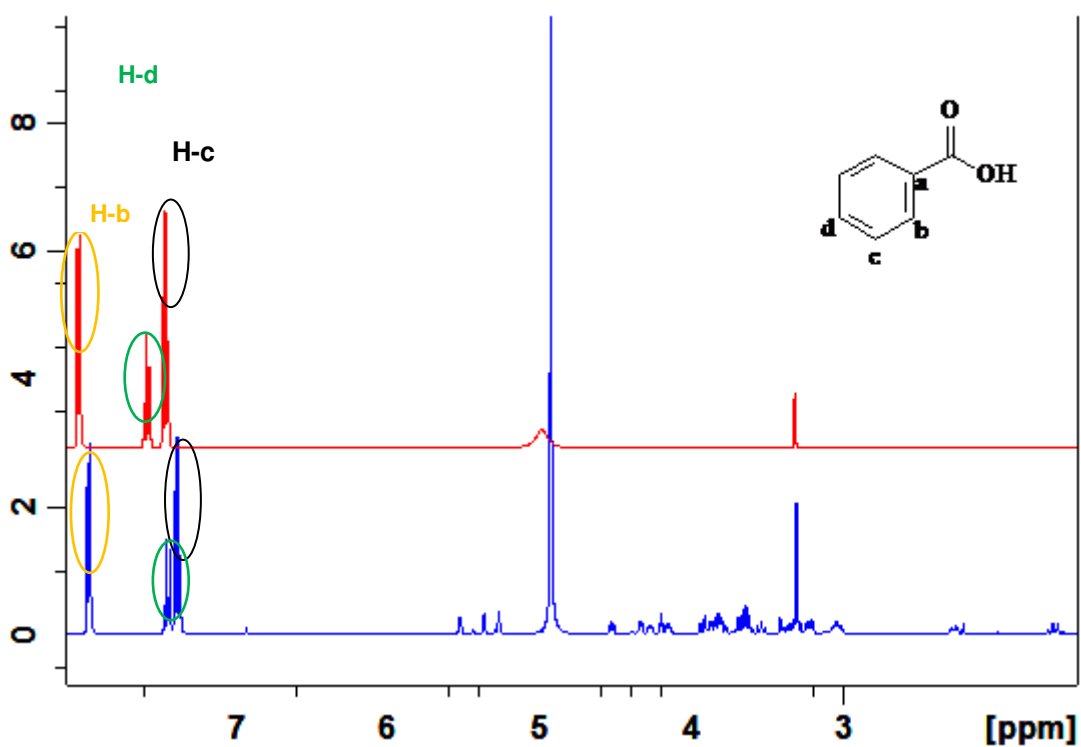


Figura 18 – Comparação entre os espectros de RMN de ^1H do ácido benzóico (vermelho) e do benzoato de PA (azul).

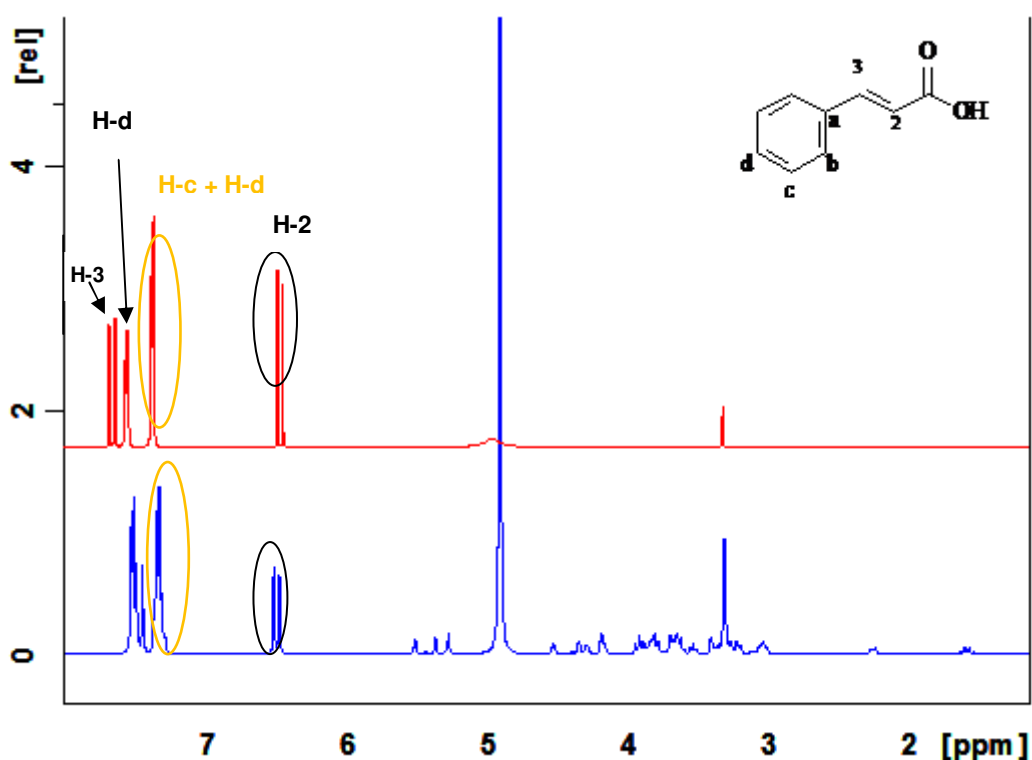


Figura 19 – Comparação entre os espectros de RMN de ¹H do ácido cinâmico (vermelho) e do cinamato de PA (azul).

Observa-se que os deslocamentos químicos dos sinais correspondentes aos hidrogênios dos sais (carboxilatos) encontram-se mais próximos ao TMS, ou seja, mais blindados, devido à carga negativa desse grupo.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 3 e nas Figuras 16, 17, 18 e 19 é possível concluir que a adição dos contra íons ácidos à PA base livre acarreta mudanças no seu espectro de RMN de ¹H. Essas mudanças indicam que houve formação de pares iônicos entre a PA base livre e os ácidos orgânicos em metanol.

5.4 Determinação do coeficiente de partição octanol/água (log K) da PA base livre

5.4.1 Influência do pH

As concentrações da PA base livre na fase aquosa e no octanol, após partição por 24 horas, foram determinadas em função do pH. A partir destes dados foram calculados os valores de *log K*, como mostrado na Tabela 4.

Tabela 4 – Determinação de $\log K$ da PA base livre, em função do pH.

pH	$\log K$
5,0	-
6,0	$-0,97 \pm 0,11$
7,0	$-0,96 \pm 0,06$
8,5	$-0,75 \pm 0,06$

Foi observado um pequeno aumento do $\log K$ com o aumento do pH, conforme esperava-se para uma base fraca como a PA base livre. No caso de bases fracas, o aumento do pH contribui para que a molécula esteja predominantemente na forma não ionizada, aumentando sua concentração na fase orgânica e assim podendo levar a um aumento de $\log K$. Porém, mesmo em pH igual a 8,5 a afinidade da PA base livre pela fase orgânica ainda é muito baixa. Verificou-se que o aumento do pH não foi suficiente para aumentar significativamente o $\log K$ da PA base livre.

5.4.2 Influencia da adição de contra íons

A influência da adição de diferentes contra íons sobre o $\log k$ da PA base livre foi investigada. As concentrações da PA base livre na fase aquosa (pH fixo = 6,0) e no octanol, após partição por 24 horas, foram determinadas. A partir desses valores foram calculados os valores de $\log K$ da PA base livre e dos sais como mostrado na Tabela 5.

Tabela 5 – Determinação de $\log K$ da PA base livre e dos sais em pH igual a 6,0.

Substância	K	$\log K$
PA base livre	0 ^a	-0,97
Butirato de PA	0	-
Benzoato de PA	0,04	-1,36

^aA concentração de PA no tampão antes da partição com o octanol foi igual àquela observada após a partição; portanto, a quantidade de PA que migrou para a fase orgânica foi desprezível.

Esperava-se que a formação do par iônico fosse suficiente para promover um aumento na lipofilicidade da molécula, capaz de aumentar seu $\log K$ e que quanto maior a cadeia carbônica dos ácidos orgânicos maior seria o $\log K$ dos sais. Porém,

os valores de $\log K$ dos sais e da PA base livre foram similares. Este resultado pode ser explicado pelo alto grau de solvatação dos sais na fase aquosa, pela dificuldade de superação da alta energia de hidratação e pela baixa estabilização do par iônico dentro do ambiente lipídico (GREEN & HADGRAFT, 1987). Mesmo na forma de par iônico, a PA apresenta-se como uma molécula bastante hidrofílica. Assim, os valores de $\log K$ encontrados não significam que não esteja havendo aumento da lipofilicidade dos pares iônicos em relação à PA base livre, mas que esse aumento de lipofilicidade seja insuficiente para que os pares iônicos tenham afinidade pelo octanol, bastante lipofílico.

5.5 Determinação da solubilidade da PA base livre e dos sais em diferentes solventes

A solubilidade da PA base livre e dos sais, foi determinada em diferentes solventes e está descrita na Tabela 6.

Tabela 6 – Determinação da solubilidade da PA base livre e seus sais em diferentes solventes.

Substância	Solubilidade (mg/mL) \pm desvio padrão		
	Água	Metanol	Etanol
Sulfato de PA	> 1000	< 0,01	< 0,005
Pa base livre	> 1000	8,3 \pm 0,2	1,4 \pm 0,1
Lactato de PA	26,4 \pm 2,4	110,6 \pm 3,2	10,3 \pm 0,7
Butirato de PA	25,5 \pm 1,0	110,4 \pm 4,3	12,4 \pm 0,4
Benzoato de PA	34,8 \pm 1,3	280,5 \pm 21,5	57,9 \pm 2,7
Cinamato de PA	14,2 \pm 0,9	113,8 \pm 4,0	34,8 \pm 1,3

Foram usados três solventes de polaridades diferentes, sendo a água o mais polar e o etanol o mais apolar. Como esperado, observou-se uma nítida diminuição da solubilidade da PA base livre e do sulfato de PA à medida que a polaridade do solvente diminuiu. A solubilidade da PA base livre e do sulfato de PA em água foi significativamente maior que aquela observada para os sais. Em contrapartida, a solubilidade em metanol e etanol da PA livre e do sulfato foi menor do que aquela observada para os sais. Assim, a formação do par iônico entre a PA e ácidos

orgânicos diminuiu a solubilidade aquosa e aumentou a solubilidade em solventes orgânicos deste fármaco base.

De uma forma geral, a solubilidade do lactato de PA e do butirato de PA em cada um dos solventes foi similar, o que pode ser explicado pela semelhança entre as estruturas dos ácidos butírico e láctico, levando a formação de pares iônicos com massa e estrutura semelhantes. Para esses pares iônicos, em metanol, houve um aumento de solubilidade de aproximadamente 10.000 vezes em relação ao sulfato de PA e de 13 vezes em relação à PA base livre. Os pares iônicos que apresentaram maior solubilidade em etanol foi o benzoato e o cinamato de PA, o que sugere maior caráter lipofílico destes sais em comparação com o lactato e o butirato.

Finalmente, observou-se que a formação do par iônico entre a PA e os ácidos orgânicos levou a uma diminuição do caráter hidrofílico dos sais, ou seja, aumento do caráter lipofílico. No entanto, deve ser observado que a solubilidade de todos os sais foi maior em metanol do que em etanol (Tabela 6). Estes dados sugerem que este aumento do caráter lipofílico, através da formação do par iônico, foi moderado e isto está em consonância com nossos dados prévios, os quais mostraram que a formação do par iônico não foi suficiente para aumentar o $\log K$.

5.6 Permeação e penetração cutânea *in vitro* da PA base livre e dos sais

5.6.1 Validação da extração do butirato de PA da pele

O objetivo da validação da extração do butirato de PA da pele é assegurar que a PA que penetrou na pele seja extraída e quantificada adequadamente. Determinou-se exatamente a concentração da solução de butirato de PA aplicada na pele e calculou-se a concentração de butirato de PA esperada no líquido extrator após a extração. A quantidade de butirato de PA quantificada após a extração (n=3) foi igual a $72 \pm 4,7\%$ em relação à quantidade esperada.

A validação da extração do sulfato de PA, realizada em um estudo anterior, mostrou que através do procedimento de extração deste sal é possível recuperar aproximadamente 100% (ver dados) da quantidade aplicada na pele (FERREIRA *et al.*, 2004). A diferença entre estes resultados pode ser justificada pela diferença de solubilidade entre os sais de PA. O sulfato de PA é mais solúvel no tampão usado

para extração que o butirato de PA. Desta maneira sugeriu-se o uso de outros solventes para extrair o butirato da pele como, por exemplo, etanol. Porém isto levou a extração de outras substâncias da pele como lípidos que interferiram no doseamento microbiológico do líquido extrator. Assim, decidiu-se prosseguir com a extração usando tampão fosfato pH 8,0.

5.6.2 Permeação e penetração através da pele intacta

Os dados obtidos nos estudos de permeação cutânea da PA base livre e seus sais, através da pele intacta, podem ser visualizados na Tabela 7.

Tabela 7 – Permeação e penetração cutânea *in vitro* (% dose aplicada) da PA e seus sais, a partir das soluções etanólicas, através da pele intacta após 8 h.

Formulação	Permeação	Penetração (% dose aplicada)
PA base livre	ND ^a	0,30 ± 0,02
Lactato de PA	ND	0,77 ± 0,04
Butirato de PA	ND	0,23 ± 0,04
Benzoato de PA	ND	0,49 ± 0,02
Cinamato de PA	ND	0,37 ± 0,09

^aND (Não detectada)

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

Foram aplicadas sobre a pele intacta, amostras de 100 µL das soluções etanólicas de PA base livre e dos sais, na concentração de 1% (p/p). Após 8 horas foram retiradas amostras de líquido receptor e foi realizada a extração da PA base livre e dos sais da pele. As amostras foram submetidas ao doseamento microbiológico para determinação da permeação e da penetração (% da dose aplicada) da PA base livre e dos sais.

A permeação cutânea *in vitro* da PA através da pele intacta a partir das soluções foi abaixo do limite de detecção do método de doseamento. Assim sendo, a PA não foi detectada no líquido receptor, ou seja, a permeação da PA através da pele intacta foi muito baixa. Portanto, embora a formação do par iônico tenha aumentado o caráter lipofílico da PA base livre, conforme demonstrado pelos dados

de solubilidade, isto não foi suficiente para aumentar a sua permeação. Outra explicação seria o fato de que a PA e seus sais apresentam massa molecular elevada, o que pode constituir um obstáculo para permeação através da barreira compacta representada pelo EC

Em contrapartida, a penetração cutânea a partir dos sais (lactato, cinamato e benzoato) foi maior do que aquela observada para a PA base livre ($0,30 \pm 0,02\%$). As diferenças entre sais e da PA base livre foram estatisticamente significativas ($P < 0,05$). Foi realizado pós-teste de Tuckey, em que a penetração cutânea dos sais foi comparada individualmente com aquela da PA base livre e apenas o lactato de PA e o benzoato de PA apresentaram diferença estatística significativa ao nível de $p < 0,05$.

Surpreendentemente, a penetração da PA a partir do butirato de PA ($0,23 \pm 0,04$) foi menor do que aquela observada para a base livre. Porém, se levarmos em consideração que a extração do butirato de PA que penetrou na pele foi menor (72%; ver item 5.6.1) do que aquela observada para a PA base livre, os valores de penetração deste sal, corrigidos em relação a esta diferença, são similares àqueles para a penetração da PA base livre. Deve ser enfatizado que entre os sais que proporcionaram aumento da penetração, o efeito foi mais pronunciado com o lactato em comparação com o benzoato e o cinamato. Assim sendo, o sal de menor massa molecular proporcionou maior penetração. Por outro lado, nossos dados prévios mostraram que a solubilidade da PA em etanol, o solvente menos polar usado naqueles estudos, foi maior para o cinamato e benzoato em comparação com o lactato, o que sugere maior caráter lipofílico destas substâncias. No entanto, o aumento do caráter lipofílico em associação com o aumento da massa molecular pode ser um limitante para a penetração cutânea. Em conclusão, o aumento das propriedades lipofílicas aumentou a penetração cutânea da PA e isto pode ser atribuído ao aumento do caráter lipofílico, no entanto o aumento da massa molecular parece ser um fator limitante.

5.6.3 Permeação através da pele sem EC

Na Tabela 8 podem ser visualizados os dados obtidos nos estudos de permeação cutânea da PA (em % da dose aplicada), a partir das diferentes soluções, após 8 horas.

Tabela 8 – Permeação cutânea *in vitro* da PA e seus sais, a partir das soluções etanólicas, através da pele sem EC.

Solução (substância)	Orelha	Permeação (% dose aplicada)		
		^a média por célula	^b média por fragmento	^c média geral
PA Base Livre	1	9 ± 0,1	11 ± 2,1	10 ± 1
	1	12 ± 0,5		
	2	10 ± 0,0		
	2	11 ± 0,2		
Lactato de PA	3	20 ± 1,1	18 ± 3,5	11 ± 7
	3	15 ± 0,1		
	4	1,5 ± 0,0		
	4	9 ± 0,1		
Butirato de PA	1	15 ± 1,2	33 ± 25	33 ± 14
	1	50 ± 2,7		
	2	34 ± 2,1		
	2	36 ± 1,7		
Benzoato de PA	5	15 ± 0,5	28 ± 18	22 ± 14
	5	41 ± 3,8		
	6	22 ± 1,7		
	6	9 ± 0,5		
Cinamato de PA	5	25 ± 1,1	25 ± 0,7	17 ± 9
	5	24 ± 0,5		
	6	12 ± 0,6		
	6	7 ± 0,4		

^aOs valores expressos correspondem à média (n=2) ± dp (desvio padrão). Para o doseamento microbiológico são aceitos valores de desvio de até 10% em relação ao valor médio determinado.

^bOs valores expressos correspondem à média (n=2) ± dp (desvio padrão)

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

Após a remoção quase completa do EC a permeação da PA base livre foi relativamente baixa (10 ± 1% da dose aplicada). Assim sendo, a epiderme sem EC ou com uma pequena quantidade residual desta camada ainda constitui uma barreira importante para a permeação da PA.

Pode-se observar que a permeação da PA na forma de sais foi maior do que aquela observada para a PA base livre. Os dados de permeação dos sais foram comparados estatisticamente com aqueles da base livre por meio do teste t ao nível $p < 0,05$. A permeação do butirato de PA (33 ± 14% da dose aplicada) foi significativamente maior do que aquela observada para a PA base livre (10 ± 1). A permeação para sais benzoato (22 ± 14), cinamato (17 ± 9) e lactato (11 ± 7) foi também maior do que aquela observada para a base livre, no entanto, as diferenças não foram estatisticamente significativas. Portanto, o sal que apresentou maior permeação foi o butirato de PA, seguido pelo benzoato, cinamato e lactato. Pode se

concluir que o aumento de lipofilia favoreceu a permeação através da pele sem EC e isto pode ser atribuído ao aumento do coeficiente partição pele/veículo. No entanto, da mesma forma como observado na pele intacta, o aumento da massa molecular constitui um fator limitante, uma vez que os sais benzoato e cinamato proporcionaram aumento da permeação inferior àquele observado para o butirato. O lactato de PA, apesar de apresentar massa molecular semelhante à do butirato, apresenta em sua estrutura uma hidroxila capaz de formar ligações de hidrogênio com as substâncias endógenas da pele e isso pode explicar a baixa permeação cutânea observada. Vale ressaltar que nossos dados prévios mostraram que o lactato favoreceu a penetração na pele intacta, mas isto não foi suficiente para aumentar a permeação em comparação com a base (Tabela 8). Alguns autores mostraram que fármacos que apresentam potencial elevado para formar pontes de hidrogênio estão associados com baixa permeação através da pele (MOSER *et al.*, 2001)

Deve ser enfatizado que o desvio padrão associado com a permeação de todos os sais foi alto (DPR > 50%) e isto pode ter contribuído para mascarar as diferenças entre os sais e a base livre. Desta maneira, a fim de investigar a origem da alta variabilidade observada nos estudos de permeação, sobretudo no caso dos sais, os dados de quantidade permeada para cada substância (sais e base livre) foram apresentados para cada célula de Franz e por fragmento de orelha usado (Tabela 9). Estes dados mostram claramente que esta variabilidade não pode ser explicada pela orelha usada, uma vez que a mesma orelha, usada com preparações diferentes, proporcionou dados variáveis em um caso e não em outro (comparar orelha 1 para PA base livre e butirato; Tabela 8). A variabilidade não está também associada com o método de doseamento, uma vez que as médias por célula foram associadas com desvios baixos (DPR < 10%). Nós especulamos que esta variabilidade possa estar associada com o processo de remoção da camada córnea.

O procedimento de remoção do EC foi validado previamente, conforme mencionado na seção material e métodos, através de análises histológicas e das medidas da perda de água transepidérmica. No entanto, esta validação foi conduzida em fragmentos de pele fresca (não congelada), enquanto que os estudos de permeação foram conduzidos com pele congelada e posteriormente descongelada. O processo de congelamento e descongelamento pode contribuir

para alterar a adesão da camada córnea sobre a fita adesiva gerando variabilidades na quantidade de células removidas com esta técnica.

Na tabela 9 estão apresentados dados selecionados nos estudos de permeação cutânea na pele sem EC. Os dados foram selecionados da Tabela 9, de acordo com o desvio padrão associado à permeação em cada fragmento de orelha de porco. Os fragmentos cuja permeação apresentou desvio padrão alto foram descartados.

Tabela 9 – Dados selecionados no estudo de permeação cutânea *in vitro* da PA e seus sais, através da pele sem EC, de acordo com o fragmento de orelha que apresentou menor desvio padrão.

Solução (substância)	Permeação % dose aplicada
PA Base Livre	11 ± 0,7
Lactato de PA	18 ± 3,5
Butirato de PA	35 ± 1,4
Benzoato de PA	28 ± 18,4
Cinamato de PA	25 ± 0,7

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

Os dados mostram um perfil similar àquele apresentado anteriormente, no qual a permeação dos sais foi maior do que aquela observada para a PA base livre, no entanto, com médias associadas com uma variabilidade muito menor. No caso do butirato de PA, considerando apenas os fragmentos provenientes da orelha número 2, o valor da permeação foi de 35 ± 1,4%, ou seja, o desvio padrão associado foi 10 vezes menor que aquele calculado usando os 4 fragmentos provenientes das 2 orelhas. Em relação ao cinamato de PA, considerando apenas os fragmentos provenientes da orelha número 5, o valor da permeação foi de 25 ± 0,7%, ou seja, o desvio padrão associado foi 20 vezes menor que aquele calculado usando os 4 fragmentos provenientes das 2 orelhas.

Foi realizado teste t comparando individualmente a permeação de cada um dos sais com a permeação da PA base livre ao nível de $p < 0,05$. Quando

comparados à PA base livre, o butirato de PA e o cinamato de PA apresentaram diferença estatisticamente significativa. Conforme mostrado na tabela 10, o maior aumento de permeação encontrado em relação à base livre foi a partir do butirato de PA (3,2 vezes), seguido do cinamato de PA (2,3 vezes). A permeação para o benzoato de PA ($28 \pm 18,4$) e lactato de PA ($18 \pm 3,5$) foi maior do que aquela observada para a base livre, no entanto, as diferenças não foram estatisticamente significativas.

A formação de um par iônico tem sido descrita como estratégia para aumentar a lipofilia de fármacos o que pode favorecer a sua permeação cutânea (MEGWA *et al.*, 2000 a,b; BARRY *et al.*, 2001; SARVEIYA *et al.*, 2005; KAMAL *et al.*, 2006). Nesses trabalhos foram usados fármacos de natureza ácida, (MEGWA *et al.*, 2000 a,b; BARRY *et al.*, 2001; SARVEIYA *et al.*, 2005; KAMAL *et al.*, 2006) e básica (HADGRAFT & GREEN, 1987), porém com estruturas menos complexas que a PA. Esse é o primeiro trabalho que propõe a formação de pares iônicos contendo a PA para aumentar a permeação/penetração cutânea deste antibiótico aminoglicosídeo que possui cinco grupos amino e várias hidroxilas (Figura 1).

Em estudos anteriores avaliou-se o impacto da formação dos pares iônicos sobre o $\log K$ e a permeação/penetração cutânea dos fármacos. Aumentos significativos no $\log K$ foram observados: 45 vezes no caso do par iônico metoprolol – ácido láurico, (HADGRAFT & GREEN, 1987) e de 41 vezes no $\log K$ do par iônico ácido salicílico – dodecilamina (MEGWA *et al.*, 2000). No presente trabalho não se observou aumento significativo do $\log K$ dos pares iônicos formados entre a PA e diferentes ácidos orgânicos a despeito da caracterização inequívoca dos compostos pela análise de seus espectros de RMN. Estes achados podem ser atribuídos ao fato de que, a despeito da formação do par iônico, a PA ainda possui várias hidroxilas livres, o que pode ter contribuído para manutenção de seu caráter hidrofílico, mesmo contendo ácidos orgânicos de cadeia longa. No entanto, embora o $\log K$ tenha sido similar entre a PA base livre e os pares iônicos, a solubilidade dos pares iônicos em solventes menos polares que água aumentou em comparação com a PA base livre, demonstrando que estes apresentam maior caráter lipofílico que a PA base livre.

Em dois trabalhos, a permeação de pares iônicos formados entre o ácido salicílico e alquilaminas em pele humana, foi comparada à permeação do ácido salicílico isoladamente. Houve um aumento de até 4,8 vezes na permeação cutânea do par iônico (contendo tridodecilamina, uma amina terciária), em relação à

permeação do fármaco isolado. Além disso, as mudanças no fluxo através da pele humana devido à formação dos pares iônicos foram relacionadas às propriedades físico-químicas dos contra-íons usados. Os resultados destes estudos mostraram que a formação do par iônico como estratégia de aumento da permeação de fármacos depende fortemente das propriedades físico-químicas (massa molecular, tamanho da cadeia carbônica e lipofilia – expressa pelo $\log K$) de ambos, fármaco e contra-íon (MEGWA *et al.*, 2000a, 2000b).

Nossos dados mostraram que os pares iônicos não foram capazes de aumentar a permeação da PA através da pele intacta, o que seria esperado em função dos valores de $\log K$ obtidos. No entanto, um aumento da permeação e penetração cutânea na pele sem EC e intacta, respectivamente foi observado quando os pares iônicos foram comparados com a PA base livre. Esses dados são particularmente relevantes para o tratamento tópico da LC com a PA. As formulações podem ser aplicadas sobre a pele com EC, a qual apresenta uma barreira à absorção dos fármacos, ou, mais frequentemente, sobre a pele ulcerada, na qual a principal barreira foi perdida. No caso da pele ulcerada, a despeito da ausência completa de barreira no início da terapia, a reepitelização da úlcera, ainda que parcial, pode contribuir para diminuir significativamente a penetração da PA. Assim sendo, a formação do par iônico pode ser uma alternativa para aumento da penetração cutânea da PA nesta condição de pele com barreira parcialmente comprometida.

A escolha do par iônico que apresente melhores propriedades de permeação/penetração deve ser empírica, uma vez que não é possível prever até que ponto o aumento da massa molecular favorece a permeação/penetração da PA. Porém, os dados sugerem fortemente que no caso da PA, o aumento da massa molecular do contra íon seja um fator limitante. Apesar da tendência geral de aumento da permeação/penetração cutânea dos pares iônicos em relação à PA base livre, alguns destes sais como o lactato de PA, não promoveram aumento na permeação da PA através da pele sem EC. Além disso, o processo de obtenção dos sais é bastante simples e permite ainda avaliar outros ácidos orgânicos disponíveis e ainda não testados.

6 CONCLUSÃO

Este trabalho teve como objetivo obter a PA base livre, sintetizar e caracterizar pares iônicos formados pela PA base livre e ácidos orgânicos, e comparar o $\log K$, solubilidade e permeação/penetração cutânea *in vitro* destes sais/pares iônicos e da PA base livre, através da pele de orelha de porco.

A formação dos pares iônicos não foi suficiente para aumentar o $\log K$ dos sais, porém promoveu aumento na solubilidade dos sais em solventes menos polares, mostrando que houve discreto aumento na lipofilia das moléculas porém insuficiente para aumentar os valores de $\log K$.

Os experimentos de permeação foram conduzidos com pele intacta e sem EC. A permeação da PA base livre e dos pares iônicos através da pele intacta foi baixa. Entretanto, houve aumento da penetração cutânea da PA quando esta estava sob a forma de par iônico com o lactato e o benzoato.

Na ausência do EC, não houve diferença significativamente estatística entre a permeação dos sais e da PA base livre. Por outro lado a quantidade de butirato de PA e de cinamato de PA que permeou através da pele sem EC de um mesmo fragmento de orelha de porco foi maior do que aquela observada para a PA base livre. Acredita-se que essa variabilidade possa estar relacionada a um processo heterogêneo de remoção do EC da pele de porco.

Os sais que apresentaram maior permeação na pele sem EC (butirato de PA e cinamato de PA) foram aqueles cuja penetração na pele intacta foi menor.

Os dados obtidos neste trabalho sugerem que a escolha do contra-íon que irá favorecer efetivamente a permeação/penetração da PA, que sozinha já apresenta alta massa molecular, deve ser baseada no fato de o aumento da massa molecular do contra íon ser um fator limitante.

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., NILFOROOSHADEH, 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, NILFOROOSHADEH, 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 ¹⁵N 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.
- BERMAN, J. D. Current treatment approaches to leishmaniasis. *Current Opinion in Infectious Diseases*, v. 16, p. 397-401, 2003.
- 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.
- CARNEIRO, G. *Lipossomas contendo paromomicina: desenvolvimento, caracterização e estudos de permeação cutânea in vitro*. 2007. 68 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.
- 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.
- 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.
- 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. 5, 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., HAMBURGUER, D., WEINRAUCH, L. Topical treatment of cutaneous leishmaniasis. *The Journal of Investigative Dermatology*, v. 87, n. 2, p. 284-288, 1986.
- EL-ON, J.; MESSER, G. *Leishmania major*: antileishmanial activity of methylbenzethonium chloride. *American journal of Tropical Medicine Hygiene*, v. 35, n. 6, p. 1110-1116, 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.
- FINI, A., FAZIO, G., GONZALEZ-RODRIGUEZ, M., CAVALLARI, C., PASSERINI, N., RODRIGUEZ, L. Formation of ion pairs in aqueous solutions of diclofenac salts. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 187, p. 163-173, 1999.
- 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.
- GREEN, P. G., HADGRAFT, J. Facilitated transfer of cationic drugs across a lipoidal membrane by oleic acid and lauric acid. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 37, p. 251-255, 1987.
- GREVELINK, S.A.; LERNER, E.A., Leishmaniasis. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v.34, p. 257-272, 1996.
- 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.
- 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.
- KAMAL, M. A. H. M., IIMURA, N., NABEKURA, T., KITAGAWA, S. Enhanced skin permeation of salicylate by ion-pair formation in non-aqueous vehicle and further enhancement by ethanol and l-menthol. *Chem. Pharm. Bull.*, v. 54 (4), p. 48-484, 2006.
- 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 paromomycin/methylbenzethonium chloride plus meglumine antimoniate as treatment of American cutaneous leishmaniasis: controlled study. *Clinical Infectious Diseases*, v. 29, p. 466, 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.
- MEGWA, S. A., CROSS, S.E., WHITWHOUSE, M. W., BENSON, H. A. E., ROBERTS, M. Effect of ion pairing with alkylamines on the in-vitro dermal penetration and local tissue disposition of salicylates. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 52, p. 929-940, 2000a.
- MEGWA, S. A., CROSS, S.E., BENSON, H. A. E., ROBERTS, M. Ion-pair formation as a strategy to enhance topical delivery of salicylic acid. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 52, p. 919-928, 2000b.
- 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., SARAVIA, N.G. Advances in leishmaniasis. *Lancet*, v. 366, p. 1561-1577, 2005.
- 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.
- NEUBERT, N. Ion pair transport across membranes. *Pharmaceutical Research*, v. 6, p. 743-747, 1989.
- OMS – Organização Mundial de Saúde. Disponível em: www.who.int/leishmaniasis/burden/magnitude/burden_magnitude/em/index.html. Acessado em 29-10-2008.
- QUINTANAR-GUERRERO, D., ALLEMANN, E., FESSI, H., DOELKER, E. Applications of the ion pair concept to hydrophilic substances with special emphasis on peptides. *Pharmaceutical Research*, v. 14, n. 2, p. 119-127, 1997.
- SALAH, A. B., 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.
- SARVEIYA, V.; TEMPLETON, J.F.; BENSON, A.E. Ion-pairs of ibuprofen: increased membrane diffusion. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.56, p. 717-724, 2004.

- SARVEIYA, V.; TEMPLETON, J.F.; BENSON, A.E. Effect of lipophilic counter-ions membrane diffusion of benzydamine. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.26, p. 39-46, 2005.
- 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., 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. Press 2006, 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 31 / The National Formulary – NF 26. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention, 2008. 3500 p.
- VALENTA, C., SIMAN, U., KRATZEL, M., HADGRAFT, H. The dermal delivery of lignocaine: influence of ion pairing. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 197, p. 77-85, 2000.
- 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.
- 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.