

Avaliação do Potencial Irritativo e Comedogênico na Pele de Sistemas Microemulsionados Associados ou Não ao Ultra-Som Terapêutico

Autores

Juliana Milani Scorisa

Orientador

Maria Silvia Mariani Pires de Campos

Apoio Financeiro

Fapic

1. Introdução

A pele é responsável pela proteção do organismo, oferece uma barreira funcional, que limita as trocas com o ambiente e a penetração de substâncias exógenas (MACHET e BOUCAUD, 2002; WELLS, BASKETTER e SCHRÖDER, 2003). Dependendo de sua natureza, fármacos lipofílicos são absorvidos pelo estrato córneo, já fármacos hidrófilos são absorvidos quase que exclusivamente pelos poros de passagem (PIRES-DE-CAMPOS, 2004; WANG, et al, 2004)

As microemulsões (MEs) são definidas como uma emulsão transparente, termodinamicamente estáveis, apresentando um óleo ou fármaco lipofílico disperso em um meio aquoso, contendo um tensoativo e co-tensoativo. Possuem baixa viscosidade e apresentam glóbulos da fase interna com tamanho bem reduzido. (BENITA, 1999; ANSEL et al, 2000; OLIVEIRA, SCARPA e CERA, 2002; OLIVEIRA e SCARPA, 2001; POLIZELLI et al, 2006)

As MEs podem ser utilizadas como veículos, para favorecer a permeação cutânea de fármacos, pois interagem com o extrato córneo, desestruturando a camada lipídica (OLIVEIRA, SCARPA e CERA, 2002).

O US não se propaga no ar, assim os agentes acoplantes são utilizados, permitindo que o coeficiente de atenuação entre os dois meios se torne similar e quase toda intensidade seja transmitida, pois alguns acoplantes podem atenuar a energia irradiada (OKUNO, CALDAS e CHOW, 1986, GUIRRO, CANCELIERI e SANT'ANNA, 2001)

Quando o US é emitido em frequência entre 0,5 a 3 MHz ele gera efeitos físicos, biofísicos e terapêuticos (LACERDA, CASAROTTO e BALDAN, 2004). Os efeitos físicos podem ser divididos em mecânicos, térmicos e químicos. Estes efeitos físicos geram efeitos terapêuticos que favorecem a cicatrização, alivia dor, diminui espasmo muscular, rigidez articular entre outros (LACERDA, CASAROTTO e BALDAN, 2004).

Em estudo Machet e Boucaud (2002) demonstram que o US aplicado na pele pode causar lesões estruturais como degeneração das fibras colágenas, degradação de queratinócitos e irritabilidade na pele.

2. Objetivos

O presente trabalho teve como objetivos verificar a transmissividade do ultra-som terapêutico em sistemas microemulsionados, avaliar seus potenciais comedogênico, irritativo primário e cumulativo, na pele de coelhos, associado ou não a aplicação do ultra-som.

3. Desenvolvimento

Para medir a transmissividade do US nos sistemas microemulsionados, foi adotado a metodologia proposta por Guirro, Cancelieri e Sant'anna (2001).

Verificamos a calibração da intensidade do US na frequência de 3 MHz e uma potência de 0,8 W na balança de ultra-som digital modelo UPM-DT-10 OHMIC Instruments com água destilada e desgaseificada. A transmissividade foi medida pela porcentagem de transmissão das ondas US em relação à água, considerando a de $\pm 10\%$ no aparelho de US e de $\pm 0,07\%$ na balança. Foram realizadas 5 repetições de cada ME.

As MEs testadas eram compostas de: tensoativo (TE) Teg 12- Dimeticone, de copolímero glicol, água (H₂O) destilada e óleo (O) adipato de diisopropila, exceto para a ME 2, que foi utilizado silicone líquido (S)

- ME 1: Apresenta 60% TE, 10% O e 30% H₂O.
- ME 2: Formada por 60% TE, 10% S e 30% H₂O.
- ME 3: Tem 56,52% TE, 13,04% O e 30,43% H₂O.
- ME 4: Possui 56,52% TE, 4,34% O e 39,13% H₂O.
- ME 5: Contém 8,69% TE, 56,52% O e 34,78% H₂O.

A partir da análise da transmissividade do US foi escolhido as ME que não produziram atenuação do US.

Todo o trabalho seguiu as normas propostas pela ANVISA- Guia para avaliação de segurança de produtos cosméticos (2004).

O estudo do efeito das MEs na pele, associado ou não ao ultra-som, foi realizado em coelhos machos adultos, com peso de 2,0 a 3,0 Kg, que foram tricotomizados em 5 áreas no dorso um dia antes de iniciar os tratamentos. As áreas foram: Tratamento com ME 1, ME 1+US, somente ME 2, ME 2+US e o controle, que não sofreu nenhum tratamento.

Para o estudo *in vivo*, os animais foram divididos em 2 grupos com 5 animais cada. O primeiro grupo foi submetido a 15 dias de tratamento para os testes de comedogenicidade e de irritabilidade cumulativa. Já o segundo grupo foram tratados por 3 dias para análise da irritabilidade primária.

Os testes de comedogenicidade foram feitos na parte interna da orelha direita, que foi dividida em duas partes, na parte superior foi aplicado a uma microemulsão e na inferior outra microemulsão. A orelha esquerda serviu de controle.

Os testes de irritabilidade primária foram realizado com apenas uma aplicação dos tratamentos e oclusão

com um filme de PVC por 4 horas, após este período o produto foi retirado e graduado o eritema e edema das áreas em 4 e 72 horas após a aplicação, segundo a escala de Draize.

Os testes de irritabilidade cumulativa seguiram a metodologia da irritação dérmica primária, diferenciando-se apenas no número de aplicações que foram feitas (15 aplicações) e as análises realizadas diariamente e 24 horas após a última aplicação.

A escala de Draize foi utilizada para análise dos testes de irritabilidade primária e cumulativa, avaliando subjetivamente o eritema e edema presentes na pele, por 3 avaliadores independentes que não tinham conhecimento da avaliação de cada um. Os dados apresentados representam a média da graduação de eritema e edema destes avaliadores.

Para a análise da quantidade de comedões presentes na pele dos coelhos utilizamos a Lâmpada da Wood, sendo feitas leituras diárias e 24 horas após a última aplicação, verificando presença ou não de comedões. Para a avaliação foi utilizado o método de plantimetria por contagem de pontos (Mandarim-de-Lacerde, 1994) em que a porcentagem de áreas ocupadas foi calculada.

4. Resultados

Para a análise estatística da transmissividade do US nas MEs, foi realizada análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de Tukey.

Já a análise dos testes de comedogenicidade, irritação dérmica primária e cumulativa, foi utilizado o teste de Student Newman Keuls, pois no teste de normalidade nossa distribuição amostral apresentou-se normal.

O nível de significância considerado foi de 5%.

A análise da transmissividade da onda ultrassônica, demonstrou que as ME 1 e 2 obtiveram o melhor resultado, sendo escolhidas para o experimento.

No teste de comedogenicidade não observou-se nenhuma diferença estatística para nenhuma ME associada ou não ao US.

Os animais não apresentaram edema em nenhum dos testes de irritabilidade, portanto somente foi analisado o eritema pela escala de Draize.

Os resultados da análise de irritabilidade primária após 4 e 72 horas de aplicação dos tratamentos, também não demonstrou diferenças estatísticas.

Analisando todos os tratamentos juntos no teste de irritabilidade cumulativa, observou-se que todos os tratamentos foram estatisticamente diferentes do controle, promovendo eritema. Porém, a associação do US com as ME 1 e 2 produziram um eritema mais significativo que as mesmas preparações isoladamente, como mostra a tabela 1 e figura 1.

Analisando separadamente cada grupo, podemos avaliar a ação irritativa em relação ao tempo de tratamento. A ME 1 com US mostrou diferenças estatísticas entre os dias de tratamento, do 2º até o 15º dia foi diferente do controle, como mostra a tabela 2 e figura 2.

A tabela 3 e figura 3 mostram que no tratamento da ME 2 com US, a análise temporal de irritabilidade cumulativa apresentou diferenças estatísticas significativas, do 2º dia até 15º foi diferente do controle. É

possível observar que a partir do 10º dia houve um aumento na irritabilidade, mantendo-se assim até o 15º dia de tratamento.

Pela análise temporal de irritabilidade cumulativa do tratamento com a ME 1, observou-se diferenças estatísticas, comparados com o controle. O 2º dia foi diferente até o 15º, atingindo no 14º dia até o 15º dia de tratamento o pico de irritabilidade. Em relação à ME 2, houve diferenças estatísticas a partir do 2º dia de tratamento até o 15º, atingindo também seu pico de irritabilidade no 14º até o 15º dia de tratamento.

Atualmente, há no mercado veículos químicos e físicos, como a iontoforese e fonoforese, para facilitar a permeação de substâncias, já que é muito difícil penetrar substâncias através da pele.

A fonoforese é a permeação cutânea através do US. Segundo Mardegan e Guirro (2005) o meio de acoplamento para o US deve ser viscoso, com aspecto gel, com baixa atenuação e alta transmissividade (acima de 80%). Os meios de acoplamento podem atenuar a energia irradiada, sendo portanto muito importante selecionar o melhor material para esta função. (GUIRRO; CANCELIERI e SANT'ANNA, 2001). Nosso estudo selecionou a ME com menor número de bolhas de ar, viscosa, e na forma gel, conseguindo uma transmissividade média de 84,36%.

Outro fator presente no ultra-som é a cavitação, que é a geração, oscilação e colapso subsequentes de microbolhas gasosas dentro da pele, provavelmente, o principal mecanismo que poderia explicar o aumento da absorção percutânea (BOUCAUD et al, 2001). Tem-se também hipotetizado que a cavitação ocorre próxima da superfície do estrato córneo e gera uma desorganização temporária em sua camada bilipídica e dos corneócitos, criando canais transitórios, facilitando a absorção transdérmica (UEDA, SUGIBAYASHI E MORIMOTO 1995; MITRAGOTRI, BLANKSCHTEIN E LANGER 1996; MERINO ET AL, 2003)

No tratamento com as MEs isoladas percebeu-se uma irritabilidade cutânea, concordando com o estudo de Changez, Chander e Dinda (2006), que demonstra que altos níveis de óleo e tensoativos podem causar irritabilidade cutânea.

Machet e Boucaud (2002) demonstram que o US aplicado na pele pode causar lesões estruturais como degeneração das fibras colágenas e degradação de queratinócitos o que pode causar irritabilidade da pele.

Como o US promove uma maior absorção cutânea, uma substância com poder irritativo poderá ter isto potencializado com a associação do US, o que aconteceu em nosso experimento, uma vez que os tratamentos com MEs associados com ultra-som levaram a irritabilidade cutânea.

Já quando as MEs foram utilizadas em apenas uma aplicação com ou sem US, não foram capazes de causar irritabilidade cutânea.

Suspeitava-se que as MEs com altos níveis de óleo e tensoativos poderiam aumentar os comedões na pele, verificou-se que isto não ocorreu.

5. Considerações Finais

As MEs podem causar irritabilidade cutânea se utilizadas diariamente, principalmente associadas ao ultra-som. As MEs não provocam o aparecimento de comedões na pele, embora ainda sejam necessários mais estudos para analisar todos os efeitos que as podem causar na pele humana.

Referências Bibliográficas

ANSEL, H C.; POPOVICH, N. G.; ALLEN JUNIOR, L. V. **Formas farmacêuticas & sistema de liberação de fármacos**. São Paulo: Editorial Premier. 299-307. p.288-291, 2000

BENITA, S. Submicron emulsion in drug targeting and delivery. **Harwood academic**, Amisterdam, p. 338, 1999

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia para avaliação de segurança de produtos cosméticos**. Brasília, DF, 2002. 43p. Disponível em: www.anvisa.gov.br. Acesso em: 25 de outubro de 2004.

BOUCAUD, A; et al. In vitro study of low-frequency ultrasound-enhanced transdermal transport of fentanyl and caffeine across human and hairless rat skin. **International journal of pharm.** 288, p.69-77, 2001

CHANGEZ, M; CHANDER, J; DINDA, A.K. TRANSDERMAL PERMEATION OF TETRACAINE HYDROCHLORIDE BY LECITHIN MICROEMULSION:IN VIVO. **COLLOIDE AND SURFACE B. BIOINTERFACES**, 48, P.58-66, 2006

GUIRRO, R.R.J., CANCELIERI, A.S.; SANT'ANNA, I.L.; Avaliação dos meios intermediaries usados na aplicação do ultra-som terapêutico. **Rev. Bras. Fisioter.**, v.5, n.2, p.49-52 , 2001

LACERDA, F; CASAROTTO, R; BALDAN C. Utilização do ultra-som

terapêutico sobre regiões com implantes metálicos: uma revisão da literatura. **Fisioterapia em movimento**, v.17,n.1, p.31-38, 2004

MACHET, L; BOUCAUD, A. PHONOPHORESIS: EFFICIENCY, MECHANISMS AND SKIN TOLERANCE. **INT J PHARM.** AUG 28;243(1-2):1-15, 2002

MERINO, G. et al. Frequency and termal effects on the enhancement of transdermal transport by sonophoresis. **Journal of controlled release**.88, p.85-94, 2003

MITRAGOTRI, S.; BLANKSCHTEIN, D.; LANGER, R.; Transdermal drug delivery using low-frequency sonophoresis. **Pharmaceutical Research**, v.13, n.3, p.411-420, 1996

MANDARIM-DE-LACERDA,C.A Manual de quantificação morfológica:Morfometria, alometria e astereologia,2ª ed; Rio de Janeiro, p. 13, 1994

MARDEGAN, M.F; GUIRRO, R.R.J. Agentes de acoplamento de ultra-som terapêutico e fonoforese. **Fisioterapia Brasil**. V.6, n.2, p.211-216, 2005

OKUNO, E; CALDAS, H; CHOW, C; Física para ciências biológicas e biomédicas. São Paulo: Harbra; 1986

OLIVEIRA, A. G.; SCARPA, M.V.; Microemulsões I: Fundamentos teóricos da formação do sistema microemulsionado. **Infarma**, v.13, n.9-10, p. 73-79, 2001

OLIVEIRA, A. G.; SCARPA, M. V.; CERA, L. F. R. Microemulsões II: Aplicações de liberação de fármacos. **Infarma**, v.14, n.7-8, p.76-80, 2002

PIRES-DE-CAMPOS, M.S.M. **Influência do ultra-som na permeação cutânea da cafeína: Estudo em fragmentos de pele e em adipócitos isolados de suínos.** Campinas [Tese – Instituto de Biologia – Unicamp], 2004

POLIZELLI, M. et al. Formation and characterization of soy bean oil/surfactant/water microemulsions. **Physicochem.** 281, 230-236, 2006

WELSS, T; BASKETTER, D; SCHRÖDER, K. In vitro skin irritation:facts and future. State of the art review of mechanisms and models.**Toxology in vitro.** 18, 231-243, 2003

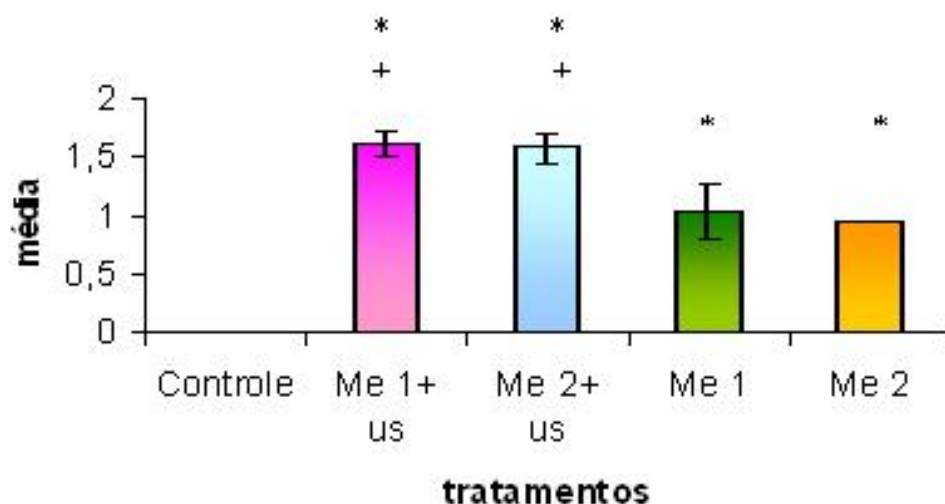
WANG, Y. et al. Transdermal iontophoresis: combination strategies to improve transdermal iontophoretic drug delivery.**European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics.** 60, 179-191, 2005

Anexos

Tabela 1. Média \pm erro padrão da média do eritema, da iritabilidade cumulativa, segundo a análise da escala de Draize, nos tratamentos com microemulsão (ME) 1 + ultra-som (US), microemulsão (ME) 2 + ultra-som (US), apenas microemulsão (ME) 1, microemulsão (ME) 2 e o controle. Os dados foram analisados por Student Newman Keuls ($p < 0,05$). Os valores seguidos por diferentes letras são estatisticamente diferentes

	médias	epm
Controle	0,0 ^a	0,0
ME 1+US	1,6 ^b	0,10
ME 2+US	1,5 ^b	0,12
ME 1	1,04 ^c	0,23
ME 2	0,96 ^c	0,17

$p = 0,0001$



* $p < 0,001$ comparado ao controle

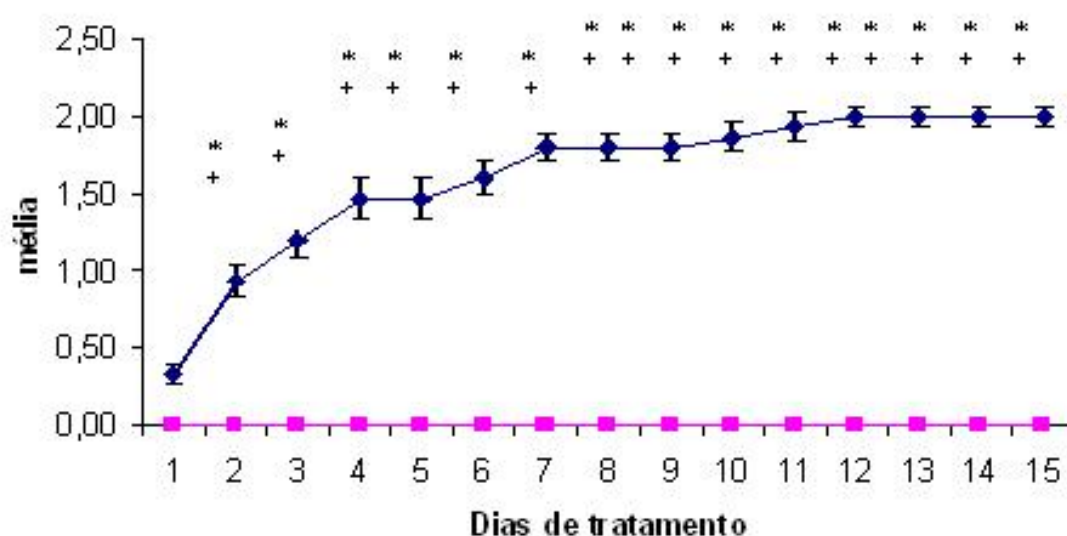
+ $p < 0,05$: comparado a ME 1 e 2

Figura 1. Média da iritabilidade cumulativa, eritema, na pele de 5 coelhos durante 15 dias de tratamento com a microemulsão 1 associado ao ultra-som (ME 1+ US), microemulsão 2 com ultra-som (ME 2+US), apenas microemulsão (ME) 1, microemulsão (ME) 2 e o controle.

Tabela 2. Média \pm erro padrão da média do eritema, da irritabilidade cumulativa, segundo a análise da escala de Draize, nos coelhos durante 15 dias de tratamento com microemulsão (ME) 1 + ultra-som (US).

Dias	média	epm
1º	0,40	0,09
2º	0,93	0,11
3º	1,26	0,14
4º	1,47	0,13
5º	1,47	0,13
6º	1,53	0,13
7º	1,80	0,08
8º	1,87	0,08
9º	1,87	0,08
10º	2,06	0,07
11º	2,20	0,05
12º	2,20	0,05
13º	2,20	0,05
14º	2,20	0,05
15º	2,20	0,05

p=0,0001



* p<0,05, comparado ao 1º dia

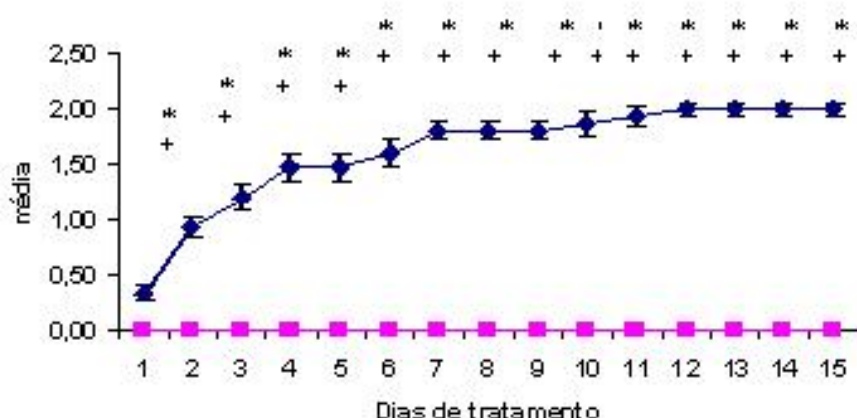
+ p<0,05, comparado ao controle

Figura 2. Média da irritabilidade cumulativa, eritema, na pele de coelhos (n=5) durante 15 dias de tratamento com a microemulsão 1 associado ao ultra-som (ME 1+ US).

Tabela 3. Média \pm erro padrão da média da irritabilidade cumulativa, segundo a análise da escala de Draize, nos coelhos, durante 15 dias de tratamento com microemulsão (ME) 2 + ultra-som (US).

Dias	média	epm
1º	0,33	0,06
2º	0,93	0,09
3º	1,20	0,12
4º	1,47	0,13
5º	1,47	0,13
6º	1,60	0,11
7º	1,80	0,08
8º	1,80	0,08
9º	1,80	0,08
10º	1,86	0,10
11º	1,93	0,09
12º	2,00	0,06
13º	2,00	0,06
14º	2,00	0,06
15º	2,00	0,06

$p=0,0001$



* $p < 0,05$, comparado ao 1º dia

+ $p < 0,05$, comparado ao controle

Figura 3. Média da irritabilidade cumulativa, eritema, na pele de coelhos ($n=5$) durante 15 dias de tratamento com a microemulsão 2 associado ao ultra-som (ME 2+ US).