

Desenvolvimento de Sistemas Microemulsionados: Estudo Histopatológico de seu Efeito na Pele

Autores

Gustavo Narvaes Guimaraes

Orientador

Maria Luiza Ozores Polacow

Apoio Financeiro

Fapic

1. Introdução

A pele humana é formada pela epiderme e pela derme, sendo que na epiderme localiza-se a camada ou estrato córneo, que é a maior barreira para a entrada de uma substância no corpo (RIEGER, 1993), responsável pela impermeabilidade da pele a muitos solutos. A conformação lipídica e a morfologia córnea podem ter uma importante função no controle de penetração dos componentes (MARJUKKA SUHONEN *et al.*, 1999; POTTS; FRANCOUER, 1991).

Marjukka Suhonem *et al.* (1999) revelam que a desordem no empilhamento da camada córnea provocada pelos promotores de permeação cutânea é um importante mecanismo para se acelerar tal processo. Dentre esses promotores podemos citar agentes químicos como os solventes (água, etanol, metil sulfóxido de alquila) ou surfactantes, até moléculas lipídicas que, acopladas ao ativo, aumentam sua lipossolubilidade (fitossomas) ou, ainda, veiculam os ativos (lipossomas) (SCHUELLER; ROMANOWSKI, 2000).

Pode-se também recorrer à agentes físicos com o propósito de se diminuir as barreiras da pele e assim acentuar a penetração cutânea (KOST *et al.*, 1989), sendo o Ultra-Som (US) um agente físico muito utilizado num processo denominado fonoforese ou sonoforese.

De acordo com Mitragotri *et al.* (1996), a cavitação é o principal mecanismo de promoção da fonoforese, já que ela induz a uma desordem na bicamada lipídica da camada córnea, reduzindo em 30% sua resistência à permeação.

As microemulsões (MEs), são constituídas por meio da combinação de uma fase aquosa, uma fase oleosa, um tensoativo e, quando necessário, co-tensoativos, que são responsáveis pela redução adicional da tensão interfacial formada pelo tensoativo gerando um sistema termodinamicamente estável (ANSEL *et al.*, 2000). Também, a adição de co-tensoativos torna-se importante como agente auxiliar na solubilização de substâncias ativas no sistema (CUNHA *et al.*, 2003; KREILGAARD, 2002). Ao contrário das emulsões clássicas, que geralmente possuem gotículas da ordem de micrômetros (μm), uma microemulsão possui

gotículas da fase interna na ordem de nanômetros (nm), podendo ser empregada como veículo que tende a favorecer a permeação cutânea de fármacos, quando estes são solubilizados na fase oleosa ou aquosa (OLIVEIRA *et al.*, 2002).

Entende-se por segurança de produtos tópicos a ausência razoável de risco de lesão significativa em condições de uso consideravelmente previsíveis, ou seja, define-se segurança em termos de probabilidade de que o produto não provoque danos significativos (ROMANOWSKI; SCHUELLER, 1996). Das reações adversas, a mais comum para formulações tópicas é a irritação, que pode ser definida como intolerância local podendo corresponder a reações de desconforto menores, mas também a reações mais ou menos agudas, variando sua intensidade, desde ardor, coceira, podendo chegar até a corrosão e destruição do tecido.

A evidência e interpretação desses possíveis efeitos indesejáveis no tecido cutâneo por meio de substâncias ativas devem ser realizadas por meio de uma avaliação histopatológica e histométrica, uma vez que permitem a análise da epiderme e da derme. Além disso, ainda pode auxiliar o delineamento experimental para a realização de estudos de eficácia na derme e no desenvolvimento de novos produtos cosméticos. (SILVA; MAIA CAMPOS, 2000; TADINI; MAIA CAMPOS, 2005).

Há na literatura poucos relatos sobre os efeitos das microemulsões na pele. Sabe-se que, em virtude das mesmas apresentarem muitas vezes grandes proporções de tensoativos, isto poderia levar a uma irritação local. Não há, também, trabalhos com fonoforese, associando microemulsões e US.

2. Objetivos

Verificar o efeito irritativo de sistemas microemulsionados na pele de coelhos, associados ou não ao ultra-som por meio de análises histopatológica e histométrica.

3. Desenvolvimento

Coelhos (n=5) machos adultos tiveram a superfície dorsal tricotomizada e isolada em 5 áreas de 8 cm de diâmetro cada uma e submetidas aos seguintes tratamentos diários durante 15 dias: Controle (C), Microemulsão S1 (S1= Silicone fluido de copolímero glicol, Poliéter funcional silixano, Água destilada), Microemulsão S1 + Ultra-Som (S1+US= 3 MHz, 0,1 W/ cm², 2 minutos, modo contínuo), Microemulsão S4 (S4= Adipato de Diisopropila, Poliéter funcional silixano, Água destilada) e Microemulsão S4 + Ultra-Som (S4+US). Após sacrifício com CO₂, fragmentos de pele foram fixados em formol 10% tamponado e tratados convenientemente para coloração por HE. Foram obtidos 3 cortes histológicos não seriados de 5 µm para cada lâmina, cinco lâminas por animal e com uma ocular milimetrada (ZEISS) foi medida a espessura da epiderme em 10 áreas para cada corte. Para a análise histopatológica utilizou-se o microscópio óptico de luz com objetiva de 40x e com uma microcâmera para digitalização das imagens transmitidas para o computador. Para cada corte histológico, obteve-se a densidade do número de fibroblastos, leucócitos, fibrócitos e vasos sanguíneos de três áreas (12600 µm² cada) da derme papilar com um software de análise de imagens histológicas (KS 400 2.0). Todas as medidas foram submetidas a análise da variância (ANOVA), e utilizado o teste F para verificar a diferença entre os tratamentos. O detalhamento da análise foi feito pelo teste de Tukey, considerando-se significativos os valores de $p \leq 0,05$.

4. Resultados

A ANOVA evidenciou diferença significativa entre os tratamentos ($p=0,0002$). O detalhamento da análise estatística, através do teste de Tukey ($p\leq 0,05$), referente a esses resultados está apresentado na Tabela 1.

Os resultados histométricos sobre a espessura da epiderme aqui apresentados mostraram (Tabela 1) que houve aumento significativo da epiderme tratada com as 2 microemulsões S1 e S4. Este trabalho confirma estudo de Dreher *et al.*, (1997), que indica aumento de liberação de droga utilizando microemulsão, alegando este fato à ruptura da organização lipídica do estrado córneo, de acordo com análises feitas em microscopia eletrônica.

Quando associadas ao ultra-som, as microemulsões S1 e S4 não mostraram diferenças significativas na espessura da epiderme, em relação aos tratamentos isolados. Embora superior no tratamento S4+US, ($p\leq 0,05$) a associação com o ultra-som não promoveu diferença significativa, comparada com o tratamento S4.

Em relação aos efeitos do ultra-som na pele relatados na literatura vale a pena citar Mitragotri *et al.* (1996), que aponta que a cavitação promovida pelo ultra-som induz a uma desordem na bicamada lipídica da camada córnea, reduzindo em 30% sua resistência à permeação. Estes efeitos podem-se associar com os encontrados com as microemulsões.

Os resultados da Tabela 2 representam a média e o desvio padrão da densidade do número de fibroblastos, leucócitos e fibrócitos nos diferentes grupos experimentais na derme papilar. Para fibroblastos, a ANOVA evidenciou diferença significativa entre os tratamentos ($p=0,0015$). Pela Tabela 2 pode-se observar um aumento do número de fibroblastos no tratamento com S1. Já com a microemulsão S4 não se observa diferença em relação ao controle. No entanto, quando se associa os tratamentos – microemulsão com ultra-som, tanto S1+US como o S4+US apresentam aumento significativo do número de fibroblastos. Este resultado evidencia um efeito do ultra-som, mais do que efeito isolado das microemulsões. Trabalho de Zhou *et al.*, 2004 evidenciou aumento do número destas células por proliferação, após uso sequencial de estímulos ultrasônicos, facilitando processos de cicatrização.

Estes resultados encontrados para fibroblastos no presente trabalho coincidem com os dos fibrócitos. Fibrócitos representam células inativas e quando entram em atividade passam a ser designadas de fibroblastos. O número de fibrócitos não apresentou nenhuma diferença em todos os tratamentos segundo a ANOVA ($p=0,2105$) e o Teste de Tukey ($p\leq 0,05$), isto é, nenhum deles provocou ativação destas células (Tabela 2).

Para leucócitos, a ANOVA evidenciou diferença significativa entre os tratamentos ($p=0,0109$). Leucócitos são células da defesa que aumentam em número num processo inflamatório. Os tratamentos com microemulsões isoladas, S1 e S4 não provocaram aumento do número destas células, evidenciando que as formulações não provocaram irritação na pele dos coelhos (Tabela 2). No entanto, nos tratamentos associados com o ultra-som, S1+US e S4+US, houve aumento significativo ($p\leq 0,05$) de leucócitos (Tabela 2).

Fyfe e Chahl (1984) investigando a ação do US terapêutico durante o processo inflamatório, observaram que o US nas frequências de 0,75, 1,5 e 3 MHz, mesmo no regime pulsado promove um aumento no extravasamento plasmático durante as primeiras 24 horas, mas secundariamente ocorre uma redução de tal evento. No presente trabalho, como o tratamento foi diário, durante 15 dias, é de se esperar que diariamente houve estímulo para a saída de leucócitos dos vasos sanguíneos. Este extravasamento de plasma não

resultou, no entanto, em alterações no número, bem como na área de vasos sanguíneos, já que a ANOVA não evidenciou diferença significativa entre os tratamentos ($p=0.5170$) para essa variável. O detalhamento da análise estatística, através do teste de Tukey ($p\leq 0,05$), referente a esses resultados está apresentado na Tabela 3.

5. Considerações Finais

Os tratamentos com as microemulsões S1 e S4 não provocaram irritação na pele. Desestruturaram a camada córnea, principalmente associadas com o ultra-som, aumentando a possibilidade de seu uso como veículo de difusão de fármacos na pele.

Referências Bibliográficas

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

CUNHA JUNIOR, A. S.; FIALHO, S. L.; CARNEIRO, L. B.; ORÉFICE F. Microemulsões como veículo de drogas para administração ocular tópica. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v.66, n.3, 2003.

DREHER, F.; WALDE, P.; WALTHER, P.; WEHRLI, E. Interaction of a lecithin microemulsion gel with human stratum corneum and its effect on transdermal transport. **J. Control. Release**, 45: 131-140, 1997.

FYFE, M.C.; CHAHL, L.A. Mast cell degranulation and increased vascular permeability induced by 'therapeutic' ultrasound in the rat ankle joint. **British Journal of Experimental Pathology**, v. 65, n. 6, p. 671-676, 1984.

KOST, J., LEVY, D., LANGER, R. Ultrasound as an transdermal enhancer. In: BRONAUGH, R. L., MAIBACH, H. I. **Percutaneous Absorption; Mechanism – Methodology – Drug Delivery**. 2.ed. revised and expanded. New York: Marcel Dekker, 1989.

KREILGAARD, M. Influence of microemulsions on cutaneous drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.54, n.1, p. 77-98, 2002.

MARJUKKA SUHONEN, T., BOUWSTRA, J. A., URTTI, A. Chemical enhancement of percutaneous absorption in relation to stratum corneum structural alterations. **J. Control. Release**, **59(2)**: 149-161, 1999.

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

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.

POTTS, R. O., FRANCOEUR, M. L. The influence of stratum corneum morphology on water permeability. **J. Invest. Dermat.**,**96**: 495, 1991.

RIEGER, Martin. Factors affecting absorption of topically applied substances. In: ZATZ, J. L. **Skin Permeation: Fundamentals and Application**. Wheaton, Allured Publishing Corporation, 1993. p.33-72.

ROMANOWSKI, P; SCHUELLER, R. Fundamentals of cosmetic product safety testing. **Cosmetics & Toiletries**, v.111, p.79-86, 1996.

SCHUELLER, R., ROMANOWSKI, P. Emulsões. **Cosm. Toil.**,**3(12)**: 71-74, 2000.

SILVA, G. M.; MAIA CAMPOS, P. M. B. G. histopathological, morfometric and stereological studies of ascorbic acid and magnesium ascorbyl phosphate in skin care formulation. **Int. J. Cosmet. Sci.**, Oxford, v.22, p.169-179, 2000.

TADINI, K.A.; MAIA CAMPOS, P. M. B. G. **Desenvolvimento e avaliação de formulações dermocosméticas contendo Dimetilaminoetanol (DMAE)**. Dissertação de mestrado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2005.

ZHOU, S., SCHMELZ, A., SEUFFERLEIN, T., LI, Y., ZHAO, J., BACHEN, M. G. Molecular Mechanisms of low intensity pulsed ultrasound in human skin fibroblasts. **The Journal of Biological Chemistry.**, v. 279, n 52, p. 54463-54469, 2004.

Anexos

Tabela 1 – Média e Desvio Padrão da espessura da epiderme (μm) dos diferentes grupos experimentais

| Grupos | Médias | Desvios Padrão |
|---------------------------|---------|----------------|
| Controle | 27,39 a | 6,98 |
| Microemulsão S1 | 46,94 b | 6,76 |
| Microemulsão S1+Ultra-Som | 47,92 b | 3,56 |
| Microemulsão S4 | 48,83 b | 5,48 |
| Microemulsão S4+Ultra-Som | 57,49 b | 4,58 |

Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si e médias seguidas de letras diferentes diferem entre si pelo Teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Tabela 2 – Média e Desvio Padrão do número dos diferentes tipos celulares encontrados na derme papilar numa área de 12600 μm^2 dos grupos experimentais, Controle, microemulsão S1 (S1), microemulsão S1+Ultra-Som (S1+US), microemulsão S4 (S4) e microemulsão S4+Ultra-Som (S4+US).

| | Fibroblastos | | Leucócitos | | Fibrócitos | |
|----------|--------------|--------------|------------|--------------|------------|--------------|
| | Médias | Desv. Padrão | Médias | Desv. Padrão | Médias | Desv. Padrão |
| Controle | 2,00 a | 0,23 | 0,44 a | 0,23 | 3,87 a | 0,51 |
| S1 | 2,79 bc | 0,51 | 0,81 ab | 0,13 | 3,59 a | 0,26 |
| S1+US | 2,72 bc | 0,35 | 1,00 b | 0,32 | 3,60 a | 0,19 |
| S4 | 2,22 ab | 0,41 | 0,82 ab | 0,20 | 3,68 a | 0,18 |
| S4+US | 3,04 c | 0,15 | 1,05 b | 0,19 | 3,94 a | 0,34 |

Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si e médias seguidas de letras diferentes diferem entre si pelo Teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Tabela 3 – Média e Desvio Padrão do número de vasos sauguíneos encontrados na derme papilar numa área de 12600 μm^2 dos grupos experimentais.

| Grupos | Médias | Desvios Padrão |
|---------------------------|--------|----------------|
| Controle | 1,10 a | 0,26 |
| Microemulsão S1 | 1,19 a | 0,46 |
| Microemulsão S1+Ultra-Som | 1,43 a | 0,42 |
| Microemulsão S4 | 1,24 a | 0,22 |
| Microemulsão S4+Ultra-Som | 1,28 a | 0,24 |

Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si e médias seguidas de letras diferentes diferem entre si pelo Teste de Tukey ($p \leq 0,05$).