



5º Simposio de Ensino de Graduação

AVALIAÇÃO DA IRRITABILIDADE PRIMÁRIA E CUMULATIVA DE SISTEMAS NANOESTRUTURADOS QUANDO ASSOCIADOS, OU NÃO, AO ULTRA-SOM ATRAVÉS DE AVALIAÇÃO CLÍNICA E HISTOLÓGICA.

Autor(es)

LARISSA DA SILVA BRIET

Co-Autor(es)

JULIANA MILANI SCORISA
GUSTAVO NARVAES GUIMARÃES
PAULA SOUZA PRESTES
MARIA CRISTINA ALMEIDA PRADO RIBEIRO
MARIA IMACULADA DE LIMA MONTEBELO
GISLAINE RICCI LEONARDI
MARIA LUIZA OZORES POLACOW

Orientador(es)

Maria Sílvia Mariani Pires de Campos

1. Introdução

Para uma formulação farmacêutica ser bem sucedida é necessário que ocorra a permeação da substância ativa até o tecido alvo em nível terapeuticamente relevante, sem causar desconforto ou efeitos colaterais ao paciente. À esse respeito, a administração transdérmica supera a administração oral, pois diminui a degradação do fármaco antes de entrar na circulação sistêmica, e aumenta o conforto do paciente (KREILGAARD, 2002). Porém, devido à função de barreira da pele, há limitação na escolha de uma formulação tópica, pois a mesma deve ser capaz de causar uma penetração cutânea suficiente do fármaco sem provocar alterações irreversíveis à essa função, a qual é de extrema importância para a proteção do organismo humano. Baseado neste princípio, um novo veículo tem sido estudado e descrito, com grande capacidade de aumentar a permeação cutânea tanto de substâncias hidrofílicas quanto lipofílicas. Esse veículo é conhecido como sistema nanoestruturado (KREILGAARD, 2002). Pelo fato dos sistemas nanoestruturados aumentarem a solubilidade e a estabilidade dos fármacos, são capazes de agir como sistema reservatório, que proporcionam atividade terapêutica mais intensa, por tempo prolongado; além de diminuir a toxicidade dos mesmos. Além disso, ele pode favorecer a permeação cutânea dos fármacos, devido o seu conteúdo em substância tensoativas, as quais interagem com o estrato córneo desestruturando

a bicamada lipídica (OLIVEIRA et al, 2004). O produto cosmético deve ser seguro para o usuário em condições de uso normais, com ausência razoável de risco de lesão. Entretanto, tem sido relatado efeitos secundários indesejáveis devido à utilização de produtos cosméticos. Entre eles está a irritação. (ROMANOWSKI, 1996; LACHAPELLE, 1994). Não há na literatura relatos sobre os efeitos que os sistemas nanoestruturados, podem causar na pele. Todavia, devido às grandes proporções de tensoativos, suspeita-se que possam causar uma irritação local. A transmissão transdérmica de fármacos pode ser realizada pelo uso do ultra-som (US), o que é denominado fonoforese. O US pode ser definido como uma onda mecânica longitudinal, cuja finalidade é transmitir energia através das vibrações das moléculas do meio pelo qual passa (GUIRRO e GUIRRO,2002). Os efeitos térmicos, mecânicos e químicos do US sobre o tecido, aceleram a difusão dos ativos presentes nos medicamentos para uso tópico (PIRES-DE-CAMPOS et al., 2007). Entre os efeitos mecânicos, a cavitação produz uma oscilação de partículas levando à formação de microbolhas gasosas que se rompem violentamente, desorganizando a bicamada lipídica da camada córnea, a qual se transforma numa fase fluida, permitindo a passagem do fármaco. Além da cavitação, ocorre, também, diminuição do potencial da membrana celular, o que leva à quebra das ligações intercelulares e conseqüentemente aumento da permeabilidade da membrana. O efeito térmico do US aumenta a energia cinética das moléculas do medicamento e da membrana celular; o que dilata os pontos de entrada; além de aumentar a circulação na área tratada, facilitando a difusão através da camada córnea até os capilares da derme. A indução de um grande número de reações de oxidação, inativação de enzima, aumento da atividade do trifosfato de adenosina são alguns dos possíveis mecanismos químicos do US (PIRES-DE-CAMPOS et al., 2007; POLACOW et al., 2005; POLACOW et al, 2004; PIRES-DE-CAMPOS, 2004; KASSAN et al., 1996). Segundo Draelos (1999) a irritação de um produto depende também da condição intacta da camada córnea. Se a barreira estiver danificada o produto que não era irritante pode tornar a sê-lo. Assim, o US poderia aumentar a irritação que o próprio sistema nanoestruturado já causaria por conter muito tensoativo e por ser muito oleoso, uma vez que uma das alterações que o US promove é a alteração da pele.

2. Objetivos

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial irritativo de sistemas nanoestruturados na pele associados, ou não, a aplicação do US através de avaliação clínica e histológica.

3. Desenvolvimento

Seguindo as normas do “Guia para Avaliação de Segurança dos Produtos Cosméticos” (ANVISA, 2002), o estudo do efeito das formulações na pele foi realizado em coelhos machos adultos, com peso de 2,0 a 3,0 Kg. Um dia antes de iniciar os tratamentos foi realizada a tricotomia de cinco áreas no dorso dos animais, as quais foram divididas em: controle; tratado com Sistema 1 (S1) (60% de tensoativo Teg 12-Dimeticone, 10% de óleo adipato de diisopropila, 30% de água destilada); tratado com S1 + US; tratado com Sistema 2 (S2) (60% de tensoativoTeg 12- Dimeticone, 10% óleo silicone fluído de copolímero glicol e 30% água destilada); tratado com S2 + US.

Os animais foram divididos em 2 grupos de 5 animais cada, sendo que no primeiro grupo os animais foram submetidos a 15 dias de tratamento para análise do teste de irritabilidade cumulativa . No segundo grupo foram tratados por 3 dias para análise da irritabilidade primária. A análise da irritabilidade foi submetida à avaliação clínica através da graduação pela escala de Draize (1944), a qual avalia subjetivamente o eritema e edema presentes na pele, com uma graduação de 1 a 4 graus para cada um deles. Para eritema descreve a seguinte graduação: grau 1 – eritema muito leve; grau 2 – eritema bem definido; grau 3 – eritema de moderado a severo; grau 4 – eritema severo com ligeira formação de escara. Para edema segue a graduação: grau 1 – edema muito leve; grau 2 – edema leve (borda da área bem definida por elevação definitiva); grau 3 – edema moderado (área elevada aproximadamente 1 mm); grau 4 – edema severo (elevação maior que 1 mm e extensão além da área de exposição).

Foi verificado a calibração da intensidade do US na frequência de 3 MHz em balança de ultra-som digital (modelo UPM-DT-10 OHMIC Instruments) com água destilada e desgaseificada. Nos tratamentos dos

animais, o US for regulado a uma frequência de 3 MHz; intensidade de 0,2 W/cm²; modo de emissão contínuo e tempo de aplicação de 1 min/cm².

Todas as análises foram feitas por três pesquisadores diferentes, sendo que nenhum deles teve contato com as análises dos demais.

Para a análise histopatológica, após sacrifício por CO₂, as áreas tratadas foram removidas e fixadas em solução de formol tamponado a 10% por 48 horas e tratadas para inclusão em Paraplast Plus e coloração em Hematoxilina Eosina. Foram obtidos 3 cortes histológicos de 5 µm de profundidade para cada lâmina, sendo cinco lâminas por animal. Utilizou-se o microscópio óptico de luz (Zeiss Axiolab, ZEISS, Alemanha) com lente objetiva em aumento de 40x e com uma microcâmera (Sony CCD IRIS / RGB COLOR, Japão), responsável pela digitalização das imagens histológicas 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 escolhidas aleatoriamente com o auxílio de um software de análise de imagens histológicas (KS 400 2.0 – Kontron Eletronics, Munique, Alemanha).

Para análise estatística da irritabilidade primária utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis; o teste de Friedman, seguido de Rank para irritabilidade cumulativa e ANOVA – F (ONE – WAY), seguido do Teste post - hoc de Tukey para análise histopatológica. Para todas as análises considerou-se nível de significância igual à 5%.

4. Resultados

Os resultados da análise de irritabilidade primária após 4 e 72 horas de aplicação dos tratamentos em relação ao eritema, demonstraram que não houve diferença estatisticamente significativa em nenhum dos tempos analisados, bem como em relação ao edema local, onde também não se evidenciou a presença do mesmo (Tabela 1). O teste de irritabilidade cumulativa demonstrou que não existiu edema nas áreas submetidas aos tratamentos; e com relação à presença de eritema, a análise separada de cada grupo mostrou, que: o tratamento do S1 + US apresentou diferença estatística a partir do 10^o dia de tratamento; no tratamento do S2+ US, houve a presença de diferença estatística a partir do 11^o dia de tratamento; somente S1, houve diferença estatística a partir do 12^o dia; somente S2, apresentou diferença estatística a partir do 12^o dia (Tabela 2). A análise histológica demonstrou que os tratamentos que utilizavam apenas os sistemas nanoestruturados não provocam aumento do número de leucócitos. Entretanto, os tratamentos que associaram o US à aplicação das formulações, apresentaram aumento significativo do número de leucócitos em relação ao controle. A análise de fibroblastos demonstrou um aumento no número dos mesmos no tratamento com S1 comparando-a com o controle, o que não ocorreu com o S2. Porém, quando houve associação do US com as formulações, tanto o S1 quanto o S2 apresentaram aumento significativo do número de fibroblastos. Com relação ao número de fibrócitos não foi evidenciado diferença estatística significativa nos diferentes tratamentos (Tabela 3). Para a variável vasos sanguíneos, também não houve diferença significativa entre os tratamentos.

A influência do US na transmissão transcutânea de fármacos foi comprovada por Rosim et al (2004), os quais compararam a penetração transcutânea de diclofenaco sódico na forma de gel tópico associado (aplicação com US ligado) ou não a aplicação prévia do US (aplicação com US desligado), em humanos sadios. Amostras de sangue coletadas imediatamente antes, 60, 120 e 180 minutos após a aplicação do gel mostraram que a massa de diclofenaco no plasma foi significativamente mais alta após a aplicação do US se comparada ao procedimento placebo. Assim, os autores concluíram que a aplicação do US antes da aplicação do gel de diclofenaco facilita a penetração transcutânea do medicamento. No tipo de tratamento que aplicou apenas as formulações (S1 ou S2), embora a análise estatística mostre diferença significativa, não houve irritabilidade cutânea de acordo com o escore da escala de Draize (1944), que considera irritação moderada quando o escore entre edema e eritema estiver entre 2 e 5, fato este confirmado pela análise histológica, a qual mostrou que não houve aumento no número de leucócitos, nos tratamentos que utilizaram as formulações isoladas. Este resultado é contrário ao estudo de Changez, Chander e Dinda (2006), os quais dizem que os 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. Assim, o US também pode causar irritabilidade da pele. Esses resultados corroboram com o nosso, uma vez que os tratamentos com os sistemas

nanoestruturados associados ao US (S1 + US ou S2 + US) levaram à irritabilidade cutânea cumulativa, a partir do 7º dia de tratamento segundo o escore da escala de Draize. Podemos considerar que houve uma potencialização da ação irritativa neste tipo de tratamento. Este resultado também foi confirmado pela análise histológica, a qual detectou aumento significativo do número de leucócitos nos grupos associados ao US em relação ao grupo controle.

5. Considerações Finais

Os sistemas nanoestruturados aplicados isoladamente não ocasionam irritabilidade cutânea primária, nem cumulativa, segundo escore de Draize. Entretanto, a associação com US pode causar irritabilidade cutânea cumulativa, devendo, portanto, ser evitada a fonoforese com estas formulações durante vários dias consecutivos.

Referências Bibliográficas

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: 12 de outubro de 2006.

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

DRAELOS, Z.D. **Cosméticos em dermatologia**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Revinter, 1999.

DRAIZE, J.H. et al. Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v. 82, p. 377-390, 1944.

GUIRRO, R.R.J.; GUIRRO, E.C.O. **Fisioterapia Dermato-Funcional**. 3.ed. São Paulo: Manole, 2002

KASSAN, et al. Physical enhancement of dermatologic drug delivery: iontophoresis and phonophoresis. **J Am Acad Dermatol** 1996; 34 (4)

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

LACHAPELLE, J.M. Toxicidade orgânica e geral. In: Pruniéras, M. **Manual de Cosmetologia Dermatológica**. 2.ed. São Paulo: Andrei Editora,. 397, 325-356. 1994

Machet, L; Boucaud, A. Phonophoresis: efficiency, mechanisms and skin tolerance. **Int J Pharm**. Aug 28;243(1-2):1-15, 2002

OLIVEIRA, A.G.; SCARPA, M.V.; CORREIA, M.A.; CERA, L.F.R; FORMARIZ, T.P. Microemulsão: estrutura e aplicações como sistema de liberação de fármacos. **Química Nova**, v.27, n.01, p.131-138, 2004.

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.

PIRES-DE-CAMPOS, et al. Influence of the ultrasound in cutaneous permeation of the caffeine: in vitro study. **Pharmacologyonline**, 1:477-486(2007)

POLACOW, M. L. O. et al. Eleito do ultra-som na permeação cutânea do tiratrico: análise histológica. **Rev. Brasileira de Fisioterapia.**8(1):53-60, 2004

POLACOW, M.L.O et al. Efeito do ultra-som e do D-Pantanol na regeneração tegumentar. **Revista Brasileira de Fisioterapia.**, v. 9, n. 3, p. 365-371, 2005.

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

ROSIM, G.C.; BARBIERI, C.H.; LANÇAS, F.M. Influência da aplicação prévia do ultra-som terapêutico na penetração cutânea de diclofenaco sódico em humanos sadios. **Revista Brasileira de Fisioterapia.**, v. 8, n. 2, p. 129-135, 2004.

Anexos

Tabela 1. Mediana do eritema, na irritabilidade primária, segundo a análise da escala de Draize, após 4 e 72 horas de tratamento com sistema nanoestruturado 1 (S1) + ultra-som (US), sistema nanoestruturado 2 (S2) + ultra-som (US), sistema nanoestruturado 1 (S1), sistema nanoestruturado 2 (S2) e controle.

Grupos	Medianas – 4 horas	Medianas – 72 horas
S1 + US	1,0	0,0
S2 + US	0,66	0,0
S1	0,0	0,0
S2	0,33	0,0
Controle	0,0	0,0

p = 0,06 para irritabilidade primária após 4 horas; e p = 0,21 para irritabilidade primária após 72 horas (valores descritos pelo teste de Kruskal-Wallis).

Tabela 2. Mediana (Md) e Soma dos Ranks (SR) do eritema, na irritabilidade cumulativa, segundo a análise da escala de Draize, nos tratamentos com sistema nanoestruturado 1 (S1) + ultra-som (US), sistema nanoestruturado 2 (S2) + ultra-som (US), sistema nanoestruturado 1 (S1), sistema nanoestruturado 2 (S2) e o controle.

Dia	S1 + US*	S2 + US*	S1*	S2*	Controle
	Md (SR)	Md (SR)	Md (SR)	Md (SR)	Md (SR)
1	0,33 (5) a	0,33 (5) a	0 (7,5) a	0,33 (8) a	0 (0)
2	1 (10,5) b	1 (12)	0,66 (15) b	0,33 (12,5) b	0 (0)
3	1 (19)	1 (15)	0,66 (18)	0,66 (14)c	0 (0)
4	1,33 (26,5)	1,33 (29)	1 (24)	1 (24,5)	0 (0)
5	1,33 (26,5)	1,33 (29)	1 (24)	1 (27)	0 (0)
6	1,66 (28)	1,66 (35)	1 (26)	1 (27)	0 (0)
7	2 (36)	2 (44)	1 (36,5)	1 (32)	0 (0)
8	2 (40,5)	2 (44)	1 (42,5)	1 (43)	0 (0)
9	2 (40,5)	2 (44)	1,33 (51,5)	1,33 (51,5)	0 (0)
10	2 (56) a	2 (50)	1,33 (52,5)	1,33 (51,5)	0 (0)
11	2,33 (62,5) a,b	2 (56) a	1,33 (56,5)	1,33 (54,5)	0 (0)
12	2,33 (62,5) a,b	2 (59,5) a	1,33 (58,5) a	1,33 (58) a	0 (0)
13	2,33 (62,5) a,b	2 (59,5) a	1,33 (60,5) a	1,33 (60,5) a	0 (0)
14	2,33 (62,5) a,b	2 (59,5) a	1,66 (64) a,b	1,66 (68) a,b,c	0 (0)
15	2,33 (62,5) a,b	2 (59,5) a	1,66 (64) a,b	1,66 (68) a,b,c	0 (0)

Letras iguais indicam diferença estatística entre os dias ($p < 0,05$), pelo Teste de Rank.

* p valor apresentado na análise Teste de Friedman, $p < 0,0001$

Tabela 3. Média e Desvio Padrão do número dos diferentes tipos celulares encontrados na derme papilar numa área de 12600 μm^2 dos grupos experimentais, controle, sistema nanoestruturado 1 (S1), sistema nanoestruturado 1 (S1) + Ultra-Som (US), sistema nanoestruturado 2 (S2); sistema nanoestruturado 2 (S2) + Ultra-Som (US).

	Fibroblastos *(p=0,0015)		Leucócitos *(p=0,0109)		Fibrócitos *(p=0,2105)	
	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
S2	2,22 ab	0,41	0,82 ab	0,20	3,68 a	0,18
S2+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 ($p \leq 0,05$).

* p valor de ANOVA F