

Avaliação da difusão e permeação cutânea *in vitro* de acetato de hidrocortisona tópica comercial

C. Dutra¹; P. Bianchetti²; S. Stulp¹

¹ Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas, Centro Universitário UNIVATES, 95900-000, Lajeado – RS, Brasil

² Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Centro Universitário UNIVATES, 95900-000, Lajeado – RS, Brasil

stulp@univates.br

(Recebido em 10 de maio de 2013; aceito em 21 de outubro de 2013)

O acetato de hidrocortisona é um corticoide de uso tópico que trata de maneira muito eficiente as dermatites. Porém, sua eficiência na terapia tópica está relacionada aos processos de liberação e permeação nas camadas da pele. No presente trabalho, foram feitos ensaios *in vitro* utilizando o modelo de Células de Franz para determinar a difusão do fármaco com membrana de acetato de celulose, bem como sua permeação com biomembrana de estrato córneo de muda de cobra da espécie *Boa constrictor*. Todas as alíquotas foram analisadas por espectrofotometria ultravioleta visível (UV/Vis). O estudo de difusão e permeação revelou boa uniformidade entre os três lotes do produto avaliado. Em termos de coeficiente de permeabilidade, verifica-se que houve maior quantidade de hidrocortisona difundida do que permeada, em que o Kp do acetato de celulose foi de 0,0340 cm min⁻¹ e o Kp do biomembrana foi de 0,0027 cm min⁻¹.

Palavras-chaves: acetato de hidrocortisona; difusão; permeação.

Evaluation of release and permeation to the topic hydrocortisone acetate

The hydrocortisone acetate is a topical corticosteroid which is very efficiently dermatitis. However their efficiency in topical therapy is related to processes of release and permeation in the skin layers. In this study, were made *in vitro* tests using Franz Cells Model to determine the diffusion of the drug with cellulose acetate membrane, and its bio-membrane permeation of stratum corneum molting snake species *Boa constrictor*. All aliquots were analyzed by spectrophotometry ultraviolet visible (UV / Vis). The study of diffusion and permeation showed good uniformity between the samples of the product evaluated. In these studies, the permeability coefficient in release systems is greater than in permeability systems, where Kp cellulose acetate was 0.0340 cm min⁻¹ and Kp bio-membrane was 0.0027 cm min⁻¹.

Keywords: hydrocortisone acetate, diffusion, permeation.

1. INTRODUÇÃO

A dermatite de contato é uma dermatose causada por substâncias do ambiente que entram em contato com a pele¹. Vários elementos podem ser responsáveis pela dermatite de contato, entre eles: medicamentos, cosméticos, agentes ocupacionais e inseticidas (DDT)¹. Podem se manifestar eczemas em sua fase aguda, subaguda ou crônica na região do corpo do paciente¹.

Os principais fármacos atuantes na inflamação da dermatite de contato são: corticosteroides, metotrexato, ciclosporina, pimecrolimus e tacrolimus¹. Os corticoides tópicos são considerados os produtos dermatológicos com maior frequência nas prescrições médicas e há mais de 50 anos têm exercido importante papel no tratamento de inúmeras doenças nas quais estão envolvidos mecanismos imunes e inflamatórios, inibindo seus mediadores².

O acetato de hidrocortisona (Figura 1) pertence à categoria dos adrenocorticoides e possui ação anti-inflamatória. Sua fórmula molecular é C₂₃H₃₂O₆, com peso molecular igual a 404,5 g/mol. Apresenta-se na forma de um pó branco ou quase branco, inodoro, insolúvel em água. Uma parte dissolve-se em 230 partes de álcool etílico ou em 150 partes de clorofórmio e seu ponto de fusão é cerca de 220°C³.

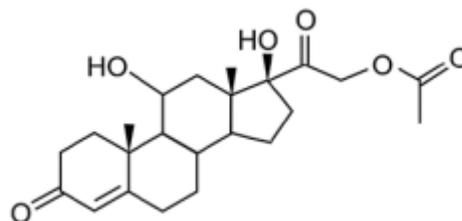


Figura 1: Estrutura molecular do acetato de hidrocortisona³

O acetato de hidrocortisona é indicado para os vários tipos de dermatites: de contato, eczema atópicos, dermatites numular, dermatite de estase, disidrose, dermatites seborreicas, psoríase, picadas de inseto e queimaduras de 1º grau⁴.

Os fármacos de administração tópica tanto podem agir no local da aplicação como podem produzir efeito sistêmico⁵. A absorção do fármaco pela pele é ampliada se conter o coeficiente de partição lipídio/água favorável e se for não eletrolítico⁵. Os fármacos absorvidos penetram na pele através dos poros, das glândulas sudoríparas, dos folículos pilosos, das glândulas sebáceas e de outras estruturas anatômicas da superfície da derme⁵. Os cremes são definidos como “emulsões líquidas viscosas ou semi-sólidas do tipo óleo em água ou água em óleo”⁵. Os cremes evanescentes são emulsões de óleo em água que contêm grande percentual de água e ácido esteárico⁵. Após a aplicação, a água evapora, deixando um fino filme residual de ácido esteárico⁵.

A pele é o maior órgão do corpo humano e é constituída por uma camada de células superficiais chamada epiderme, a derme que é intermediária e uma camada profunda de tecido conjuntivo, a hipoderme^{6,2}. A epiderme é composta por tecido epitelial estratificado queratinizado, a derme tem ação reguladora sobre a morfogênese e diferenciação epidérmica e a hipoderme contém as glândulas sudoríparas, vasos sanguíneos e linfáticos e os nervos cutâneos². A camada profunda, mais organizada, é uma camada de tecido conjuntivo denso que reveste as estruturas profundas (por exemplo, os músculos)⁶. A epiderme é constituída por um epitélio estratificado pavimentoso queratinizado derivado do ectoderma e este, por quatro populações de células: queratinócitos, melanócitos, células de Langerhans e células de Merkel⁷. Devido à citomorfose dos queratinócitos durante a sua migração da camada basal de epiderme até a sua superfície, temos morfologicamente cinco zonas distintas na pele: estrato basal (germinativo) - a mais interna de todas -, estrato espinhoso, estrato granuloso, estrato lúcido e estrato córneo⁷.

O estrato córneo é a camada mais superficial da pele, possui numerosas camadas de células achatadas, queratinizadas, com um plasmalema espessado, as quais não possuem núcleo nem organelas, porém possuem filamentos de queratina embebidos na matriz amorfa. As células mais afastadas da superfície da pele mostram desmossomas; já as mais próximas são chamadas de células escamosas ou cornificadas, não apresentam desmossomas e estão prestes a ser descamadas^{7,8}.

O estrato córneo de pele de cobra vem sendo sugerido como opção na avaliação de permeação *in vitro* devido à facilidade de obtenção e similaridade com a pele humana⁹. Em estudos realizados com a pele da *Boa constrictor* foram identificadas camadas celulares: β-queratinas (mais externa), α-queratinas, mesos-queratinas, estruturas multilamelar e camada lipídica intercelular^{9,10}. Ainda existe grande similaridade na permeabilidade da água entre a pele de cobra e o estrato córneo humano⁹. Também há semelhança na composição lipídica do estrato córneo humano e da pele de cobra, principal barreira para a penetração da água. Ácidos graxos com cadeia contendo 16 e 18 átomos de carbono são predominantes⁹.

Pode-se definir difusão como sendo o processo de transferência de massa de moléculas individuais de uma substância, por meio de movimentos moleculares aleatórios associados a gradientes de concentração¹¹. O fluxo das moléculas pode ocorrer por meio de membranas físicas ou biológicas¹¹. Um exemplo de difusão molecular simples ocorre no transporte de um fármaco por meio de uma membrana polimérica envolvendo sua dissolução na matriz da membrana¹¹. A verificação da primeira lei de Fick da difusão mostra que o feito máximo pode ser obtido se o excipiente da formulação permear o estrato córneo, ou seja, se ocorrer a transferência de massa^{11, 8}. O estrato córneo é intercalado na sua estrutura lipídica, o que provoca a destruição do seu empacotamento. Logo há maior fluidez e, portanto, pode aumentar o coeficiente de difusão do fármaco^{11, 8}. A permeabilidade do fármaco é controlada somente pelo estrato córneo: quanto mais hidratado o estrato córneo melhor será a permeabilidade¹¹.

O presente trabalho teve por objetivo realizar estudos relacionados à difusão e permeabilidade de um fármaco, o acetato de hidrocortisona, em ensaios *in vitro*, com membrana

sintética e biológica. Foca, principalmente, a permeabilidade do estrato córneo da pele de cobra, por meio das Leis de Fick. Ainda verifica a qualidade de produtos e contribui também para posteriores pesquisas nessa área do conhecimento.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Para as análises foi selecionado o produto farmacêutico Berlison®, fabricado por Newprod S.A.I.C, Buenos Aires-Argentina, importado por Bayer S.A. e registrado por Intendis do Brasil Farmacêutica Ltda. na forma de creme e concentração de 10 mg g^{-1} , disponível nas farmácias e drogarias, medicamento de referência nacional conforme Lei 9.787/99¹². Foram utilizados três lotes diferentes do mesmo produto (lote 446, lote 447 e lote 449). Cada grama de Berlison® contém 11,2 mg de acetato de hidrocortisona (equivalente a 10 mg de hidrocortisona) e como excipientes tem-se: estearato de polioxil 40, álcool estearílico, petrolato líquido, petrolato branco, edetato sódico, carbômer, hidróxido de sódio, metilparabeno, propilparabeno e água purificada.

A partir do princípio ativo acetato de hidrocortisona da marca Pharma Nostra, lote 10114719A, foram feitas soluções de trabalho com concentrações de 1 mg L^{-1} ; 5 mg L^{-1} ; 13 mg L^{-1} ; 23 mg L^{-1} ; 33 mg L^{-1} e 42 mg L^{-1} . O acetato de hidrocortisona foi diluído em álcool etílico absoluto, já que o acetato de hidrocortisona é insolúvel em água, sendo em seguida realizado uma varredura de 190 a 900 nm em espectrofotômetro UV/Vis (com $\lambda_{\text{max}} = 254 \text{ nm}$), com a finalidade de determinar o pico de maior absorvância. A partir dessa determinação, partiu-se para a construção da curva de calibração. A solução de calibração usada na leitura foi o etanol (branco). Após esse procedimento as absorvâncias das demais soluções foram determinadas. Os dados foram tratados pelo *software* Origin®. A fim de avaliar a reprodutibilidade do processo, a técnica foi realizada em triplicata.

As análises de difusão e permeação *in vitro* foram realizadas em uma célula de difusão vertical tipo Franz, contendo uma membrana de acetato de celulose (Sartorius Stedim Biotech com porosidade de $0,45 \mu\text{m}$) e biomembrana de muda de pele de cobra (*Boa constrictor*), cedida pelo Museu de Ciências Naturais da Univates. A área exposta de ambas as membranas foi de $4,91 \text{ cm}^2$, sendo este valor usado na determinação do fluxo (J) de liberação e permeação do produto analisado.

As biomembranas foram reidratadas com uma solução de azida sódica na concentração de 0,002% e permaneceram expostas nesta solução por um período de 48 horas. Antes da realização dos ensaios de permeabilidade todas as biomembranas foram lavadas com água destilada¹³.

A célula vertical tipo Franz apresenta um compartimento doador e outro receptor, que foi preenchido com uma solução receptora (álcool etílico absoluto) capaz de criar uma condição de não saturação do sistema. Entre os compartimentos foi colocada a membrana artificial (acetato de celulose) ou biológica (estrato córneo). Para simular a temperatura corpórea, a célula foi introduzida em banho ultratermostatizado (MA-083 Marconi) pré-aquecido a 37° C . Sobre a região da membrana de acetato de celulose e estrato córneo exposto foi adicionado o agente doador (Berlison®).

Na avaliação da liberação e permeação cutânea *in vitro*, foram realizadas análises de varreduras espectrofotométricas (190 a 990 nm, com $\lambda_{\text{max}} = 254 \text{ nm}$) de alíquotas retiradas da célula de difusão a cada 10 minutos, para a verificação da presença do substrato na solução receptora. Os resultados foram obtidos por meio de um espectrofotômetro Cary 100 Bio UV/Vis Varian. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Alguns testes realizados em laboratório permitem o melhor entendimento de mecanismos de ação de produtos de uso dermatológico, podendo ser realizados *in vitro*¹⁵.

Vários trabalhos já foram publicados empregando as células de Franz, atestando sua eficácia na realização de teste de difusão e permeação *in vitro* de fármacos de uso dermatológico^{8,14,15}, ainda tendo como vantagem a aplicabilidade da primeira lei de Fick¹⁵. Por meio da aplicação da primeira lei de Fick da difusão, pode-se obter um efeito máximo se o excipiente da formulação permear o estrato córneo⁸.

Na Figura 2, plotaram-se os valores da absorvância obtidos no espectrofotômetro UV/Vis para o acetato de hidrocortisona em diferentes concentrações. Por meio desses valores obteve-se a equação da reta. A curva obtida foi $f(x) = 0,01703.x + 0,05462$, com $R^2 = 0,95852$, tendo sido

a partir dela possível determinar a concentração difundida e permeada para cada amostra analisada. Percebe-se ainda que a reta apresenta tendência linear e crescente, aumentando a absorvância à medida que a concentração da solução aumenta.

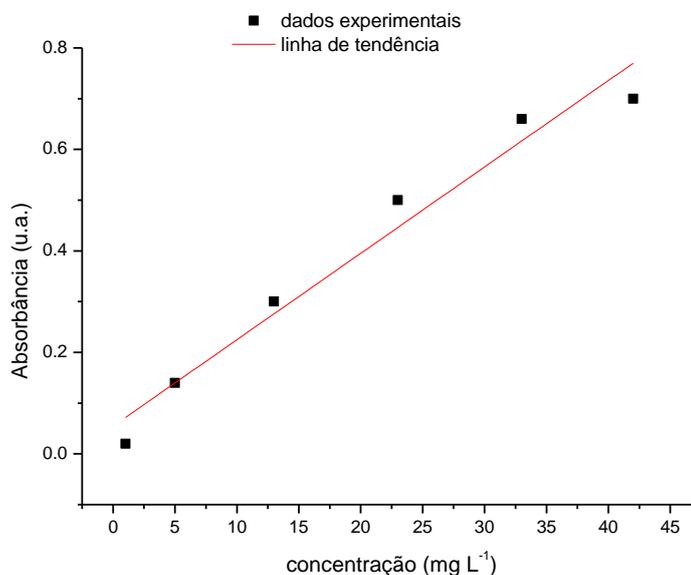


Figura 2: Curva da absorvância versus concentração do acetato de hidrocortisona

Para a obtenção de bons resultados de difusão e permeabilidade, é necessário que ocorra a afinidade do fármaco em relação ao veículo utilizado, pois serão determinantes na obtenção da taxa de liberação do mesmo¹⁶.

As Figuras 3 e 4 representam, respectivamente, a curva de difusão e permeabilidade *in vitro* realizada com a membrana de acetato de celulose e biomembrana, seguindo ambas uma cinética de ordem zero crescente.

Os resultados obtidos, para o estudo realizado, com membrana de acetato de celulose e biomembrana indicam que o fluxo de partículas é proporcional ao gradiente de concentração, conforme a primeira lei de Fick.

Para a obtenção dos parâmetros de liberação e permeação no sistema analisado, sendo ele isotrópico e apresentando propriedades difusionais em todas as direções, utilizou-se a primeira lei de Fick, seguindo-se o modelo de dose infinita, em que o gradiente de concentração é constante, e conseqüentemente a concentração de fármaco do compartimento doador também o será¹⁵.

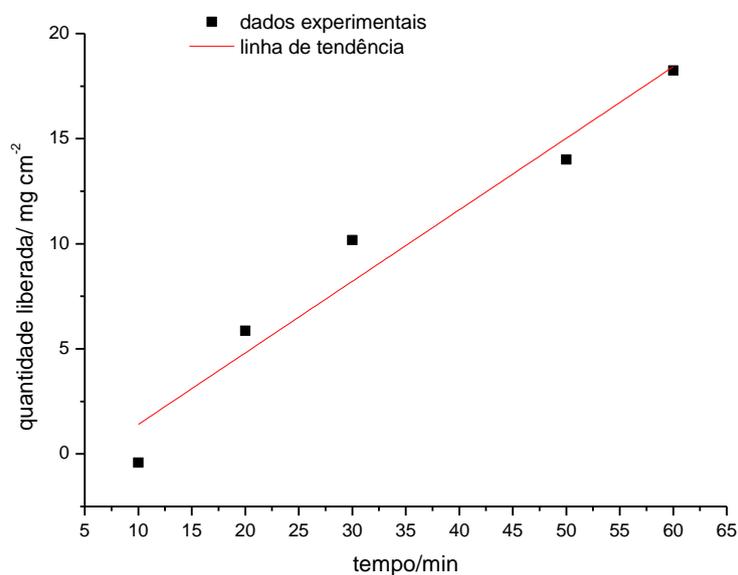


Figura 3: Quantidade liberada de acetato de hidrocortisona em membrana sintética de acetato de celulose

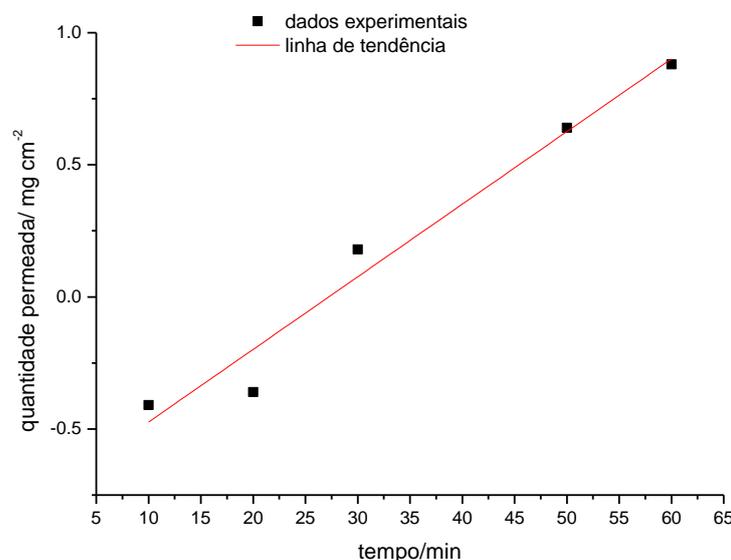


Figura 4: Quantidade permeada de acetato de hidrocortisona em biomembrana de estrato córneo

O fluxo (J) foi calculado no estado estacionário a partir da porção linear da quantidade liberada por área *versus* tempo¹⁷. Os valores obtidos para os ensaios de liberação e permeação foram, respectivamente, 0,34 mg cm⁻² e 0,027 mg cm⁻². Comparando esses valores com os de trabalhos já publicados na literatura^{18,19}, em que foi avaliada a permeação de acetato de hidrocortisona em membranas de silicone, consideradas adequadas em relação à simulação do estrato córneo humano²⁰, verifica-se que, com as devidas conversões de unidades, os valores do estudo de Raghavan e colaboradores (2001)¹⁹ e os realizados em biomembrana de muda de pele de cobra *Boa constrictor* ficaram na mesma ordem de grandeza de valores, indicando que essa biomembrana possui condições adequadas para simular o estrato córneo humano. Esses resultados reforçam estudos prévios realizados^{21,22} em que foi feita a avaliação por Differential Scanning Calorimetry (DSC) tanto de membranas compostas por estrato córneo humano como por biomembranas de muda de pele de cobra *Boa constrictor*, sendo observados picos endotérmicos nas mesmas regiões de temperatura, indicando transições de fase lipídicas do estrato córneo, demonstrando similaridades entre essas membranas.

Já o coeficiente de permeabilidade (Kp) foi calculado a partir do J no estado estacionário *versus* a concentração de acetato de hidrocortisona no compartimento doador ($C_{\text{doador-fármaco}}$)¹⁷, conforme Equação 1.

$$Kp = J/C_{\text{doador}} \quad (1)$$

O Kp do acetato de hidrocortisona estudado para a membrana sintética de acetato de celulose foi 0,0340 cm min⁻¹; já para biomembrana o valor foi de 0,0027 cm min⁻¹. Comparando esses valores de Kp com estudos prévios publicados²¹, eles encontram-se na mesma ordem de grandeza, quando avaliada a permeação de ácido salicílico por biomembranas de *Boa constrictor*.

As velocidades de liberação e de permeação variaram em até uma ordem de grandeza e a liberação foi maior que a permeação, conforme esperado. A velocidade de permeação e o fluxo são diretamente proporcionais à permeabilidade do fármaco na barreira (estrato córneo)⁸.

O fluxo de fármaco por meio do estrato córneo (J) aumenta quando há o incremento do coeficiente de difusão do fármaco na barreira e com a solubilidade do fármaco no estrato córneo. Também aumenta com o aumento de concentração de fármaco no veículo com o decréscimo da sua solubilidade no veículo⁸.

Estudos realizados com sistemas insaturados e saturados revelam que qualquer desvio do comportamento linear implica em uma diminuição da fase doadora. No caso de sistemas supersaturados uma diminuição no fluxo indica o início da instabilidade do gel¹⁸. Assim os estudos realizados por RAGHAVAN *et al.* (2000) demonstraram que o fluxo a partir de géis de

supersaturados de acetato hidrocortisona é proporcional para o grau de saturação de até 4,8 vezes a sua supersaturação.

Outros estudos ainda revelam que diferentes fórmulas dos excipientes podem modificar a permeabilidade na pele. Alterando os parâmetros de solubilidade dos excipientes, a permeação do fármaco na camada externa da pele pode ser aumentada e com isso se tem como resultado o aumento do fluxo⁸.

4. CONCLUSÃO

O presente estudo revelou a capacidade do fármaco acetato de hidrocortisona tópica comercial de promover a difusão e permeação do acetato de hidrocortisona na pele. Ainda os resultados sugerem maior liberação que permeação, sendo este resultado satisfatório. O valor de K_p ($0,0340 \text{ cm min}^{-1}$) para o acetato de celulose foi maior que o K_p ($0,0027 \text{ cm min}^{-1}$) da biomembrana, confirmando a maior liberação do fármaco em relação à permeação.

5. AGRADECIMENTOS

A Fapergs e ao CNPq pelo auxílio financeiro.

-
1. Sampaio SAP. Dermatologia. 3.ed. São Paulo: Artes Médicas, 2007.
 2. Azulay DR. Dermatologia. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.
 3. Farmacopeia Brasileira. 3.ed. São Paulo, 1977.
 4. The Merck Index: an Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals. Whitehouse Station-NJ. 12.ed. 1996.
 5. Ansel HC, Popvick NG, Allen LV, Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos. 6.ed. São Paulo: Editorial Premier, 2000.
 6. Moore KL, Agur AMR. Fundamentos de Anatomia Clínica, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998.
 7. Gartner LP, Hiatt JL. Tratado de Histologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997.
 8. Martins MRFM, Veiga F. Promotores de Permeação para a Liberação Transdérmica de Fármacos: uma Nova Aplicação para as Ciclodextrinas. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. 2002 jan/mar; vol. 38, n. 1: 33-54.
 9. Nunes RS, Azevedo JR, Vasconcelos AP, Pereira NL. Estudo da Padronização da Pele de Cobra Espécie - Boa constrictor - como Modelo de Estrato Córneo para Permeação de Fármacos. Scientia Plena. 2005 out. 10; vol. 1, n. 7: 171-175.
 10. Sanford IR, Wallace AJ. The Ultrastructure of Epidermal Maturation in the Skin of the Boa Constrictor (*Constrictor constrictor*). J. Ultrastructure Research. 1969 nov. 21; vol. 32: 69-93.
 11. Sinko PJ. Físico - Farmácia e Ciências Farmacêuticas. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2008.
 12. Brasil. Presidência da República, Subchefia para Assuntos Jurídicos. Lei nº 9.787 de fevereiro de 1999. Altera a Lei nº 6.360, de 23 de setembro de 1976, que dispõe sobre a vigilância sanitária, estabelece o medicamento genérico, dispõe sobre a utilização de nomes genéricos em produtos farmacêuticos e dá outras providências [Internet]. Brasília, DF; 1999. [acesso em 2012 out. 10]. Disponível em http://www.anvisa.gov.br/legis/leis/9787_99.htm
 13. Megrab AN, Williams CA, Barry WB. Oestradiol permeation across human skin, silastic and snake skin membranes: the effects of ethanol/water co-solvent systems. International Journal of Pharmaceutics. 1995 set. 30; vol. 116: 101-112.
 14. Tassinari JA, Bianchetti P, Rempel C. Avaliação dos efeitos do ultrassom terapêutico sobre a cafeína e verificação da liberação em sistema de difusão vertical. Química Nova. 2011 jun 14; vol. 34, n. 9, 1539-1543.
 15. Silva JA, Santana DP, Bedor DGC, Borba VFC, Lira AAM, Egito EST. Estudo de Liberação e Permeação In Vitro do Diclofenado de Dietilamônio em Microemulsão Gel-Like. Química Nova. 2009 mar. 3; vol. 32, n. 6: 1389-1393.
 16. Silva JA, Apolinário AC, Souza MSR, Damasceno BPGL, Medeiros ACD. Administração Cutânea de Fármacos: Defaño e Estratégias para o desenvolvimento de Formulações Transdérmicas. Revista de Ciências Farmacêutica Básica e Aplicada. 2010 set. 14; vol. 31, n. 3: 125-131.
 17. Netz PA, Ortega GG. Fundamentos de Físico-Química. Porto Alegre: Artmed, 2002.
 18. Raghavan SL, Trividic A, Davis AF, Hadgraft J. Effect of Cellulose Polymers on Supersaturation and In Vitro Membrane Transport of Hydrocortisone Acetate. International Journal of Pharmaceutics. 2000 out. 6; vol. 193: 231-237.
 19. Raghavan SL, Kiepfer B, Davis AF, Kazarian SG, Hadgraft J. Membrane transport of hydrocortisoneacetate from supersaturated solutions; the role of polymers. International Journal of Pharmaceutics. 2001; vol. 221: 95-105.

20. Shio-Fern NG, Rouse J, Sanderson D, Eccleston G. A Comparative Study of Transmembrane Diffusion and Permeation of Ibuprofen across Synthetic Membranes Using Franz Diffusion Cells. *Pharmaceutics*. 2010; vol. 2: 209–223.
21. Brito MB, Barin GB, Araújo AAS, de Sousa DP, Cavalcanti SCH, Lira AAM, Nunes RS. The action modes of *Lippia Sidoides* (CHAM) essential oil as penetration enhancers on snake skin. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. 2009 1; vol. 97: 323-327.
22. Al-Saidan SM, Barry BW, Williams AC. Differential scanning calorimetry of human and animal stratum corneum membranes. *International Journal of Pharmaceutics*. 1998 jun. 1; vol. 168: 17–22.