

Estudo de padronização da pele de cobra espécie - *Boa constrictor* - como modelo de estrato córneo para permeação de fármacos

R. S. Nunes¹; J. R. Azevedo¹; A. P. Vasconcelos¹; N. L. Pereira²

¹Laboratório de Farmacotécnica, Universidade Federal de Sergipe, 49100-000, São Cristóvão-SE, Brasil

²Programa de Pós-graduação em fármacos e medicamentos da Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, 14.040-903, Ribeirão Preto-SP, Brasil

rogeriabr@hotmail.com

(Recebido em 05 de outubro de 2005; aceito em 10 de outubro de 2005)

O potencial uso da pele de cobra, espécie *Boa constrictor*, foi avaliado para passagem percutânea de fármacos, uma vez que existe grande similaridade entre a pele de cobra e o estrato córneo humano em termos de espessura, composição, conteúdo lipídico, permeabilidade a água etc. Considerando a similaridade entre a pele de cobra e a pele humana, a espécie *Boa constrictor* foi usada como barreira para a permeação *in vitro*, utilizando a indometacina como fármaco modelo, indicando estreita variação dos resultados em termos de coeficiente de variação e reprodutibilidade dos perfis de permeação.

Palavras-chave: pele de cobra, indometacina, permeação.

The potential usefulness of snake skin *Boa constrictor* as a model membrane for percutaneous drug release was examined. There are similarities between shed snake skin and human stratum corneum in terms of structure, composition, lipid content, water permeability, etc. Considering the similarities snake skin and human skin the *Boa constrictor* was used as a barrier for an *in vitro* permeation, the indomethacin was selected as a model of drug, indicated narrower variation of results in coefficients of variation and reproductibility of permeation profiles.

Keywords: Snake skin, indometacin, permeation.

1. INTRODUÇÃO

O estrato córneo é o principal obstáculo da passagem percutânea de substâncias e o mais significativo. Fato que indica a sua utilização como modelo de membrana na avaliação “*in vitro*” da passagem percutânea de fármacos[1].

Considerando as características das membranas biológicas e a ampla variedade destas, uma série de membranas de diferentes origens animais tem sido utilizada na avaliação da permeação percutânea. No entanto, a pele humana ainda se mostra como o melhor modelo. Contudo, considera-se a existência de algumas limitações quanto ao seu uso referindo-se a disponibilidade e à diferença nos perfis de permeação nos diferentes sítios de aplicação, assim como problemas na integridade da membrana em uso prolongado[2]. Diante dessas limitações, a pele de cobra tem sido sugerida como modelo de estrato córneo para ensaios de permeação percutânea. A facilidade na obtenção do material e as menores variações interindividuais, havendo a possibilidade de monitoramento da idade e do sexo dos animais, são fatores consideráveis na reprodutibilidade das avaliações realizadas [2, 3, 4, 5].

Em sua estrutura, a pele de cobra apresenta uma camada de beta-queratina mais externa, uma camada de alfa-queratina intracelular e uma camada lipídica intercelular, que formam uma camada intermediária. Existe, ainda, uma terceira e última camada de alfa-queratina mais interna. A camada intermediária é subdividida em três subcamadas de estrutura multilamelar com células cornificadas (alfa-queratina) ao redor dos lipídeos intercelulares, representando, assim, o principal depósito de lipídeos, sendo considerada a maior barreira para a penetração da água [4].

Partindo dessa avaliação, a composição lipídica da pele de cobra e do estrato córneo humano apresentam similaridade, em que os lipídeos neutros são os maiores componentes lipídicos em

ambas as peles, e os ácidos gordos, com cadeia carbônica contendo entre 16 e 18 átomos de carbono, são os de maior predominância [2]. O fluxo de evaporação de água é um outro parâmetro que, quando comparado ao da pele humana, também apresenta bastante semelhança, embora a permeabilidade da água através da pele de cobra de várias espécies é especialmente dependente das condições de habitat. No entanto, de maneira geral, existe uma grande similaridade na permeabilidade da água entre a pele de cobra e o estrato córneo humano. Fato que sugere a utilização da pele desse animal como modelo de estrato córneo para estudos de permeação, sendo a espécie *Elaphe obsoleta* o modelo mais utilizado [4].

Neste estudo, a espécie *Boa constrictor* foi investigada devido à sua disponibilidade, sendo avaliadas as características de permeabilidade da indometacina em solução. A indometacina foi selecionada como modelo de fármaco para permeação por ser bastante utilizada em estudos que caracterizam outras espécies de pele de cobra como modelo de estrato córneo [6].

2. MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento de padronização do couro de cobra espécie - *Boa constrictor*- foi realizado a partir de ensaios de permeação, utilizando o couro de cobra como modelo de estrato córneo. Nesse procedimento, foi avaliada uma solução de indometacina (SIGMA), obtida a partir da solubilização desta em solução hidroalcoólica (50% v/v) na concentração de 0,5mg/mL, com ajuste de pH utilizando HCL (Merck) 1M. A pele de cobra foi cedida pelo Instituto Butantã/SP. Pedacos da parte dorsal foram colocados em recipiente contendo água destilada em temperatura ambiente para hidratação. Esse procedimento teve um período de duração de doze horas, antes do início da experimentação. As membranas foram adaptadas em célula de difusão (figura 1), em acrílico com diâmetro interno de 5cm, área de difusão de 19,625cm² e capacidade para até 4g de formulação [7]. A fase receptora utilizada foi o tampão fosfato pH 7,4, os experimentos foram conduzidos a 37°C (± 1) em triplicata, e o volume da solução receptora foi de 100mL. Os tempos de coleta, após o início da cinética, foram de 15, 30, 45, 60, 120, 180, 240 e 300 minutos, e as amostras foram coletadas em um volume de 3mL, sendo repostos igual volume de solução receptora.

A indometacina foi avaliada nas amostras em espectrofotômetro UV/VIS no comprimento de onda de 265nm, com base em uma curva analítica com faixa de concentração de 0,4 a 2mg/mL de indometacina (SIGMA), que apresentou boa linearidade. A análise de variância (ANOVA) foi utilizada para determinar a significância entre os dados obtidos.

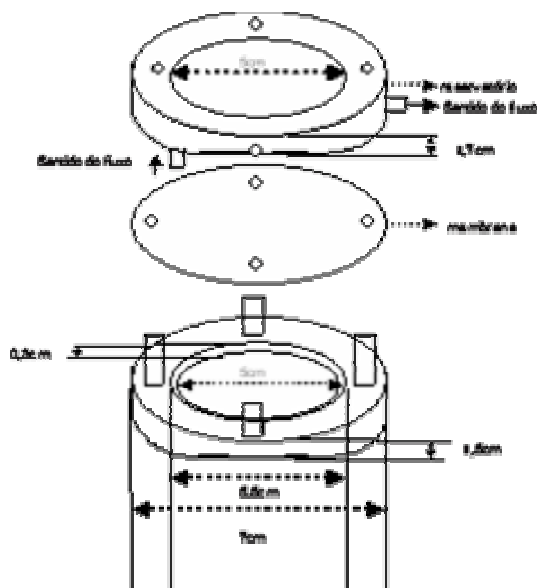


Figura 1: Diagrama esquemático do modelo da célula de difusão com suas respectivas medidas.

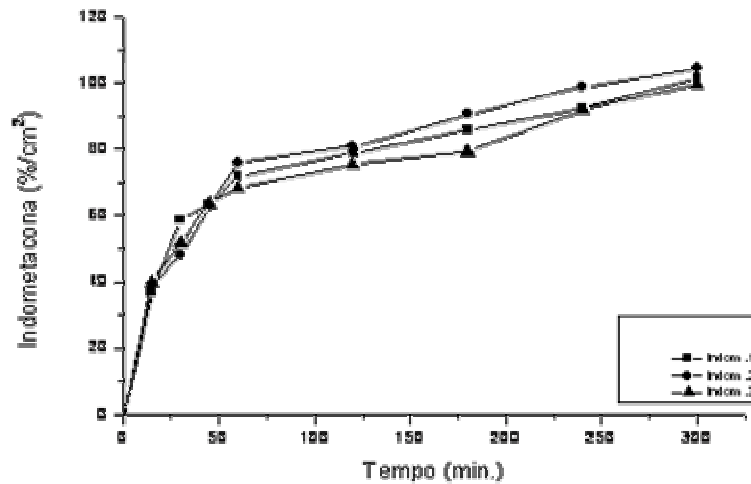


Figura 2: Perfil de permeação da indometacina.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo, a possibilidade do uso da pele de cobra, espécie *Boa constrictor*, foi examinada com o propósito de utilizá-la como modelo de estrato córneo para permeação de fármacos, uma vez que a pele de cobra de várias espécies tem sido utilizada para avaliações *in vitro*, simulando o estrato córneo humano, por mostrar similar permeabilidade com o mesmo, considerando partes distintas do animal. As partes dorsal e ventral têm mostrado diferenças nas características de difusão através da avaliação de cada uma em específico [3 e 5], o que justificou a escolha pela parte dorsal da pele de cobra da espécie em estudo.

No processo de padronização da pele de cobra, foi utilizado, como fármaco modelo, a indometacina, e foram avaliados os perfis de permeação dessa substância, considerando a reprodutibilidade e a baixa flutuação dos resultados. A indometacina foi selecionada para avaliar as características de permeação *in vitro* da pele da espécie estudada, uma vez que é bastante aplicada para estudos de avaliação da permeação de diferentes espécies [2 e 6].

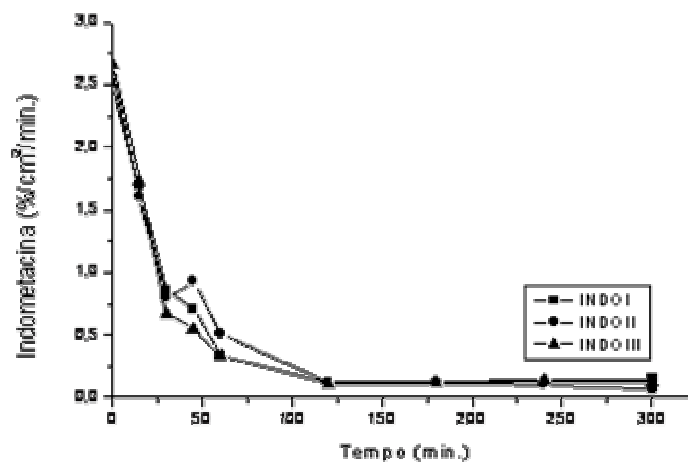


Figura 3: Perfis de fluxo de permeação da indometacina.

A solução de indometacina foi obtida a partir de uma solução de etanol e de água com volume definido, proporcionalmente devido à sua limitação de solubilidade em meio aquoso. Considerando que o fármaco é um eletrólito fraco e obtém seu maior fluxo de permeação em valor de pH em torno de três [6], a solução de indometacina trabalhada teve seu pH ajustado com HCL no valor de 3,5.

Os experimentos foram conduzidos a partir das determinações dos aspectos quantitativos: obtenção da curva analítica, que apresentou equação da reta $y = 0,6995x + 0,2683$ ($r^2 = 0,999$). O pH determinado após ajuste com HCL 1M foi de 3,5. O experimento de padronização da pele de cobra, espécie *Boa constrictor*, foi realizado a partir da obtenção dos perfis cinéticos da indometacina.

As cinéticas que conduziram os experimentos de padronização apresentam seus perfis gráficos de permeação na figura 2.

As curvas de permeação em cada avaliação não apresentaram diferenças significativas entre si ($p < 0,05$). Os perfis de fluxo, a partir das avaliações entre os experimentos, estão representados na figura 3. Observou-se uma taxa decrescente ao longo dos primeiros 120 minutos, considerando que a quantidade de fármaco que atravessa a pele de cobra diminui com o tempo. Os dados também indicam que os experimentos de permeação, utilizando o couro de cobra, apresentam baixa flutuação dos resultados (tabela 1) em decorrência de baixos valores percentuais de coeficientes de variação (%CV). Assim, os valores obtidos das quantidades acumuladas permeadas não apresentaram variações significativas entre si (ANOVA $p < 0,05$). Esses resultados estão de acordo com resultados prévios que validam pele de cobra como modelo de estrato córneo [8], descrevendo assim, vantagens quanto à reprodutibilidade na avaliação para a espécie *Boa constrictor* como modelo de estrato córneo para ensaios de permeação. Foi observada variabilidade nos perfis de permeação, utilizando como membrana a pele humana em estudo comparativo entre pele de cobra e pele humana, sendo então, atribuída a variações dos folículos pilosos e à espessura da epiderme humana [8]. No perfil de fluxo da indometacina na avaliação da *Boa constrictor*, foi observada coerência quanto à correspondência com o perfil de permeação considerando a fase doadora, a membrana e a fase receptora descrevendo um perfil de fluxo decrescente em função do tempo com significativa reprodução das curvas (figuras 3). Na simulação da passagem de fármacos através da pele, a concentração da fase doadora e as condições da fase receptora, assim como a correspondência nos perfis de quantidade acumulada que se difundem com o tempo em relação ao fluxo, à fase doadora e à fase receptora, assim como o papel das interações fármaco-membrana, justifica a correspondência observada. Estes resultados indicam que a pele de cobra, espécie *Boa constrictor*, pode ser utilizada como modelo de estrato córneo para ensaios de permeação de fármacos.

Tabela 1: Quantidade média em percentual de indometacina permeada em couro de cobra experimentos 1, 2 e 3.

	<i>Experimento</i>							
	<i>Tempo (minutos)</i>							
	15	30	45	60	120	180	240	300
<i>Exp. 1</i>	37,64(1,11)	50,58(1,22)	63,32(0,29)	71,76(0,79)	78,82(1,55)	85,88(0,57)	92,29(0,42)	101,17(0,25)
<i>Exp. 2</i>	19,26(2,4)	25,78(1,37)	48,5(0,67)	89,25(0,61)	15,7(1,12)	39,74(0,27)	62,58(0,73)	81(0,33)
<i>Exp. 3</i>	57,49(1,24)	12,4(0,77)	22,53(0,25)	42,5(0,22)	42,8(0,87)	52,14(0,73)	75,12(0,57)	63,45(0,56)

A comparação entre as médias percentuais a cada tempo indicam que as formulações não diferem entre si, ao nível de significância 5% ($p < 0,05$). Cada experimento representa a média de três determinações. Os valores entre parênteses representam os desvios padrões.

4. CONCLUSÃO

Este estudo sugere que a pele de cobra, espécie *Boa constrictor*, pode ser usada como modelo de estrato córneo para avaliações *in vitro* de permeação de fármacos, estimando baixa flutuação e boa reprodutibilidade dos resultados.

-
1. EL TAYAR, N.; RUEY-SHIUAM, T.; TESSA, B.; CARUPT, P.A. Percutaneous of drugs: A quantitative structure-permeability relationship study. *Journal Pharmaceutical Science*. 80:744-749 (1991).
 2. ITOH, T.; XIA, J.; MAGAVI, R.; NISHIHATA, T. & RYTTING, J.H. Use of snake as a membrana for “*in vitro*” percutaneous penetration studies: Comparison with human skin. *Pharmaceutical Research*, 7:1042-1047 (1990).
 3. AIACHE, M.; CHANET, L.; BEYSSAC, E.; HAIGER, M.J. *In vitro* permeation of progesterone from a gel through the shed skin of three different snake species. *International Journal of Pharmaceutical* 170:151-156 (1998).
 4. PONGJANYAKUL, T.; PRAKONGPAN, S.; PRIPREM, A. Permeation studies comparing cobra skin with human skin using nicotine transdermal patches. *Drug Development Industrial Pharmacy* 26:635-642 (2000).
 5. TAKAHASHI, K.; SAKANO, H.; RYTTING, J.H.; NUMATA, N.; KURODA, S.; MIZUNO, N. Influence of pH on the permeability of p-toluidine and aminopyrine through shed skin as a model membrane. *Drug Development Industrial Pharmacy* 27:159-164 (2001).
 6. YATA, N.; NAKAMURA, Y.; MAKITA, H.; TANAKA T.; KURAMOTO, M. Characteristics of shed snake skin permeability to indomethacin and fatty alcohols. *Journal Pharmaceutical and Pharmacology* 48:680-684 (1996).
 7. ARAÚJO, J.S. *Obtenção e avaliação de cremes transdérmicos contendo, fentanila, cetamina e clonidina no controle da dor crônica*. Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Fármacos e medicamentos da Universidade de São Paulo Faculdade de Ciências farmacêuticas Ribeirão Preto, 2004. 131p.
 8. PRIPREM, A.; PRAKONGPAN, S.; PONGJANYAKUL, T. Permeation studies comparing cobra skin with human skin using nicotine transdermal patches. *Drug Development Industrial Pharmacy*. 26:635-642 (2000).