

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

MARIA LUCIA REQUE

**“USO DA PAPAÍNA COMO
POTENCIALIZADORA DA PENETRAÇÃO
CUTÂNEA DE DICLOFENACO
DIETILAMÔNIO EM POMADA”**

Orientador: Prof. Dr. José Luiz Donato

Campinas

2006

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

MARIA LUCIA REQUE

**“USO DA PAPAÍNA COMO
POTENCIALIZADORA DA PENETRAÇÃO
CUTÂNEA DE DICLOFENACO
DIETILAMÔNIO EM POMADA”**

Dissertação de Mestrado, apresentada à Pós-
Graduação da Faculdade de Ciências Médicas
da Universidade Estadual de Campinas, para
obtenção do título de Mestre em Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. José Luiz Donato

Campinas
2006

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA

BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

R299u Requel, Maria Lucia
 “Uso da papaína como potencializadora da penetração cutânea de
 diclofenaco dietilamônio em pomada”/ Maria Lucia Reque. Campinas,
 SP : [s.n.], 2006.

Orientador : José Luiz Donato
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Papaína. 2. Diclofenaco. 3. Permeabilidade. 4. Pele. I.
Donato, José Luiz. II. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

**Título em ingles : Use of papain as penetration enhancer in diclofenac
diethylammonium ointment**

Keywords: • Papain
 • Diclofenac
 • Permeability
 • Skin

Titulação: Mestrado em Farmacologia

Banca examinadora: Prof Dr José Luiz Donato

Profa. Dra. Patrícia de Oliveira Carvalho
Profa. Dra. Denise Engelbrechet Zantut Wittmann

Data da defesa: 30-06-2006

C₃
R883

Banca Examinadora de Dissertação de Mestrado

Maria Lucia Reque

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). José Luiz Donato

Membros:
Professor (a) Doutor (a) José Luiz Donato
Professor (a) Doutor (a) Patrícia de Oliveira Carvalho
Professor (a) Doutor (a) Denise Engelbrecht Zantut Wittmann

Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade
Estadual de Campinas.

Data: 30/06/2006

201012024

DEDICO...

À minha família, principalmente aos meus pais, por todo o amor, carinho, compreensão e respeito.

Especialmente ao meu noivo pelo companheirismo e pelas palavras de motivação e força ao longo deste período.

AGRADEÇO...

Ao meu orientador Prof. Dr. José Luiz Donato pela oportunidade, pelo grande incentivo e ainda, pela atenção e aprendizado proporcionado durante o mestrado.

À todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desta dissertação, dando-me força e incentivo.

SUMÁRIO

Dedicatória.....	iv
Agradecimentos.....	v
Sumário.....	vi
Resumo.....	viii
Abstract.....	ix
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	10
1.1. Formulações de uso tópico.....	11
1.1.1. Absorção percutânea.....	12
1.1.2. Fatores que influenciam a absorção cutânea.....	13
1.2. Vantagens da via percutânea.....	14
1.3. Fármacos antiinflamatórios e aplicação tópica.....	15
1.4. Penetração do fármaco na pele.....	17
1.4.1. Estrutura da pele.....	18
1.4.2. Função da pele.....	19
1.5. Aumento da penetração cutânea.....	20
1.6. Enzimas proteolíticas.....	21
2. OBJETIVOS.....	22
3. ARTIGO CIENTÍFICO.....	24
4. TESTE DE PERMEABILIDADE <i>IN VIVO</i>	50
4.1. Etapa clínica.....	51
4.1.1. Características do estudo.....	51
4.1.2. Seleção de voluntários.....	52
4.1.3. Aspectos éticos.....	53
4.1.4. Dose e local de aplicação.....	53
4.1.5. Coleta de sangue.....	54
4.2. Etapa analítica.....	54
4.2.1. Curva de calibração, padrão interno e controles de qualidade.....	54
4.2.2. Extração fase sólida.....	54
4.2.3. Condições cromatográficas e espectrométricas.....	55
4.2.4. Resultados.....	56

5. DISCUSSÃO GERAL.....	59
6. CONCLUSÃO GERAL.....	65
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67

RESUMO

A barreira dérmica é representada por uma estrutura lipoprotéica e constitui um ambiente bioquímico altamente complexo. Trata-se de uma barreira muito eficiente ao ingresso de agentes químicos. Não há na literatura nenhum relato do uso de enzimas proteolíticas como agente potencializador da permeação de fármacos presentes em formulações para uso tópico. Neste trabalho desenvolvemos uma formulação de pomada contendo a enzima para potencializar a penetração de diclofenaco dietilamônio na pele, sendo realizado também o estudo da sua estabilidade na formulação através do acompanhamento da sua atividade catalítica, bem como a avaliação *in vivo* do seu potencial de alergenicidade cutânea. A atividade da papaína como potencializadora da penetração cutânea de diclofenaco dietilamônio em pomada foi avaliada *in vitro* através de células de difusão de Franz utilizando pele de porco, e *in vivo*, por meio de testes clínicos com voluntários humanos. O estudo de estabilidade, revelou que a atividade catalítica da papaína permaneceu estável na formulação quando a mesma foi armazenada a temperatura ambiente por pelo menos 24 meses, porém, sob condição acelerada (45°C e 70% U.R.), a enzima perdeu a sua atividade catalítica após seis meses de armazenamento. Não foi observada nos voluntários humanos, nenhuma reação adversa como eritema, pápulas ou vesículas durante o período de avaliação da alergenicidade cutânea da papaína, sendo a enzima aprovada para uso tópico. No teste de permeabilidade *in vitro*, foi observado um aumento de 50% no acúmulo de diclofenaco após quatro horas de permeação, quando a papaína esteve presente na formulação de diclofenaco dietilamônio em pomada. O teste de permeabilidade *in vivo* mostrou que a papaína aumentou a penetração de diclofenaco na pele quando a mesma foi tratada anteriormente com pomada contendo papaína e não quando a enzima foi administrada juntamente com o diclofenaco. Foi demonstrado o potencial da papaína como potencializadora da penetração de antiinflamatórios não-esteroidais (AINEs) em formulações de uso tópico, melhorando consideravelmente a eficiência das mesmas.

ABSTRACT

The skin barrier is represented by a lipoprotein structure and is a very complex biochemical environment. It is considered a very efficient barrier to the absorption of many chemical compounds. There is no report about the use of proteolytic enzymes as a penetration enhancer of therapeutic drugs in topical formulations. In this study, an ointment formulation containing papain was developed to increase the diclofenac diethylammonium skin penetration. Stability studies were performed to verify the enzymatic activity after incorporation in the formulation. It was also evaluated the *in vivo* allergenicity potential of the papain. The penetration enhancing activity of this enzyme was investigated *in vitro* through Franz-type diffusion cell using porcine skin, and *in vivo*, through clinical tests with human volunteers. The stability study showed that papain remained stable in the formulation when it was stored at room temperature during 24 months, however, at accelerated condition (45°C and 70% of humidity) the enzyme lost its catalytic activity after 6 months of storage. Regarding *in vivo* allergenicity studies, the human volunteers no observed adverse reactions as erythema, papulas or vesicle during the period of evaluation, being the papain approved to topical use. On *in vitro* skin permeation study, an increase of about 50% in the diclofenac accumulation was observed after four hours of permeation when the papain was present in the formulation. The *in vivo* skin permeation study showed that papain increased diclofenac skin penetration when it was treated previously with ointment containing papain and not when the enzyme was administered together with diclofenac. It was demonstrated the papain potential as penetration enhancer in NSAIDs (non-steroidal anti-inflammatory drugs) formulation for topical use improving its efficiency.

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1. FORMULAÇÕES DE USO TÓPICO

As formulações de uso tópico tipicamente consistem de um princípio ativo (fármaco) e uma ou mais substâncias não medicamentosas, relativamente inertes, ou excipientes com diversas finalidades. Juntas, estas substâncias podem ser consideradas o veículo, o qual deve permitir a liberação adequada do composto ativo e ser não-alérgico, não-irritante e cosmeticamente aceitável (Huang et al., 2005).

Uma formulação tópica pode ser classificada de acordo com sua nomenclatura farmacêutica (farmacopéias: creme, pomada, gel, pasta), pelo princípio da matriz estrutural (emulsão, lipossoma, gel, suspensão, adesivo transdérmico) ou ainda pela aparência associada (leite, tinta, espuma). Entretanto, a classificação mais simples consiste de uma divisão inicial da preparação tópica dentro de sistemas líquido, semi-sólido ou sólido (pós) que devem ser definidos como matrizes monofásicas, bifásicas ou multifásicas. Assim, uma emulsão pode ser definida como um líquido bifásico (loção) ou ainda, ela pode ser um semi-sólido bifásico (creme) (Surber e Smith, 2000).

As preparações farmacêuticas semi-sólidas incluem as pomadas, as pastas, as emulsões cremosas, os geles e as espumas rígidas. A propriedade que lhes é comum é a capacidade de adesão à superfície de aplicação por um período razoável de tempo antes de serem removidas por lavagem ou devido ao uso. Esta adesão deve-se ao seu comportamento reológico plástico, que permite aos semi-sólidos manter a sua forma e aderir como um filme até à aplicação de uma força externa, caso em que deformam e fluem (Idson e Lazarus, 2001).

A maioria das preparações semi-sólidas são aplicadas na pele, onde servem habitualmente de veículos a fármacos de aplicação tópica, como emolientes, ou como pensos oclusivos ou protetores. Uma pequena porção das formas semi-sólidas é aplicada em membranas mucosas, tais como o tecido retal, tecido bucal, mucosa vaginal, membrana uretral, revestimento externo do ouvido, mucosa nasal ou a córnea. As mucosas permitem um acesso facilitado à circulação sistêmica, enquanto a pele normal é relativamente impermeável (Idson

e Lazarus, 2001).

As pomadas são em geral, compostas por hidrocarbonetos líquidos numa matriz de hidrocarbonetos sólidos de elevado ponto de fusão (Idson e Lazarus, 2001). O mecanismo da penetração, aos diferentes estratos da pele, dos princípios ativos incorporados às pomadas é muito complexo. O que se pode afirmar é que depende de muitos fatores como: a natureza do princípio ativo, suas propriedades físicas e mecânicas, sua solubilidade, a presença ou não de tensoativos a quantidade de excipiente que os carrega. Para cada pomada é importante conhecer o grau de penetração, assim como para os princípios ativos, nos quais penetrações muito profundas podem causar intoxicações (Le Hir, 1997).

1.1.1. Absorção percutânea:

Em preparações tópicas, para tornar efetiva a aplicação, deve ocorrer a absorção percutânea do fármaco que envolve a sua liberação da formulação e a sua permeação através da pele para alcançar o tecido alvo (Kikwai et al., 2005).

Quando um sistema contendo um fármaco é aplicado topicamente, este difunde para fora do seu veículo até aos tecidos superficiais da pele. Há três portas de entrada potenciais: através da região folicular, dos ductos sudoríparos ou do estrato córneo intacto entre estes acessórios. Existem poucas provas convincentes de que as glândulas écrinas desempenhem algum papel significativo na permeabilidade cutânea. As substâncias podem entrar nos ductos e até mesmo nas glândulas, mas aparentemente não há penetração destas áreas para a derme (Idson e Lazarus, 2001).

A via específica que uma substância pode tomar e a importância relativa de uma em contraste com outra, depende quase exclusivamente das propriedades físico-químicas do fármaco e das condições da pele (Idson e Lazarus, 2001).

Uma vez que a substância tenha atravessado o estrato córneo, aparentemente não há nenhum impedimento adicional à penetração nas restantes camadas epidérmicas e corium; há, então, uma entrada direta na circulação através dos capilares (Idson e Lazarus, 2001).

A difusão através da camada córnea é um processo passivo. Existem poucas provas que sustentem a existência de sistemas de transporte ativo especializados nas células do estrato córneo. O processo passivo é afetado apenas pela substância a ser absorvida, pelo meio que está dispersa, e pelas condições ambientais. Por outro lado, a absorção percutânea é um processo mais complicado, do qual a difusão epidérmica é a primeira fase, e a remoção a partir da derme a segunda. A última depende do fluxo sanguíneo efetivo, do movimento do fluido intersticial, dos linfáticos, e talvez de outros fatores que se combinem com os constituintes dérmicos (Idson e Lazarus, 2001).

1.1.2. Fatores que influenciam a absorção cutânea:

A absorção do agente na pele depende da natureza da substância, do comportamento do veículo e das condições da pele. Três grandes variáveis contribuem para as diferenças na taxa de absorção ou fluxo de diferentes agentes tópicos ou do mesmo agente em diferentes veículos: a concentração do agente no veículo, o coeficiente de partição do estrato entre o estrato córneo e o veículo e o coeficiente de difusão do agente no estrato córneo (Guzzo et al., 1996).

A taxa de difusão é proporcional à concentração do agente no veículo. A relação é linear apenas em baixas concentrações do agente, e só se aplica a um agente solúvel no veículo. O coeficiente de partição é a medida da capacidade do agente em escapar do veículo e é definido como a solubilidade de equilíbrio do agente na superfície do estrato córneo relativa à sua solubilidade no veículo. O aumento da lipossolubilidade favorece a penetração de fármacos pela pele, aumentando a solubilidade no estrato córneo relativamente lipofílico. O coeficiente de difusão mostra o quanto a matriz da barreira restringe a mobilidade do agente. Os aumentos no tamanho molecular do agente aumentam a resistência friccional e diminuem o coeficiente de difusão. Moléculas com mais de 1000 dáltons geralmente não são facilmente absorvidas pela pele adulta normal (Guzzo et al., 1996).

A permeabilidade é, em geral, inversamente proporcional à espessura do

estrato córneo. Entretanto, em algumas áreas, as diferenças na concentração lipídica afetam a absorção percutânea, dependendo da lipofilicidade ou hidrofiliicidade individual do agente (Guzzo et al., 1996).

Em muitas doenças dermatológicas, como a psoríase, o estrato córneo é anormal, e a função de barreira é perdida. A absorção tópica é aumentada ao ponto de as doses padrão da droga poderem resultar em toxicidade sistêmica (Guzzo et al., 1996).

A absorção do agente aumenta com a hidratação, definida como um aumento no conteúdo de água do estrato córneo que é produzido pela inibição de perda de água química (Guzzo et al., 1996).

A camada córnea tem a propriedade de reter, na sua estrutura, substâncias ativas: “efeito reservatório”. A liberação progressiva desta conduz a efeitos prolongados. As substâncias que atravessam podem se concentrar nas partes profundas da pele e nas regiões subcutâneas, o que é favorável às ações locais. Numerosas substâncias podem assim se acumular na pele em diferentes níveis (Le Hir, 1997).

1.2. VANTAGENS DA VIA PERCUTÂNEA

Dentre as diversas vias de administração, a via percutânea vem ganhando destaque principalmente pelas vantagens proporcionadas quando comparada às demais rotas.

A aplicação tópica de fármacos evita o efeito de primeira passagem no fígado, a irritação gastrointestinal e a degradação metabólica associada à administração oral de medicamentos (Kikwai et al., 2005).

Por ser uma via não-invasiva, ao contrário da parenteral, a via percutânea traz maior conforto ao paciente além de ser menos traumática (Femenía-Font et al., 2005). Esta via, ainda, evita a superdosagem do fármaco devido a baixa absorção sistêmica do mesmo, já que o objetivo do tratamento é obter uma ação local. É o que ocorre com o diclofenaco dietilamônio de uso tópico.

1.3. FÁRMACOS ANTIINFLAMATÓRIOS E APLICAÇÃO TÓPICA

Os principais fármacos antiinflamatórios são os glicocorticóides e os antiinflamatórios não esteroidais (AINEs). Os AINEs estão entre os mais largamente utilizados de todos os agentes terapêuticos. Estão presentes neste grupo os fármacos: naproxeno, ibuprofeno, indometacina, piroxicam, tenoxicam, diclofenaco, entre outros. Muitos desses fármacos têm três tipos de efeitos principais: antiinflamatórios, analgésicos e antipiréticos. Em geral todos esses efeitos estão relacionados com a ação primária dos fármacos que é inibição da ciclooxigenase aracdônica e, portanto, inibição da produção de prostaglandinas e tromboxanos, embora alguns aspectos individuais possam ocorrer por mecanismos diferentes (Rang et al., 2004). Todas as prostaglandinas, tromboxanas e prostaciclina são sintetizadas pela via ciclooxigenase a partir do ácido araquidônico que está presente na forma de componente dos fosfolípidos das membranas celulares e é liberado pela ação da fosfolipase A₂, conforme Figura 1 (Mycek et al., 1998).

A ciclooxigenase (COX) é uma enzima bifuncional, tendo duas atividades distintas: a principal ação da ciclooxigenase que produz PGG₂, e uma ação de peroxidase que converte PGG₂ em PGH₂. Os AINEs diferentes podem inibir a enzima por mecanismos diferentes. Há dois tipos de COX: COX-1 e COX-2. A primeira é uma enzima constitucional expressa em muitos tecidos, incluindo plaquetas sanguíneas e está envolvida na sinalização de uma célula para outra e na homeostase tecidual. A COX-2 é induzida em células inflamatórias quando elas são ativadas e é considerada como sendo a enzima que produz os mediadores da inflamação da classe dos prostanóides. Muitos AINEs atualmente em uso são inibidores de ambas as coenzimas, embora variem quanto ao grau de inibição de cada uma delas. A ação antiinflamatória dos AINEs está claramente relacionada com a sua inibição à COX-2 e é provável que, quando usados como agentes antiinflamatórios, seus efeitos indesejados se devam principalmente à sua inibição de COX-1 (Rang et al., 2004).

Normalmente a prostaciclina (PGI₂) inibe a secreção ácida do estômago, ao

passo que a PGE_2 e a $PGF_{2\alpha}$ estimulam a síntese de muco protetor tanto no estômago como no intestino delgado. Na presença dos AINEs, esses prostanóides não são formados, o que acarreta no aumento da secreção de ácido gástrico e diminuição do muco, podendo causar mal-estar epigástrico, ulceração e/ou hemorragia (Mycek et al., 1998). Já foi estimado que um em cada cinco usuários crônicos de AINEs sofre danos gástricos (Rang et al., 2004).

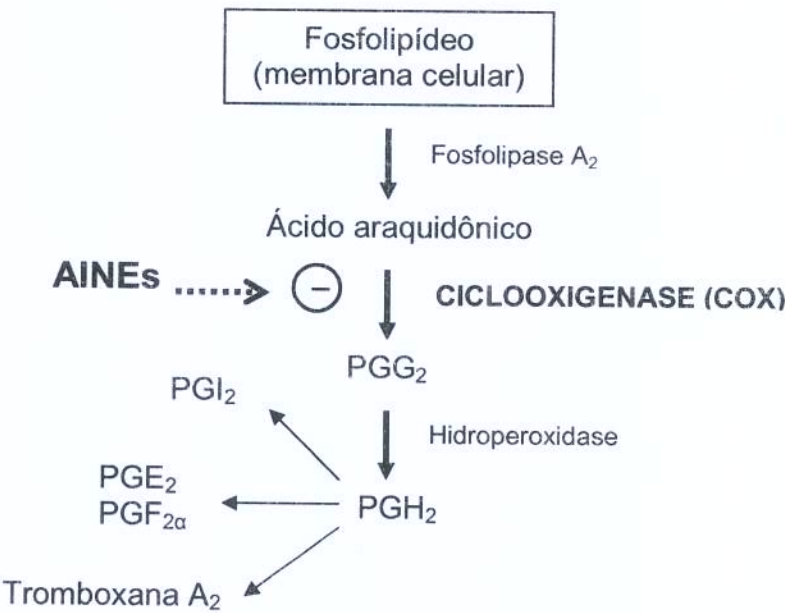


Figura 1: Síntese de prostaglandinas e local de ação dos AINEs

Os AINEs são responsáveis por numerosas reações adversas no mundo inteiro e estão incluídos nos relatos de mortes causadas por fármacos. Embora isto possa ser devido, em parte, ao uso extenso de AINEs por indivíduos idosos, a toxicidade inerente desses fármacos constitui claramente um fator contribuinte. Ao serem empregados em doenças articulares, que geralmente tornam necessárias doses bastante altas e uso continuado, há elevada incidência de efeitos colaterais, principalmente no trato gastrointestinal. Tais eventos adversos como, náuseas, vômitos, dispepsia, diarreia são os mais comuns efeitos indesejados (Rang et al., 2004).

Os AINEs são amplamente utilizados em formulações de uso tópico na pele

para o tratamento da dor muscular e articular, bem como, para o tratamento de reações inflamatórias (Sengupta et al., 1998a; Sengupta et al., 1998b; Calpena et al., 1999; Cevc e Blume, 2001; Steen et al., 2001). Muitos AINEs (ibuprofeno, diclofenaco, indometacina, alguns salicilatos, etofenamato e piroxicam) têm demonstrado importantes vantagens quando a via sistêmica é substituída pela percutânea. A concentração sanguínea de AINEs administrados topicamente é extremamente baixa sem efeitos colaterais sistêmicos, especialmente a toxicidade gástrica (Chlud, 1999).

Várias formulações tópicas de AINEs tem sido desenvolvidas para aumentar a penetração destes fármacos na pele e assim, aumentar a concentração do AINEs localmente. Entre os fármacos mais utilizados nestes estudos destacam-se o diclofenaco, nimesulida, meloxicam e piroxicam (Gupta et al., 1996; Sengupta et al., 1998b; Cevc e Blume, 2001; Curdy et al., 2001; Dayal et al., 2002; Gupta et al., 2002; Escribano et al., 2003; Gungor e Bergisadi, 2004; Brunner et al., 2005).

O diclofenaco dietilamônio já vem sendo utilizado topicamente e está disponível no mercado na forma de pomadas, géis e cremes como, por exemplo, o Cataflam Emulgel® produzido pela Novartis e os genéricos dos laboratórios farmacêuticos EMS-Sigma Pharma e Medley S/A Indústria Farmacêutica. Mas cabe ressaltar que, estas formulações ainda apresentam um reduzido poder de penetração na pele, cerca de 6% da dose aplicada (Cataflam Emulgel, Novartis Biociências S/A), havendo uma baixa concentração do fármaco no local inflamado, reduzindo significativamente a eficácia do medicamento, e deste modo, o paciente acaba optando pelo uso de antiinflamatórios orais.

1.4. PENETRAÇÃO DO FÁRMACO NA PELE

A penetração do fármaco na pele após a aplicação tópica é muito limitada devido as propriedades estruturais e as importantes funções que a pele desempenha no organismo. Para entender a complexidade deste processo, é necessário conhecer melhor a estrutura da pele, bem como, suas funções no

organismo.

1.4.1. Estrutura da pele:

A pele representa importante órgão de delimitação entre o meio interno e o ambiente externo, sendo o maior órgão do corpo humano (Souza, 2004). Ela cobre uma superfície superior a 20.000 cm² e possui variadas funções e propriedades (Idson e Lazarus, 2001).

Do ponto de vista anatômico, a pele possui diversas camadas histológicas, mas em geral, é descrita em termos de três camadas de tecidos: a epiderme, a derme e a camada adiposa subcutânea (Idson e Lazarus, 2001).

A camada mais externa é o estrato córneo ou a camada córnea que consiste em células compactadas, mortas, queratinizadas em camadas estratificadas. Devido a natureza densa do estrato córneo, os valores dos coeficientes de difusão neste tecido são mil ou mais vezes menores do que em qualquer outro tecido da pele, o que resulta em grande resistência e impermeabilidade geral (Idson e Lazarus, 2001).

O estrato córneo é a barreira que limita a velocidade e restringe os movimentos de entrada e saída de substâncias químicas. Estruturalmente, o estrato córneo é um tecido heterogêneo composto por células queratinizadas achatadas, a camada externa, a qual está arranjada de forma menos densa do que as adjacentes à camada granular inferior (Idson e Lazarus, 2001).

O conhecimento da composição química desta barreira é limitado. Os principais componentes celulares são as proteínas, os lipídeos e a água, combinados numa estrutura ordenada. A composição aproximada no estado seco é de 75 a 85% de proteína, 15 a 20% de lipídeos e 15% de água. Embora os lipídeos de superfície ofereçam pouca resistência à passagem de compostos, estudos de remoção dos lipídeos da superfície cutânea indicam que eles participam na função epidérmica da água. A função de barreira é restaurada quando os lipídeos extraídos são devolvidos à pele, o que sugere variações na permeabilidade da membrana biológica, dependendo grandemente da natureza

específica ou distribuição do lipídeo constituinte da membrana celular (Idson e Lazarus, 2001).

Abaixo do estrato córneo encontram-se as camadas metabolicamente ativas da epiderme. A camada basal ou germinativa é a camada imediatamente acima da derme. As células epidérmicas iniciam a sua jornada mitótica em direção ascendente até à superfície; as células tornam-se achatadas e diminuem de tamanho à medida que morrem lentamente devido à falta de oxigênio e de nutrição (Idson e Lazarus, 2001).

A derme é formada por mucopolissacarídeos ácidos, que desempenham importante papel na fixação da epiderme à ela. Contém estruturas fibrosas, como as fibras de colágeno, elastina e reticulina, polissacarídeos glicoprotéicos e eletrólitos, diversas células conjuntivas e imunológicas, como os fibroblastos, histiócitos e mastócitos (Souza, 2004). Contidos e suportados no interior da derme encontram-se numerosos vasos sanguíneos, linfáticos e nervos, bem como os acessórios epidérmicos tais como os folículos pilosos, as glândulas sebáceas e as glândulas sudoríparas (Lachman et al., 2001).

A última camada é a hipoderme, formada por tecido gorduroso que, por sua disposição, possui propriedades protetoras contra traumatismos e variações térmicas. Encontra-se, nesta camada, uma rede vascular profunda (Souza, 2004).

1.4.2. Função da pele:

A pele desempenha uma ampla variedade de funções principalmente como: proteção (absorção de luz ultravioleta, barreiras mecânica e imunológica), perceptiva (dor, temperatura, toque) e regulatória (excreção, hidratação, manutenção da temperatura corpórea). Estas funções auxiliam na manutenção da homeostase corpórea de animais superiores e na interação com o meio externo (Elias, 1983; Elias, 1996).

A atividade de barreira da pele é desempenhada principalmente pela epiderme, mais especificamente, pelo estrato córneo, como evidenciado por taxas aproximadamente iguais de penetração de substâncias químicas através do

estrato córneo isolado ou toda a pele. As células do estrato córneo, os corneócitos, são achatadas e proteínas fibrosas ou queratinas são alinhadas em macrofibras entrecruzadas dissulfídicas, em associação à fialgrina, que é o principal componente protéico do grânulo queratoialínico. Cada célula desenvolve um envoltório cornificado resultante do entrecruzamento da involucrina e da queratoialina. Isto constitui o exoesqueleto insolúvel que atua como um arcabouço rígido para os filamentos internos de queratina. Os espaços intercelulares são preenchidos com lipídios lamelares fortemente hidrofóbicos, que constituem o produto dos grânulos que revestem as membranas. A combinação de células hidrofílicas cornificadas em material intercelular hidrofóbo é uma barreira tanto para substâncias hidrófilas quanto hidrófobas. (Guzzo et al., 1996).

1.5. AUMENTO DA PENETRAÇÃO CUTÂNEA

Poucos fármacos penetram rapidamente na pele íntegra, visto que a epiderme comporta-se como uma barreira lipídica. Então na tentativa de superar essa dificuldade e proporcionar uma maior absorção de fármacos na pele, métodos físicos e químicos estão sendo implementados. Entre os métodos físicos tem-se: a iontoforese (aplicação de uma baixa corrente elétrica), a sonoporação (aplicação de ultrassom) e a eletroporação (aplicação de uma alta voltagem) (Cevc, 1997). Os métodos químicos envolvem a incorporação de substâncias específicas em formulações tópicas para aumentar a penetração do fármaco (Ghafourian et al., 2004). Os “potencializadores de penetração” são então compostos que interagem com constituintes da pele para promover o fluxo de fármacos. Algumas propriedades desejáveis neles são: ser não-tóxicos, não-irritante, não-alergênico, não devem apresentar atividade farmacológica, devem ser compatíveis com ambos excipientes e fármacos da formulação e ainda, cosmeticamente aceitáveis (Williams e Barry, 2004).

Numerosos compostos tem sido avaliados por sua atividade potencializadora de penetração de fármacos, entre eles, o ácido oléico (Yener et al., 2003), o propilenoglicol (Wang et al., 2005), o Transcutol (Gungor e Bergisadi,

2004) e até enzimas como a fosfolipase A2 (Patil et al., 1996), a hialuronidase que hidrolisa o ácido hialurônico presente na pele aumentando sua permeabilidade (Laugier et al., 2000) e as enzimas proteolíticas (Guggi e Bernkop-Schnürch, 2005).

1.6. ENZIMAS PROTEOLÍTICAS

Na última década, as enzimas proteolíticas como a tripsina, a papaína e a bromelina vem ganhando grande interesse como potencializadoras de penetração. Uma avaliação *in vitro* destas enzimas mostrou efeitos sobre a permeabilidade de compostos de baixo peso molecular em mucosa intestinal de porco-da-índia (Guggi e Bernkop-Schnürch, 2005).

Papaína é o nome dado por Wurtz & Bouchut (1879) ao constituinte proteoliticamente ativo no látex da fruta papaia (*Carica papaya*). Esta enzima é a mais amplamente estudada da classe das cisteína proteinases. Exibe atividades endopeptidase, amidase e esterase. Trata-se de uma cadeia simples não-glicosilada polipeptídica com 212 aminoácidos contendo três pontes dissulfeto, sendo uma proteína relativamente básica, com pl de 8,75 (Ménard e Storer, 1998).

Devido a suas propriedades proteolíticas, a papaína vem sendo extensamente utilizada em diversas áreas como: em indústria alimentícia na tenderização de carne (Schmidt, 1995), em tratamento para queimaduras (Starley et al, 1999), na cicatrização de feridas (Mekkes et al, 1997) e até associada a formulações de detergentes para melhorar o poder de limpeza dos mesmos (Khaparde e Singhal, 2001). No campo farmacêutico, a papaína possui várias indicações como: remoção local de tecido necrosado em úlceras, tratamento para indigestão resultante da deficiência de enzimas e, juntamente com outras enzimas, no tratamento doenças trombóticas ou inflamatórias (Starley et al., 1999). Entretanto, não há relatos do uso da papaína em formulações tópicas para potencializar a penetração de fármacos na pele.

2. OBJETIVOS

Foram objetivos do presente estudo:

- Desenvolvimento de formulação de uso tópico contendo papaína para potencializar a penetração de fármaco na pele;
- Estudo da estabilidade da papaína na formulação através do acompanhamento da sua atividade enzimática;
- Avaliação *in vivo* do potencial de alergenidade cutânea da papaína;
- Avaliação da atividade da papaína como potencializadora da penetração cutânea de diclofenaco dietilamônio em pomada, utilizando modelos *in vitro* e *in vivo*.

3. ARTIGO CIENTÍFICO

O artigo científico apresentado foi submetido à revista científica International Journal Pharmaceutics no dia 05/05/2006 e está a aguardando o aceite.

Elsevier Editorial System(tm) for International Journal of Pharmaceutics
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: DEVELOPMENT OF A NEW FORMULATION COMBINING PAPAIN AND DICLOFENAC
DIETHYLAMMONIUM IN AN OINTMENT VEHICLE

Article Type: Research Paper

Section/Category:

Keywords: topical formulation, penetration enhancer, skin, protease, anti-inflammatory

Corresponding Author: Dr. Jose Luiz Donato, PhD

Corresponding Author's Institution: Galeno Research Unit

First Author: Maria Lucia Reque, Master Degree

Order of Authors: Maria Lucia Reque, Master Degree; Leyge Thomas Couto, Master Degree; Jose Luiz Donato, PhD; Gilberto de Nucci, Professor

Manuscript Region of Origin:

Abstract: A diclofenac diethylammonium ointment formulation containing papain was developed to improve the drug skin penetration. The stability of the papain enzymatic activity in the ointment formulation at accelerated and at room temperature conditions and its allergenicity potential were evaluated. The penetration enhancing activity of papain was investigated in vitro through porcine ear skin using Franz-type diffusion cells. The papain remained stable in the formulation since it maintained its catalytic activity up to two years when stored at room temperature. At accelerated condition its catalytic activity was lost after six months at 45°C. On in vivo allergenicity studies, the volunteer's skin presented no adverse reactions as erythema, papular eruption or vesicle during the period of evaluation, being the papain approved for topical use. An increase of about 50% in the diclofenac permeation was observed after four hours of accumulation when the papain was present in the formulation. It was demonstrated that papain can be used as a penetration enhancer in NSAIDs ointment formulation for topical use as a substitute to oral route.

**DEVELOPMENT OF A NEW FORMULATION COMBINING PAPAIN AND
DICLOFENAC DIETHYLAMMONIUM IN AN OINTMENT VEHICLE**

M. L. Reque^a, L. T. Couto^a, G. de Nucci^{a,b}, J. L. Donato^{a,b,*}

^a Faculty of Medical Science, State University of Campinas-UNICAMP, P.O. Box 6111, Campinas, SP, Brazil

^{*b} Galeno Research Unit, Latino Coelho St., 1301, Parque Taquaral, 13087-010, Campinas, SP, Brazil

Abstract

Abstract: A diclofenac diethylammonium ointment formulation containing papain was developed to improve the drug skin penetration. The stability of the papain enzymatic activity in the ointment formulation at accelerated and at room temperature conditions and its allergenicity potential were evaluated. The penetration enhancing activity of papain was investigated in vitro through porcine ear skin using Franz-type diffusion cells. The papain remained stable in the formulation since it maintained its catalytic activity up to two years when stored at room temperature. At accelerated condition its catalytic activity was lost after six months at 45°C. On in vivo allergenicity studies, the volunteer's skin presented no adverse reactions as erythema, papular eruption or vesicle during the period of evaluation, being the papain approved for topical use. An increase of about 50% in the diclofenac permeation was observed after four hours of accumulation when the papain was present in the formulation. It was demonstrated that papain can be used as a penetration enhancer in NSAIDs ointment formulation for topical use as a substitute to oral route.

Keywords: topical formulation, penetration enhancer, skin, protease, anti-inflammatory

* Corresponding author. Tel.: +55 19 3242-7133; fax: +55 19 32-7439

E-mail address: josedonato@galenoresearch.com

1. Introduction

The topical route beyond to be non-invasive, it is more comfortable and less traumatic to the patient, avoiding many potential side effects associated with systemic drug exposure (Femenía-Font et al, 2005; Huang et al. 2005). Many non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) as ibuprofen, diclofenac, indometacin, some salicylates, etofenamate and piroxicam have demonstrated relevant advantages of the percutaneous route over the systemic one (Chlud, 1999). When the diclofenac pharmacokinetic was compared after topical and oral dosing, its relative bioavailability in subcutaneous adipose and skeletal muscle tissue was significantly higher after topical administration, whereas relative plasma bioavailability was 50-fold lower (Brunner et al., 2005). The blood levels of topical NSAIDs are extremely low with no systemic side effects, especially no gastric toxicity (Chlud, 1999).

Several topical formulations incorporating NSAIDs have been developed to increase the skin penetration and thus increasing the local concentration of drug (Gupta et al., 1996; Sengupta et al., 1998; Wenkers et al., 1999; Cevc et al., 2001; Gupta et al., 2002; Gungor and Bergisadi, 2004). Therefore, an improved diclofenac formula with a high degree of skin permeation could be useful in the treatment of not only locally inflamed skin tissue, but also inflammatory painful states of supporting structures of the body (bones, ligaments, joints, tendons and muscles) (Escribano et al., 2003). However, human skin, particularly the uppermost layer- the stratum corneum- is an excellent barrier thus offering a strong resistance to drugs penetration, decreasing the efficiency of this administration route (Huang et al., 2005).

Topical formulations containing penetration enhancers is one of the methods employed to overcome these difficulties and attempt to improve the performance these pharmaceutical products (Ghafourian et al., 2004; Hadgraft and Lane, 2005). Chemicals as oleic acid, Azone, Transcutol and propylene glycol already have been commonly evaluated in topical formulations (Yener et al., 2003; Gungor and Bergisadi, 2004; Escobar-Chavez et al., 2005), however, its use is limited since the underlying mechanisms of action these agents are seldom clearly defined (Femenía-Font et al., 2005).

Penetration enhancers are chemicals intended to be non-toxics, non-irritating, non-allergenic and compatible with others components of the formulation and capable of interacting with skin constituents to promote the drug flux across the epithelium (Williams and Barry, 2003; Shin et al., 2005). Beyond the above mentioned compounds, enzymes have gained much interest in the last years (Guggi and Bernkop-Schnürch, 2005). The most studied ones are the epidermal enzymes as phospholipase A2 (Patil et al., 1996) and the hyaluronidase that hydrolyses the hyaluronic acid present in the skin (Laugier et al., 2000). Recently, papain and others proteolytic enzymes as bromelain and trypsin have been tested for *in vitro* evaluation as permeation enhancers of low-molecular size compounds through the intestinal mucosa of guinea pig (Guggi and Bernkop-Schnürch, 2005).

Papain is an enzyme extracted from the latex of papaya tropical fruit (*Carica papaya*) classified as a cysteine proteinase (Ménard and Storer, 1998). Due to its proteolytic properties and stability, papain has been largely used in the food and pharmaceutical industries, mainly, for the treatment of indigestion resulting from proteolytic enzyme deficiency (Schmidt, 1995). It is also used in the treatment of burns (Starley et al., 1999) and wound debridement (Mekkes et al., 1997). Nevertheless, there is no report of its use as penetration enhancer in pharmaceutical products of topical application.

The aim of this work was to develop a diclofenac diethylammonium ointment containing papain for topical use and evaluate its *in vitro* penetration enhancing activity. In addition, it was also evaluated the stability of the papain enzymatic activity and its allergenicity potential.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Papain USP (EC 3.4.22.2) (6000 units/mg protein) was purchased from Merck (Germany), trichloroacetic acid crystal (TCA), sodium phosphate dibasic and hexane were purchased from Mallinckrodt (Philipsburg, NJ, USA). Casein, L-cysteine hydrochloride monohydrated, ethylenediaminetetraacetate (EDTA) propylene glycol, α -tocopherol acetate, glycerol and Tween 80 were purchased from Sigma Chemical Co. (St Louis, MI, USA). Mineral oil was from Schering-Plough (Rio de Janeiro, RJ, Brazil). Crodabase SQ and CR2 were acquired from Croda (Campinas, SP, Brazil) and diclofenac diethylammonium from Luper (Bragança Paulista, SP, Brazil). All other chemicals used were of analytical grade unless otherwise specified.

2.2. Preparation of the formulation

To prepare 1 kg of the papain formulation, 600 g of Crodabase SQ (ointment base, Croda) was initially added to a planetary mixer (DPM 2 from Ross, USA) and homogenized for 30 min at room temperature and 60 Hz. After this time, a mixture of papain (20 g) and α -tocopherol acetate (20 g) previously incorporated in Tween 80 (4 g), Estasan (30 g) and Phenoben (3 g) was mixed for 30 min at same speed. Finally, the amount of Crodabase SQ to complete 1 kg was added and mixed for an additional cycle of 60 min at the same mixing speed. During the preparation the temperature was maintained constant at $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Immediately after the preparation the formulation was added in aluminum tubes and maintained protected from light and at room temperature until used for enzymatic assay.

2.3. Papain extraction from ointment

Papain was extract from ointment using a liquid-liquid extraction process, based on the papain solubility in the aqueous phase. Initially, 62.5 g of papain containing ointment was weighted in a conical plastic tube and 1 ml of organic solvent was added to the mixture. Different organic solvents were evaluated to define the most efficient to promote the enzyme separation from the ointment components without interfering with the catalytic activity. Mineral oil, hexane and glycerol were used in separated experiments. After complete dissolution of the ointment in the organic solvent, 9 ml of Phosphate-Cysteine-EDTA Buffer solution (0.038, 0.035 and 0.057M respectively) was added and the mixture was gently mixed during 2 min before centrifugation at 2000 x g for 10 min at 4°C. The aqueous phase was collected and used for enzymatic analysis.

2.4. Assay to determination enzymatic activity of papain

Papain proteolytic activity was assayed using casein as the substrate. TCA soluble peptides were determined by absorbance reading at 280 nm. This assay was based in the method described in the USP (2004). First, a standard solution of papain at a concentration of 750 units.mL⁻¹ was prepared utilizing Buffer solution. This solution was used to make a standard curve in the concentration range 0-450 units.mL⁻¹. The reaction was started by adding 1 mL of casein solution and 700 µL of the enzyme solution in different concentrations in a water bath at 37°C under constant stirring. After 60 minutes, the reaction was stopped by adding 600 µL of TCA solution at 30% (w/v). After 40 min resting, the precipitated not-hydrolyzed casein was separated of the soluble peptides through centrifugation at and 2000 x g for 15 min and 4°C. The soluble peptides in the supernatant were determined reading the absorbance at 280 nm. All the results were expressed by % of recovered enzyme activity based on the predicted amount of enzyme activity present in the ointment formulation.

2.5. Effect of regular ingredients on the papain enzymatic activity

To evaluate the effect of the individual reagents on the papain enzymatic activity, five samples of papain (20 mg) were initially separated in conic plastic tubes. Five incubation reactions were prepared mixing one of the following reagents with the papain: 117 mg of propylene glycol; 3 mg of Phenoben, 858 mg of acrylate; 1 g of emulsified Crodabase CR2; 1 g of Crodabase SQ. After 12 h of incubation time at room temperature, the mixture was diluted with Buffer solution to obtain the same papain concentration after extraction from the original ointment formulation. The papain enzymatic activity was determined as described.

2.6. Stability studies

Stability studies were performed with the ointment formulation containing papain stored in aluminum tubes at room temperature, 4°C and over accelerated protocol at 45°C and 70% of humidity. In the room temperature study the papain enzymatic activity was evaluated monthly over a period of 24 months. In the 4°C and accelerated conditions a total of 25 tubes were stored at specific conditions. Enzymatic activity was evaluated at time 0 (immediately after the formulation preparation) and 30, 60, 90 and 180 days after preparation. Each sample was composed of 5 tubes removed from the storage place and the enzymatic activity in each tube was measured in triplicate in the same day.

2.7. Skin allergenicity studies with papain

Human skin irritation, sensitization, photoallergenicity and phototoxicity of papain in ointment formulation was evaluated by the Allergisa Pesquisa Dermato-Cosmética Ltda using a ointment formulation composed of Crodabase SQ®, α -tocoferol acetate and papain at 2% (w/w).

A total of 150 healthy volunteers (135 females and 15 males) aged between 18 and 72 of phototype I to IV were selected and distributed as follow: 60 volunteers to irritation, 60 volunteers to sensitization and 30 volunteers to photoallergenicity and phototoxicity. In all the tests, the skin effect was evaluated by the patch test occlusive. Initially, the tested product (0.05 g) was distributed on a paper filter disc (1 cm²), fixed on the left or right back and covered with hypoallergenic half-occlusive band. The reaction was always registered 30 min after taking out the patch test.

All the procedures were approved by Ethic Committee in Research do Hospital Madre Theodora (Brazil) following the principles of the Helsinki Declaration.

2.7.1. Primary and accumulated irritation

The primary irritation was evaluated through application of patch test for 48 h. The reaction was registered.

In the accumulated irritation, during 4 weeks were performed 19 consecutives applications of patch test in the same area, being the first application removed after 48 h of skin contact and the last of each week removed 72 h later. After 10 days without test, a new patch test was put on skin in an area where no test was performed and removed after 48 h. The reactions were registered.

2.7.2. Sensitization

Initially was performed a induction through 9 consecutives applications of the patch test always in the same area during 3 weeks, being 3 times a week (alternated days). The patch test always remained 24 h in contact with the skin. After 10 days without test, a new patch test was added on the skin in an area where no test was performed. The test was taken out 48 h later and the reactions were registered.

2.7.3. Photoallergenicity

Initially, a total of 6 consecutives applications of the patch test always in the same area were realized during 3 weeks (twice a week). The patch test always was removed after 24 h of skin contact, being immediately evaluated and irradiated with UV light A and B (UVA/UVB). After 10 days without test, a patch was fixed on the skin in an area where no test was performed, and taken out 24 h later. This area was irradiated with UV light A. The evaluations were realized subsequent to irradiation and after 24, 48 and 72 h.

2.7.4. Phototoxicity

A patch test was fixed on the skin and 24 h after application it was removed. The area was immediately evaluated and irradiated with UV light A. The evaluations were realized subsequent to irradiation and after 24, 48 and 72 h.

2.8. In vitro skin permeation study

Franz diffusion cells from Hanson Research were used to evaluate the in vitro diclofenac diethylammonium percutaneous permeation. An ointment formulation containing 1.2% diclofenac diethylammonium (w/w), 2% papain (w/w) and Crodabase SQ was compared with a similar formulation without papain incorporation. The receptor compartment was filled with isotonic phosphate buffer (pH 7.2) and it was constantly stirred and maintaining at 36°C during the experiment. Porcine ear skin was initially cleaned and separated from the lipid layer. A skin disc was mounted between the donor and receptor compartments. Ointments formulations were poured over the skin discs as infinite dosage and occluded with a Parafilm. Two cells were used for each formulation test. Samples from the receptor compartment were collected 4 and 16 hours after the ointment application. The diclofenac concentration was determined by HPLC-UV (Waters Corporation, Milford-MA, USA) utilizing acetonitrile (Backer, Phillipsburg- NJ, USA) as mobile phase and an C18 analytical column (Waters Corporation, Milford-MA, USA).

3. Results and discussion

Results from table 1 shown that of the three solvents were able to extract papain from ointment. Mineral oil and hexane recovered 95.0 ± 4.3 and $94.3 \pm 4.0\%$ of papain enzymatic activity, respectively. Glycerol recovered only $64.4 \pm 7.1\%$ of total papain, therefore its use was rejected. Mineral oil was a solvent utilized to papain extraction from ointment because beyond it promote the enzyme separation from the ointment components efficiently without interfering with catalytic activity, it is harmless chemical.

The standard curve of papain concentration versus absorbance at 280 nm showed a linear correlation ($r^2 = 0.9948$) in the range of 18.75 to 450 units/ml (Figure 1). All the results of assay to determination enzymatic activity of papain were obtained from this kind of curve.

After incubation in the presence of propylene glycol or the emulsified Crodabase CR2, only $23.9 \pm 4.7\%$ and $56.3 \pm 27.4\%$ of the papain catalytic activity was recovered. On the other hand, after Phenoben incubation the papain activity was slightly increased to $126.6 \pm 7.9\%$. Crodabase SQ did not affect the enzymatic activity significantly (Table 2). Based on these results, the following formulation was chosen to perform the stability studies: papain (2%, w/w), α -tocopherol acetate (2%, w/w), Estasan (3%, w/w), Tween 80 (0.4%, w/w), Phenoben (0.3%, w/w) and Crodabase SQ.

The papain showed high stability when the ointment was stored at 4°C. The total enzyme activity was recovered after 180 days at 4°C as show the Figure 2. The enzyme was also very stable when stored at room temperature (Figure 3) showing that after 24 months stored under this condition, 104.7% of the enzymatic activity was recovered. However, when stored at 45°C, its activity decreased to less than 50% within 90 days (Figure 2). This reduction was even more pronounced at the end of the 180 days period.

On in vivo allergenicity studies, the volunteers skin remained with normal aspect and no adverse reactions as erythema, papular eruption or vesicle were observed during the period of evaluation. No evidence for irritation, sensitization, photoallergenicity and phototoxicity

was observed after the ointment application. Thus, the tested product with papain was approved to topical use.

On in vitro skin permeation study (Table 3) it was observed a significant increase of about 50% in the diclofenac permeation through pig skin after 4 hours of accumulation. The skin discs treated with papain formulation allowed an accumulation of $0.240 \mu\text{g.mL}^{-1}$ of diclofenac while in the absence of papain, only $0.165 \mu\text{g.mL}^{-1}$ was accumulated in the receptor compartment. After 16 hours of permeation, the drug level accumulated in the receptor compartment was not different in the presence or absence of papain. The papain mechanism of action on skin still is necessary elucidation.

The modes of action of penetration enhancers in general are complex. Most enhancers interact with the intercellular lipid domain of the stratum corneum (Williams and Barry, 2004). The stratum corneum is a structure formed by an intercalating mix of proteinaceous dead corneocytes and lipids compounding an effective barrier to the entry of most substances (Huang et. al., 2005). It is more probably that the papain, being a proteolytic enzyme, act on the stratum corneum intracellular keratin, denaturing it and forming vacuoles what could facilitate to entrance of drugs into the skin. This can affect the integrity of the desmosomes responsible to maintain cohesion between corneocytes. Williams and Barry (2004) suggest that proteases are capable of modifying the intercellular lipid domains to reduce the barrier resistance of the bilayer lipids.

Sinergistics effects can be found with the association of chemicals enhancers, i.e. oleic acid and Transcutol in nimesulide gel formulation (Gungor and Bergisadi, 2004). Similar synergies have been described in others researches (Escribano et al., 2003; Escobar-Chavez et al., 2005; Wang et al., 2005). However, in this work neither test was performed to evaluated the synergic action of papain with other substances or ointment components.

4. Conclusion

A new, simple and inexpensive method to extraction papain from ointment was developed. This procedure in association with the determination of enzymatic activity is a useful tool to determine the enzyme stability in ointment formulations.

The ointment containing papain developed for topical use is a stable formulation, since the papain catalytic activity was maintained up to two years when stored at room temperature. Accelerated stability procedure was not suitable to evaluate papain stability since the enzyme lost the catalytic activity after six months at 45°C and 70% humidity.

Papain can be considered a new option of penetration enhancer improving much the performance of topical products whereas was showed *in vitro* its capacity to increase significantly skin penetration of diclofenac diethylammonium. Clinical tests using human volunteers are in progress to determine the *in vivo* penetration enhancing activity of papain. It was demonstrated the papain potential as penetration enhancer in NSAIDs ointment formulation for topical use as a substitute to oral route.

References

- Brunner, M., Dehghanyar, P., Seigfried, B., Martin, W., Menke, G., Müller, M., 2005. Favourable dermal penetration of diclofenac after administration to the skin using a novel spray gel formulation. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 60, 573-577.
- Cevc, G. and Blume, G., 2001. New, highly efficient formulation of diclofenac for the topical transdermal administration in ultradeformable drug carriers, transfersomes. *Biochim. Biophys. Acta*, 1514, 191-205.
- Chlud, K., 1999. Use of topical non-steroidal anti-inflammatory drugs in aggravated and decompensated arthroses. *Wien Med Wochenschr.*, 149, 546-547.
- Escobar-Chavez, J.J, Quintanar-Guerrero, D., Ganem-Quintanar, A., 2005. In vivo skin permeation of sodium naproxen formulated in pluronic F-127 gels: effect of Azone and Transcutol. *Drug Dev Ind Pharm.*, 31, 447-454.
- Escribano, E., Calpena, A.C., Queralt, J., Obach, R., Doménech, J., 2003. Assessment of diclofenac permeation with diferent formulations: anti-inflammatory study of a selected formula. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 19, 203-210.

- Femenía-Font, A., Balaguer-Fernández, C., Merino, V., Rodilla V., López-Castellano, A., 2005. Effect of chemical enhancers on the in vitro percutaneous absorption of sumatriptan succinate. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 61, 50-55.
- Ghafourian, T., Zandasrar, P., Hamishekar, H., Nokhodchi, A., 2004. The effect of penetration enhancers on drug delivery through skin: a QSAR study. *J. Control. Release.*, 99, 113-125.
- Guggi, D. and Bernkop-Schnürch, A., 2005. Improved paracellular uptake by the combination of different types of permeation enhancers. *Int. J. Pharm.*, 288, 141-150.
- Gungor, S. and Bergisadi, N., 2004. Effect of penetration enhancers on in vitro percutaneous penetration of nimesulide through rat skin. *Pharmazie.*, 59, 39-41.
- Gupta, S.K., Prakash, J., Awor, L., Joshi, S., Velpandian, T., Sengupta, S., 1996. Anti-inflammatory activity of topical nimesulide gel in various experimental models. *Inflamm. Res.*, 45, 590-592.
- Gupta, S.K., Bansal, P., Bhardwarj, R.K., Jaiswal, J., Velpandian, T., 2002. Comparison of analgesic and anti-inflammatory activity of meloxicam gel with diclofenac and piroxicam

gels in animal models: pharmacokinetic parameters after topical application. *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.*, 15, 105-111.

Hadgraft, J. and Lane, M.E., 2005. Skin permeation: The year of enlightenment. *Int. J. Pharm.*, 305, 2-12.

Huang, X., Tanojo, H., Lenn, J., Deng, C.H., Krochmal, L., 2005. A novel foam vehicle for delivery of topical corticosteroids. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 53, 526-538.

Laugier, J.P., Shuster, S., Rosdy, M., Csoka, A.B., Stern, R., Maibach, H.I., 2000. Topical hyaluronidase decreases hyaluronic acid and CD44 in human skin and in reconstituted human epidermis: evidence that hyaluronidase can permeate the stratum corneum. *Br. J. Dermatol.*, 142, 226-233.

Mekkes, J. R., Le Poodle, I. L., Das, P.K., Kammeyer, A., Westerhof, W., 1997. *In vitro* Tissue-digesting properties of krill enzymes compared with fibrinolysin/DNAse, papain and placebo. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, 29, 703-706.

Ménard, R. and Storer, A.C. Papain. In: Barrett, A.J., Rawlings, N.D. and Woessner, J.F. (Eds.), *Handbook of Proteolytic Enzymes*, Academic Press, London, 1998, pp. 555-557.

Patil, S., Singh, P., Szolar-Platzer, C., Maibach, H., 1996. Epidermal enzymes as penetration enhancers in transdermal drug delivery? *J. Pharm. Sci.*, 85, 249-252.

Schmidt, H., 1995. Effect of papain on different phases of prenatal ontogenesis in rats. *Reprod. Toxicol.*, 9, 49-55.

Sengupta, S., Velpandian, T., Sapra, P., Mathur, P., Gupta, S.K., 1998. Comparative analgesic efficacy of nimesulide and diclofenac gels after topical application on the skin. *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.*, 11, 273-278.

Shin, S.C., Kim, H.J., Oh, I.J., Cho, C.W., Yang, K.H., 2005. Development of tretinoin gels for enhanced transdermal delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 60, 67-71.

Starley, I.A., Mohammed, P., Schneider, G., Bickler, S.W., 1999. The treatment of paediatric burns using topical papaya. *Burns*, 25, 636-639.

USP (2004), Papain, In: Official Monographs for USP 27, US Pharmacopeial Convention, Rockville, MD, USP-27/NF 22, pp.1403.

Wang, Y.Z., Ren, T.C., Xiao, Y.Q., 2005. Effects of different penetration enhancers on percutaneous absorption of lappaconitine gel in vitro. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi.*, 30, 665-668.

Wenkers, B.P. and Lippold, B.C., 1999. Skin penetration of nonsteroidal anti-inflammatory drugs out of a lipophilic vehicle: influence of the viable epidermis. *J Pharm Sci.*, 88, 1326-1331.

Williams, A.C. and Barry, B. W., 2004. Penetration enhancers. *Drug Deliv.*, 56, 603-618.

Yener, G., Gonullu, U., Uner, M., Degim, T., Araman, A., 2003. Effect of vehicles and penetration enhancers on in vitro percutaneous absorption of celecoxib through human skin. *Pharmazie.*, 58, 330-333.

Figure 1. Standard curve of papain enzymatic activity using casein as the substrate. TCA soluble peptides were determined by absorbance reading at 280 nm. Each point represents the mean of two determinations.

Figure 2. Enzymatic activity of papain in the ointment formulation after stability protocols. Ointment formulation containing papain was stored at 45°C and 70% humidity or at 4°C for 180 days. Enzymatic activity was evaluated at time 0 (immediately after the formulation preparation) and 30, 60, 90 and 180 days after preparation. The results represent the mean of 3 determination performed in 5 tubes.

Figure 3. Enzymatic activity of papain in the ointment formulation in the stability study at room temperature. Papain enzymatic activity was evaluated monthly over a period of 24 months.

Table 1

Papain enzymatic activity after extraction with each solvent

Solvent	Papain enzymatic activity (%) ^a
Mineral Oil	95.0 ± 4,3
Hexane	94,3 ± 4.0
Glycerol	64.4 ± 7.1

^aresults are expressed by % of recovered enzymatic activity
(Indicated values are means of five determination ± S.D.)

Table 2

Papain enzymatic activity after incubation with reagents

Reagent	Papain enzymatic activity (%) ^a
Papain only ^b	91.2 ± 0.5
Propylene glycol	23.9 ± 4.7
Phenoben®	126.6 ± 7.9
Acrylate	87.8 ± 14.5
Crodabase CR2	56.3 ± 27.4
Crodabase SQ®	94.9 ± 5.4

^a results expressed by % of recovered enzymatic activity (indicated values are means of three determination ± S.D.)

^b papain was incubated without reagent

Table 3

Diclofenac concentration obtained after in vitro permeation study with porcine skin

Formulation	Mean concentration ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) after permeation period	
	4 hours	16 hours
Absence of papain	0.165	3.105
Presence of papain (2%, w/w)	0,240	2.670

Figure 1

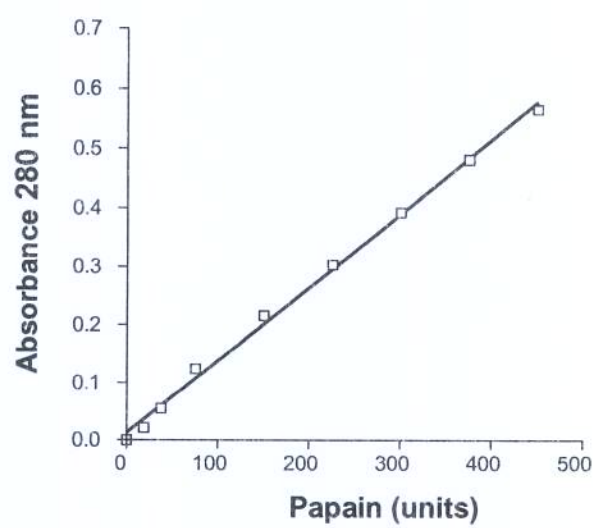


Figure 2

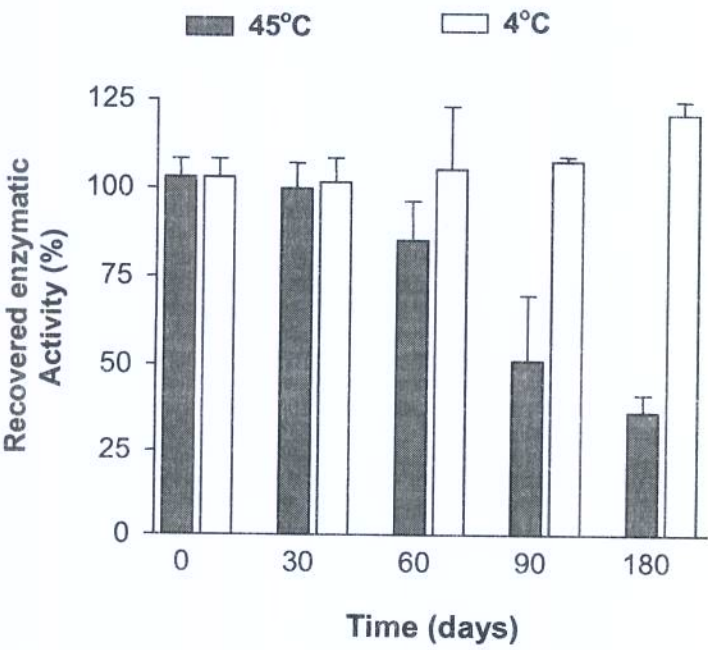
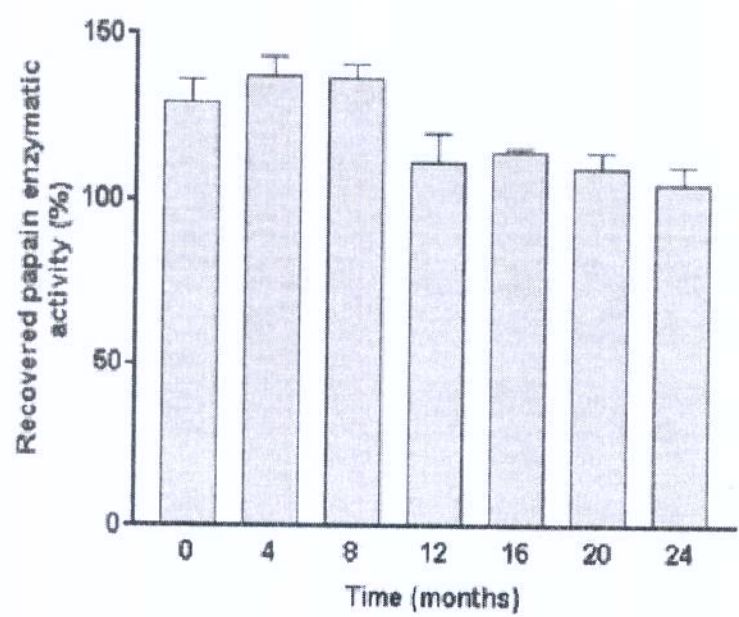


Figure 3



4. TESTE DE PERMEABILIDADE *IN VIVO*

Três formulações foram avaliadas no teste de permeabilidade *in vivo*:

- F1 contendo somente diclofenaco dietilâmonio (1.2%) e Crodabase SQ (gel de óleo mineral e polietileno);
- F2 contendo papaína (2%), diclofenaco dietilâmonio (1.2%) e Crodabase SQ (gel de óleo mineral e polietileno);
- F3 contendo bromelina (2%), diclofenaco dietilâmonio (1.2%) e Crodabase SQ (gel de óleo mineral e polietileno).

A formulação F3 foi utilizada para teste a fim de verificar se a bromelina, tratando-se também uma enzima proteolítica, apresentaria comportamento semelhante ao esperado para papaína.

O teste de permeabilidade *in vivo* consistiu de duas etapas: primeiramente a etapa clínica, quando os voluntários foram tratados (aplicação tópica) com as formulações descritas acima, e a seguir, amostras de sangue foram coletadas dos mesmos. Já na segunda etapa, a analítica, foi realizada a análise e quantificação do diclofenaco na amostras de plasma através de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS/MS). Através dos resultados obtidos na quantificação do fármaco foi avaliado se a presença da papaína na formulação de diclofenaco teve influência significativa na permeabilidade do fármaco na pele, isto é, se a enzima apresenta atividade potencializadora da penetração cutânea de diclofenaco em voluntários humanos.

4.1.ETAPA CLÍNICA:

4.1.1. Características do estudo:

Nesta etapa foram selecionados doze voluntários homens saudáveis com idade média entre 18 e 44 anos e índice de massa corporal média entre 20.7 a 26.2 Kg/m² que passaram por avaliações clínicas e laboratoriais prévias e posteriores ao estudo.

O estudo foi aberto, dose simples e randomizado, com três períodos de tratamento de 96 horas cada e uma semana de intervalo entre um tratamento e

outro. Os voluntários foram divididos em três grupos iguais e, em cada período cada grupo recebeu uma formulação diferente até que todos os voluntários fossem tratados com as três formulações (F1, F2 ou F3), porém em períodos distintos.

4.1.2. Seleção de voluntários:

Para a seleção dos voluntários e inclusão dos mesmos os seguintes critérios deveriam ser atendidos:

- Ser do sexo masculino;
- Ter idade entre 18 e 50 anos;
- Ter índice de massa corporal maior que 19 e menor que 28 Kg/m²;
- Apresentar bom estado de saúde após conclusão dos exames: físico, monitoramento da pressão arterial e frequência cardíaca, eletrocardiograma padrão e exames laboratoriais.
- O voluntário, após ter sido informado sobre a natureza e proposta do estudo (incluindo a possibilidade de riscos e efeitos colaterais), deve concordar com a proposta do estudo, assinando um termo de consentimento.

Foram excluídos do estudo os voluntários que apresentaram um ou mais dos critérios abaixo:

- Resultados de exames laboratoriais fora dos limites de normalidade;
- O voluntário ter participado de um estudo experimental três meses antes do início deste estudo;
- Doença clínica significativa ou cirurgia dentro de 8 semanas imediatamente antes do início deste estudo ou manutenção da terapia com algum fármaco;
- Hospitalização por alguma reação dentro de 8 semanas antes do início deste estudo;
- Histórico de dependência de drogas, medicamento ou álcool ou ingestão de álcool dentro de 48 horas antes do início da internação para o estudo;
- Histórico de doença hepática, renal, epilética ou hemopoiética;
- Hipotensão ou hipertensão (fora do limite 100-140 mmHg para a pressão sanguínea sistólica e 60-90 mmHg para diastólica ou frequência cardíaca fora

do limite 50-90 bpm);

- Infarto do miocárdio, angina pectoris e/ou deficiência cardíaca congestiva;
- Doação ou perda de sangue dentro de 3 meses antes deste estudo ou mais que 1500 mL dentro de 12 meses prévios ao estudo;
- Histórico de hipersensibilidade ao diclofenaco e sérias reações adversas ou hipersensibilidade a algum fármaco ou presença de alergia requerendo tratamento;
- Alta ingestão de cafeína (mais que 5 xícaras de chá ou café/dia);
- Fumantes;
- Mulheres grávidas;
- Histórico ou presença de doença no trato gastrointestinal, fígado ou rins, ou qualquer outra condição conhecida que interfira na absorção, distribuição, metabolismo ou excreção de fármacos.

4.1.3. Aspectos Éticos:

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp e conduzido de acordo com a Declaração de Helsinki.

Todos os voluntários foram informados verbalmente e por escrito sobre a natureza e proposta do estudo clínico. Em concordância com o estudo e ciente da possibilidade de riscos e efeitos colaterais, os voluntários assinaram um termo de consentimento.

4.1.4. Dose e local de aplicação:

A dose única de aplicação para cada uma das formulações (F1, F2 ou F3) foi de 5 g e o local de aplicação foi na região dorsal do voluntário.

4.1.5. Coleta de sangue:

Foram feitas coletas de sangue em cada voluntário antes do tratamento com cada formulação e nos tempos: 0:10, 0:20, 0:30, 0:40, 0:50, 1:00, 1:10, 1:20, 1:30, 1:40, 1:50, 2:00, 2:15, 2:30, 2:45, 3:00, 3:15, 3:30, 3:45, 4:00, 4:20, 4:40, 5:00, 5:20, 5:40, 6:00, 6:30, 7:00, 7:30, 8:00, 10:00, 12:00, 24:00; 48:00 e 96:00 após a dose administrada topicamente para cada formulação. Em cada ocasião, 4 mL de sangue foram coletados dos voluntário através de seringa, sendo que cada amostra de sangue foi armazenada em tubo limpo contendo anti-coagulante. Após centrifugação da mesma por 2000 g a 4°C por 10 minutos, o plasma foi transferido para tubo devidamente identificado e estocado a -15°C até o momento da análise.

4.2. ETAPA ANALÍTICA:

4.2.1. Curva de calibração, padrão interno e controles de qualidade:

A curva de calibração foi preparada em plasma branco nas concentrações: 50, 100, 200, 500, 1000, 2000 e 5000 ng/mL e realizada em duplicata. Foram utilizadas também amostras de branco (plasma sem padrão interno) e amostras de zero (plasma branco com padrão interno) em duplicata.

O padrão interno utilizado neste estudo foi a fluvastatina, preparada em solução de metanol e água (50:50 v/v) na concentração 1000 µg/mL.

Foram utilizados os controles de qualidades: CQA na concentração de 3 ng/mL, CQB na concentração de 30 ng/mL e CQC na concentração de 450 ng/mL.

4.2.2. Extração fase sólida:

O procedimento descrito a seguir foi aplicado para as amostras, curva de

calibração e controles de qualidade.

Adicionou-se 500 µL da amostra de plasma humano em um tubo de vidro e o mesmo foi homogeneizado sob agitação por 10 segundos. Adicionou-se 50 µL de solução de fluvastatina a 1000 µg/mL, homogeneizando-se o tubo por mais 10 segundos. Adicionou-se de 500 µL de água deionizada e transferiu-se a amostra para cartucho de HLB Oasis SPE pré-condicionados através de lavagem com 1 mL de metanol seguido de 1 mL de água deionizada. Sob vácuo leve, a amostra foi eluída vagarosamente pelo cartucho, efetuando-se lavagem do mesmo com 1 mL de solução de lavagem (1 mL de metanol e 1mL de água deionizada) por 5 vezes. O cartucho foi eluído com 0,4 mL de metanol lentamente e coletado dentro de tubo de vidro utilizando fluxo de nitrogênio. A solução coletada foi então transferida para microtubo de 2,00 mL e centrifugada a 18000 rpm durante 5 minutos. Transferiu-se a solução para vial de vidro e colocou-se no auto-injetor.

4.2.3. Condições cromatográficas e espectrométricas:

O sistema cromatográfico (Shimadzu, modelo LC-10AD VP) foi constituído de uma coluna analítica C18 (100 mm X 2.1 mm) e fases móveis em gradiente: A contendo água e ácido fórmico (99:1 v/v) e B contendo metanol e ácido fórmico (99:1 v/v) em um fluxo de 0.450 mL/min. A coluna foi operada a temperatura ambiente e a temperatura no auto injetor (CTC Analytics, HTSPal) foi de 8°C com um volume de injeção de 20 µL. O tempo de retenção para o diclofenaco e fluvastatina foram respectivamente: 2.8±0.1 e 2.7±0.1.

O espectrômetro de massas utilizado foi o API 4000 (Applied Biosystems) com fonte eletrospray operando em modo positivo (ES+). Os íons foram monitorados em MRM (Monitoramento de Múltipla Reação). Foram utilizados para a quantificação do diclofenaco e da fluvastatina o MRM m/z e 296.1 → 214.2 e 412.0 → 266.2 respectivamente.

A validação do método para a determinação de diclofenaco em plasma humano utilizando fluvastatina como padrão interno através de cromatografia

líquida acoplada a espectrômetro de massas foi realizada pelo laboratório Galeno Research Unit Ltda e conduzida em conformidade com as orientações da FDA (Food and Drug Administration) para validação de métodos analíticos.

4.2.4. Resultados:

A figura 1 mostra as médias das concentrações de diclofenaco no plasma humano em função do tempo para as três formulações avaliadas (F1, F2 e F3). Os valores mostrados representam a média geral da concentração do diclofenaco após a administração do fármaco nos 12 voluntários que participaram do estudo, após os três períodos de internação (período 1, 2 e 3). Através de comparação farmacocinética entre as três formulações avaliadas, observa-se que os valores de C_{max} (concentração máxima atingida no plasma após a administração do fármaco) e AUC (área sob a curva) obtidos após tratamento com F1, isto é, formulação contendo apenas o diclofenaco, foram maiores do que das demais formulações contendo as enzimas papaína e bromelina (F2 e F3 respectivamente) (Tabela 1).

Na figura 2 tem-se as curvas das médias das concentrações plasmáticas de diclofenaco no plasma humano em função do tempo para a F1 (formulação contendo somente diclofenaco) nos três períodos de tratamento. Neste caso, os valores obtidos para C_{max} e AUC da F1 no período 3, período em que o voluntário já havia recebido tratamento tanto com F2 e F3, foram significativamente maiores que nos demais períodos (Tabela 2).

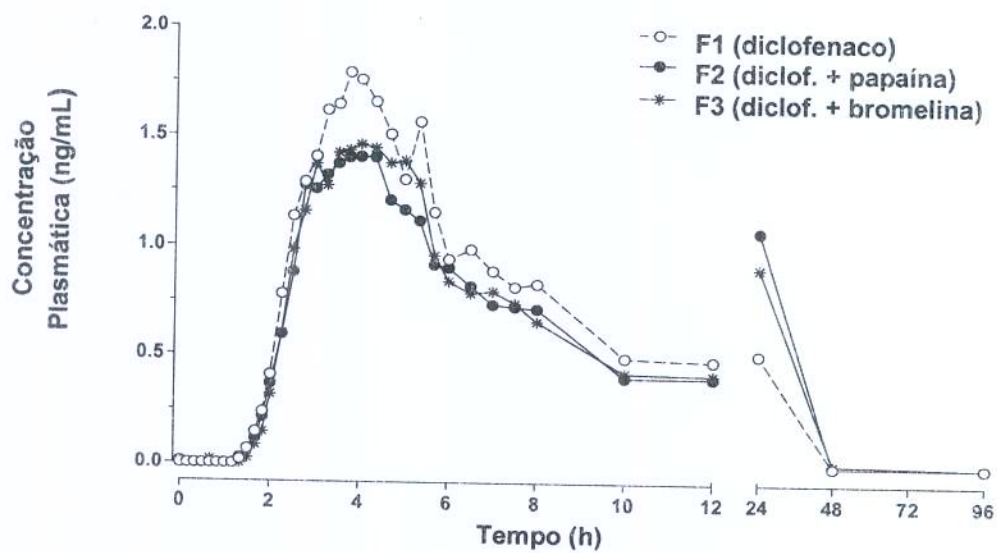


Figura 1: Concentrações médias de diclofenaco em plasma nos 12 voluntários humanos após a administração tópica das formulações F1, F2 e F3.

Formulação avaliada	AUC 0-final	Cmax
Diclofenaco (F1)	15.31 $\pm$ 9.52	2.10 $\pm$ 1.18
diclofenaco + papaína (F2)	16.63 $\pm$ 7.97	2.20 $\pm$ 1.01
diclofenaco + bromelina (F3)	16.26 $\pm$ 10.73	2.02 $\pm$ 1.26

Tabela 1: Valores de AUC e Cmax obtidos do gráfico da média geral. Os valores representam a média $\pm$ o desvio padrão das concentrações do diclofenaco no plasma dos 12 voluntários que participaram do estudo clínico.

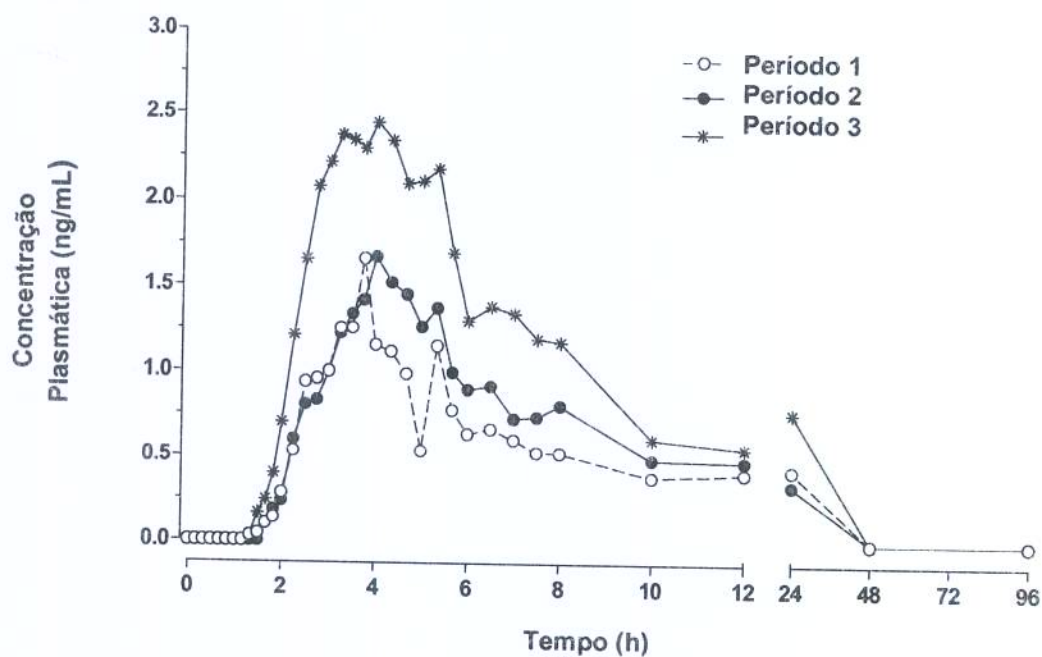


Figura 2: Concentrações médias de diclofenaco em plasma para a formulação F1 administrada topicamente nos 3 periodos de aplicação da etapa clínica.

Período de tratamento	AUC 0-final	Cmax
Período 1	11.34 ± 9.95	1.78 ± 1.59
Período 2	13.40 ± 8.63	1.75 ± 1.15
Período 3	21.20 ± 9.31	2.77 ± 0.62

Tabela 2. Valores de AUC e Cmax obtidos após aplicação da formulação sem enzima (F1) nos três períodos. Os valores representam a média ± o desvio padrão dos 4 voluntários de cada período.

5. DISCUSSÃO GERAL

A barreira dérmica representa um ambiente bioquímico altamente complexo e constitui uma barreira ao ingresso de agentes químicos. Somente recentemente os detalhes bioquímicos e fisiológicos desta barreira estão sendo desvendados e novas formulações de uso tópico estão sendo desenvolvidas para aumentar a penetração de drogas farmacologicamente ativas. A bicamada lipídica que forma a matriz intercelular lipídica dentro o estrato córneo, juntamente com o ambiente intracelular altamente queratinizado dos corneócitos compactados, forma uma barreira muito eficiente que deve ser rompida se drogas com baixo poder de penetração são administradas através da pele (Harada et al., 1992).

O primeiro relato do uso de enzimas como potencializadores de penetração foi feito por Patil et al. (1996), utilizando aplicação tópica das enzimas fosfolipase C, triacilglicerol hidrolase, fosfatase ácida e fosfolipase A₂, devido a função importante do metabolismo da fosfatidilcolina durante a maturação da barreira lipídica. Os autores estudaram inicialmente os efeitos da Fosfolipase C na penetração pele de três drogas: ácido benzóico, manitol e testosterona. A fosfolipase C não está presente fisiologicamente na epiderme. Os autores estudaram também o efeito de enzimas epidermais, como triacilglicerol hidrolase, fosfatase ácida e fosfolipase A₂. Foi observado que o pré-tratamento da pele com fosfolipase C aumentou de forma significativa a permeação do ácido benzóico, manitol e testosterona quando comparada com a pele não tratada. A enzima triacilglicerol hidrolase aumentou a penetração do manitol em três vezes, mas não teve efeito na penetração do ácido benzóico. Aplicação tópica de fosfatase ácida não alterou a permeação de nenhum dos três compostos estudados. A enzima fosfolipase A₂ aumentou de forma significativa a permeação do ácido benzóico e manitol, não apresentando efeito significativo na penetração da testosterona. Estes resultados demonstraram, pela primeira vez, que enzimas podem afetar de forma significativa ou mesmo regular a permeação de compostos aplicados topicamente.

Ácido hialurônico é um glicosaminoglicano de alto peso molecular presente na matriz extracelular e está normalmente envolvido no crescimento, inflamação,

regeneração de lesões, regulação do nível de hidratação e nas propriedades plásticas da pele. Laugier et al. (2000) estudaram o efeito do uso de ácido hialurônico e da enzima hialuronidase nos modelos de pele *in vitro* e pele humana intacta. Estes autores verificaram que o uso tópico do ácido hialurônico não foi capaz de aumentar a permeação através da pele no modelo *in vitro* ou pele humana intacta. No entanto, hialuronidase de origem bacteriana aumentou a permeabilidade em ambos os modelos de forma significativa. Estes efeitos foram mais intensos na derme do que na epiderme (Laugier et al., 2000).

Não há na literatura nenhum relato do uso de enzimas proteolíticas como agente potencializador da permeação de fármacos presentes em formulações para uso tópico. Nosso trabalho tem como fator inédito o uso da enzima papaína como potencializadora da penetração do diclofenaco através da pele.

Utilizando modelo experimental para estudo da permeabilidade *in vitro*, observamos que a formulação contendo papaína causou aumento de aproximadamente 50% da penetração do diclofenaco dietilamônio através da pele de porco.

A absorção percutânea pode ser estudada através de métodos *in vitro* que conservam as propriedades de barreira do estrato córneo na pele utilizada para o teste (Howes et al., 1996). Os dados *in vitro* são indicativos para a absorção percutânea *in vivo* em humanos. Tais estudos estão tornando-se cada vez mais freqüentes e são aceitos pelas agências regulatórias para verificar a absorção percutânea de fármacos, cosméticos, pesticidas e substâncias químicas (Howes et al., 1996). Entre as alternativas, o modelo alternativo a pele humano mais confiável é a pele de porco (orelha). Muitos autores utilizaram o modelo da pele de porco em estudos de permeabilidade da pele a diferentes drogas e obtiveram uma boa correlação com a absorção na pele humana (Mekkes et al., 1997; Femenía-Font et al., 2005; Panchagnula et al., 2005).

No teste de permeabilidade *in vivo*, onde foram avaliados os parâmetros de AUC e Cmax, observou-se aumento significativo na permeação do diclofenaco. No entanto, este aumento na permeação de diclofenaco na pele só foi constatado quando a mesma sofreu tratamento anterior com formulação contendo papaína e

não quando a enzima foi administrada juntamente com o diclofenaco. Os valores de AUC aumentaram de 11.34 ± 9.95 nos voluntários tratados na primeira internação com formulação sem enzima para 21.20 ± 9.31 nos voluntários que receberam a formulação sem enzima somente na terceira internação. No caso das C_{max} , os valores aumentaram de 1.78 ± 1.59 ng/mL para 2.77 ± 0.62 ng/mL. Desta forma, o pré-tratamento da pele com enzimas proteolíticas causou aumento da capacidade de penetração do diclofenaco mesmo uma semana após o tratamento.

O fato do gráfico das médias gerais, considerando os 12 voluntários nos três períodos de internação (figura 1), mostrar maior penetração do diclofenaco após tratamento com a formulação na ausência de enzimas, se deve principalmente ao fato dos valores observados com os 4 voluntários que receberam tratamento com formulação contendo enzimas nas duas primeiras internações terem sido muito maiores, como mostrado na tabela 2.

Efeitos das alterações na pele têm sido estudados para avaliar os efeitos na penetração do diclofenaco e outros fármacos. Rosim et al. (2005) avaliou o efeito da fonoforese na penetração do diclofenaco em humanos após aplicação do Voltaren Emulgel (Novartis Biociências S/A). Quatorze voluntários foram submetidos a irradiação de Ultra-som seguida pela aplicação do gel. A concentração do diclofenaco no plasma dos voluntários que receberam tratamento de Ultra-som antes da aplicação do gel foi significativamente maior do que quando a aplicação do gel foi feita sem tratamento prévio com Ultra-som (aparelho desligado). O mecanismo pelo qual o tratamento com Ultra-som aumentou a penetração do diclofenaco através da pele permanece desconhecido. Higaki et al., (2005) mostraram que a penetração de fármacos, como o diclofenaco, é aumentada topicamente após redução do fluxo sanguíneo local na pele.

O mecanismo de ação de potencializadores de penetração em geral é muito complexo. A maioria deles interage com um domínio lipídico intercelular do estrato córneo (Williams e Barry, 2004). O estrato córneo é uma estrutura formada por células mortas (corneócitos) intercaladas repletas de proteínas e lipídeos, compondo uma efetiva barreira à entrada da maioria das substâncias (Huang et

al., 2005). Devido a atividade proteolítica da papaína é mais provável que ela atue sobre a queratina intercelular do estrato córneo, promovendo sua hidrólise e formando vacúolos que poderiam facilitar a entrada de fármacos dentro da pele. Uma outra possibilidade seria a papaína estar afetando a integridade dos desmossomos, responsáveis por manterem a coesão entre os corneócitos.

Efeitos sinérgicos podem ser encontrados com a associação de potencializadores de penetração, como por exemplo, o ácido oléico e o Transcutol® em formulação de nimesulide em gel (Gungor e Bergisadi, 2004). Sinergismos similares foram descritos em outras pesquisas (Escribano et al., 2003; Escobar-Chavez et al., 2005; Wang et al., 2005). Entretanto, neste estudo nenhum teste foi realizado para avaliar a ação sinérgica da papaína com outras substâncias ou componentes da pomada.

Vários reagentes normalmente utilizados na produção de formulações tópicas foram testados para avaliar o efeito direto sobre a atividade enzimática da papaína. Tanto o propileno glicol quanto a base emulsificada O/A (óleo em água) reduziram significativamente a atividade catalítica da enzima quando incubadas individualmente com a mesma. Estes reagentes foram então excluídos da formulação. O propileno glicol é um reagente largamente utilizado na indústria farmacêutica na produção de diversas formulações de uso tópico. Este reagente atua como um solvente de fármacos lipofílicos e potencializadores de penetração como o Azone, ácidos graxos ou álcoois lipídicos. Uma de suas propriedades é causar alterações estruturais no estrato corneum.

Takeuchi et al. (1992 – refe 43 do capítulo 3.2), utilizando técnicas de infravermelho, mostraram que mudanças conformacionais nas proteínas do estrato córneo foram detectadas mesmo quando o propileno glicol foi aplicado sozinho na pele. Os autores sugerem que o propileno glicol foi capaz de modificar a conformação de α -queratina para β -queratina. Propileno glicol é incapaz de penetrar nas células do estrato córneo. No entanto, devido a sua alta higroscopia, propileno glicol remove a água acumulada dentro dos corneócitos. Além disso, o propileno glicol substitui a água nos sítios de ligação nos espaços intercelulares.

A papaína é classificada como uma hidrolase, ou seja, uma enzima que hidrolisa uma ligação química, no caso uma ligação peptídica, com consumo de uma molécula de água. A alta capacidade do propileno glicol em substituir moléculas de água nos espaços intercelulares, pode levar também a substituição da água que interage com as moléculas de papaína. Quando estas moléculas de água tornam-se indisponíveis, a enzima pode perder sua atividade enzimática na presença do propileno glicol. Além disso, agentes que interferem na interação da água com proteínas podem causar sua desnaturação. Isto ocorre quando há modificação da estrutura das moléculas de água que interagem com as proteínas, aumentando a solubilidade das cadeias laterais não-polares e enfraquecendo as interações hidrofóbicas que auxiliam na estabilização da conformação nativa das proteínas (Rawn, 1998). Nestes casos, a papaína pode perder sua atividade enzimática devido a uma modificação da sua estrutura nativa enzimaticamente ativa em uma estrutura enzimaticamente inativa.

O estudo de estabilidade da papaína na formulação tópica desenvolvida neste trabalho revelou que a enzima mostrou-se altamente estável quando armazenada a temperatura ambiente por um período de 24 meses e também em câmara fria a 4°C por 6 meses. No entanto, sob a condição de estabilidade acelerada a 45°C, a papaína perdeu significativamente a sua atividade catalítica, indicando ser uma condição inadequada para avaliar a sua atividade enzimática.

Os resultados obtidos nos estudos *in vivo* de alergenidade cutânea da papaína indicaram que a enzima pode ser utilizada em formulações de uso tópico, já que não causou nenhum tipo de reação adversa na pele dos voluntários humanos.

O resultado positivo obtido para papaína nos dois testes de permeabilidade confirmando seu efeito como potencializadora da penetração cutânea de diclofenaco, sugere testá-la em formulações tópicas contendo outros fármacos de importante uso como: corticosteróides, tretinoína, lidocaína, aciclovir e até mesmo outros AINEs como o ibuprofeno e o piroxicam.

6. CONCLUSÃO GERAL

Foi desenvolvida uma formulação de pomada contendo papaína, capaz de manter a atividade da enzima por um período de pelo menos 24 meses quando armazenada a temperatura ambiente.

A papaína não induziu nenhum processo de irritação, ou de sensibilização cutânea e não provocou fotoalergia nem fototoxicidade durante o período de estudo, sendo, portanto, aprovada para uso tópico.

Embora não se tenha estudado o mecanismo de ação da papaína sobre a pele, ela pode ser considerada uma nova opção para substância potencializadora de penetração melhorando consideravelmente a eficiência de formulações de uso tópico, já que foi mostrada *in vitro* e *in vivo* sua capacidade de aumentar significativamente a penetração de diclofenaco dietilamônio na pele.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Brunner, M.; Dehghanyar, P.; Seigfried, B.; Martin, W.; Menke, G.; Müller, M. Favourable dermal penetration of diclofenac after administration to the skin using a novel spray gel formulation. **Br J Clin Pharmacol**, 60 (5): 573-7, 2005.
- Calpena, A.C.; Escribano, E.; San Martin, H.; Lauroba, J.; Obach, R.; Domenech, J. Influence of the formulation on the in vitro transdermal penetration of sodium diclofenac. Evaluation of the topical and systemic anti-inflammatory activity in the rat. **Arzneimittelforschung**, 49: 1012-7, 1999.
- Cevc, G. Drug delivery across the skin. **Expert Opin Investg Drugs**, 6: 1887-937, 1997.
- Cevc, G.; Blume, G. New, highly efficient formulation of diclofenac for the topical transdermal administration in ultradeformable drug carriers, transfersomes. **Biochim Biophys Acta**, 1514: 191-205, 2001.
- Chlud, K. Use of topical non-steroidal anti-inflammatory drugs in aggravated and decompensated arthroses. **Wien Med Wochenschr**, 149: 546-7, 1999.
- Curdy, C.; Kalia, Y. N.; Naik, A.; Guy, R.H. Piroxicam delivery into human stratum corneum in vivo: iontophoresis versus passive diffusion. **J Control Release**, 76: 73-9, 2001.
- Dayal, P.; Kanikkannan, N.; Singh, A.; Sing, M. Comparison of the transdermal absorption of nimesulide from three commercially available gel formulations. **Drug Dev Ind Pharm**, 28: 297-304, 2002.
- Ecobar-Chavez, J. J.; Quintanar-Guerrero, D.; Ganem-Quintanar, A. In vivo skin permeation of sodium naproxen formulated in pluronic F-127 gels: effect of Azone and Transcutol. **Drug Dev Ind Pharm**, 31: 447-54, 2005.
- Elias, P. M. Epidermal lipids, barrier function and desquamation. **J Invest Dermatol**, 80: 44-9, 1983.
- Elias, P. M. Stratum corneum architecture, metabolic activity and interactivity with subjacent cell layers. **Exp Dermatol**, 5: 191-201, 1996.

- Escribano, E.; Calpena, A.C.; Queralt, J.; Obach, R.; Doménech, J. Assessment of diclofenac permeation with different formulations: anti-inflammatory study of a selected formula. **Eur J Pharm Sci**, 19: 203-10, 2003.
- Femenía-Font, A.; Balaguer-Fernández, C.; Merino, V.; Rodilla V.; López-Castellano, A. Effect of chemical enhancers on the in vitro percutaneous absorption of sumatriptan succinate. **Eur J Pharm Biopharm**, 61: 50-5, 2005.
- Ghafourian, T.; Zandasrar, P.; Hamishekar, H.; Nokhodchi, A. The effect of penetration enhancers on drug delivery through skin: a QSAR study. **J Control Release**, 99: 113-25, 2004.
- Guggi, D.; Bernkop-Schnürch, A. Improved paracellular uptake by the combination of different types of permeation enhancers. **Int J Pharm**, 288: 141-50, 2005.
- Gungor, S.; Bergisadi, N. Effect of penetration enhancers on in vitro percutaneous penetration of nimesulide through rat skin. **Pharmazie**, 59: 39-41, 2004.
- Gupta, S.K.; Bansal, P.; Bhardwarj, R.K.; Jaiswal, J.; Velpandian, T. Comparison of analgesic and anti-inflammatory activity of meloxicam gel with diclofenac and piroxicam gels in animal models: pharmacokinetic parameters after topical application. **Skin Pharmacol Appl Skin Physiol**, 15: 105-11, 2002.
- Gupta, S.K.; Prakash, J.; Awor, L.; Joshi, S.; Velpandian, T.; Sengupta, S. Anti-inflammatory activity of topical nimesulide gel in various experimental models. **Inflamm Res**, 45: 590-2, 1996.
- Guzzo, C. A.; Lazarus, G. S.; Werth, V. P. Farmacologia Dermatológica. In: Gilman, A. G. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 9ª edição. México: Mc Graw-Hill, 1996, p. 1181-2.
- Hadgraft, J.; Lane, M.E. Skin permeation: The year of enlightenment. **Int J Pharm**, 305: 2-12, 2005.
- Harada, K.; Murakami, T.; Yata, N.; Yamamoto, S. Role of intercellular lipids in stratum-corneum in the percutaneous permeation of drugs. **J. Invest. Dermatol**, 99: 278, 1992.

- Higaki, K.; Nakayama, K.; Suyama, T.; Amnuaikit, C.; Ogawara, K.; Kimura, T. Enhancement of topical delivery of drugs via direct penetration by reducing blood flow rate in skin. **Int J Pharm**, 288: 227-33, 2005.
- Howes, D.; Guy, R.; Hadgraft, J.; Heylings, J.; Hoeck, U.; Kemper, F.; Maibach, H.; Marty, J.P.; Merk, H.; Parra, J.; Rekkas, D.; Rondelli, I.; Schaefer, H.; Täuber, U.; Verbiese, N. Methods for Assessing Percutaneous Absorption. In: The report and recommendations of European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM) Workshop 13. **ATLA**, 24: 81-106, 1996.
- Huang, X.; Tanojo, H.; Lenn, J.; Deng, C.H.; Krochmal, L. A novel foam vehicle for delivery of topical corticosteroids. **J Am Acad Dermatol**, 53: 526-38, 2005.
- Idson, B.; Lazarus, J. Semi-sólidos. In: Lachman, L., Lieberman, H. A., Kanig, J. L. **Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2001. p. 907-15.
- Khaparde, S. S.; Singhal, R. S. Chemically modified papain for applications in detergent formulations. **Bioresour Technol**, 78: 1-4, 2001.
- Kikwai, L.; Babu, J.; Prado, R.; Kolot, A.; Armstrong, C.A.; Ansel, J.C.; Singh, M. In vitro and in vivo Evaluation of topical formulations of Spantide II. **AAPS Pharm Sci Tech**, 6: 565-72, 2005.
- Laugier, J.P.; Shuster, S.; Rosdy, M.; Csoka, A.B.; Stern, R.; Maibach, H.I. Topical hyaluronidase decreases hyaluronic acid and CD44 in human skin and in reconstituted human epidermis: evidence that hyaluronidase can permeate the stratum corneum. **Br J Dermatol**, 142: 226-33, 2000.
- Laugier, J.P.; Shuster, S.; Rosdy, M.; Csoka, A.B.; Stern, R.; Maibach, H.I. Topical hyaluronidase decreases hyaluronic acid and CD44 in human skin and in reconstituted human epidermis: evidence that hyaluronidase can permeate the stratum corneum. **Br J Dermatol**, 142: 226-33, 2000.
- Le Hir, A. Via percutânea. In: Le Hir, A. **Noções de Farmácia Galênica**. 6ª edição. São Paulo: Organização Andrei Editora, 1997. p.417-23.

- Mekkes, J. R.; Le Poodle, I. L.; Das, P.K.; Kammeyer, A.; Westerhof, W. *In vitro* Tissue-digesting properties of krill enzymes compared with fibrinolysin/DNAse, papain and placebo. **Int J Biochem Cell Biol**, 29: 703-6, 1997.
- Ménard, R.; Storer, A.C. Papain. In: Barrett, A.J.; Rawlings, N.D.; Woessner, J.F. **Handbook of Proteolytic Enzymes**. London: Academic Press, 1998. p. 555-7.
- Mycek, M. J.; Harvey, R. A.; Champe, P. C. Fármacos antiinflamatórios. In: Mycek, M. J.; Harvey, R. A.; Champe, P. C. **Farmacologia Ilustrada**. 2ª edição. Porto Alegre: Artmed, 1998. p. 402-4.
- OECD (2004) Guideline for testing of chemicals. Guideline 428: Skin absorption: *in vitro* method (Diretriz original adotada em 13 de abril de 2004)
- Panchagnula, R.; Bokalia, R.; Sharma, P.; Khandavilli, S. Transdermal delivery of naloxone: skin permeation, pharmacokinetic, irritancy and stability studies. **Int J Pharm**, 293: 213-23, 2005.
- Patil, S.; Singh, P.; Szolar-Platzer, C.; Maibach, H. Epidermal enzymes as penetration enhancers in transdermal drug delivery? **J Pharm Sci**, 85: 249-52, 1996.
- Rang, H. P.; Dale, M. M.; Ritter, J. M; Moore, P.K. Fármacos antiinflamatórios e imunossupressores. In: Rang, H. P.; Dale, M. M.; Ritter, J. M; Moore, P.K.. **Farmacologia**. 5ª edição. Rio de Janeiro: Elsevier Editora, 2004. p. 278-81.
- Rawn, J. D. **Biochemistry**. In: Neil Patterson Publ., Burlington, 1105 p., 1989
- Rosim, G.C.; Barbieri, C.H.; Lanças, F.M.; Mazzer N. Diclofenac phonophoresis in human volunteers. **Ultrasound Med Biol**, 31: 337-43, 2005.
- Schmidt, H. Effect of papain on different phases of prenatal ontogenesis in rats. **Reprod Toxicol**, 9: 49-55, 1995.
- Sengupta, S.; Velpandian, T.; Kabir, S.R.; Gupta, S.K. Analgesic efficacy and pharmacokinetic of topical nimesulide gel in healthy human volunteers: double-blind comparison with piroxicam, diclofenac, and placebo. **Eur J Clin Pharmacol**, 54: 541-7, 1998a.

- Sengupta, S.; Velpandian, T.; Sapra, P.; Mathur, P.; Gupta, S.K. Comparative analgesic efficacy of nimesulide and diclofenac gels after topical application on the skin. **Skin Pharmacol Appl Skin Physiol**, 11: 273-8, 1998b.
- Souza, V. M. Anatomia, histologia e fisiologia da pele. In: Souza, V. M. **Ativos dermatológicos**. 2ª edição. São Paulo: Tecnopress, 2004. p. 23-28. v. 1.
- Starley, I.A.; Mohammed, P.; Schneider, G.; Bickler, S.W. The treatment of paediatric burns using topical papaya. **Burns**, 25: 636-9, 1999.
- Steen, K.H.; Wegner, H.; Meller, S.T. Analgesic profile of peroral and topical ketoprofen upon low pH-induced muscle pain. **Pain**, 93: 23-33, 2001.
- Surber, C.; Smith, E. The vehicle: the pharmaceutical carrier of dermatological agents. In: Gabard, B.; Elsner, P.; Surber, C.; Treffel, P. **Dermato-Pharmacology of Topical Preparation**. Germany: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2000. p.9-12.
- Takeuchi Y.;Yasukawa H.; Yamaoka Y.; Kato Y.; Morimoto Y.; Fukumori Y.; Fukuda T. Effects of fatty acids, fatty amines and propylene glycol on rat stratum corneum lipids and proteins in vitro measured by fourier transform infrared/attenuated total reflection (FT-IR/ATR) spectroscopy. **Chem Pharm Bull**, 40: 1887-92, 1992.
- Wang, Y.Z.; Ren, T.C.; Xiao, Y.Q. Effects of different penetration enhancers on percutaneous absorption of lappaconitine gel in vitro. **Zhongguo Zhong Yao Za Zhi**, 30: 665-8, 2005.
- Williams, A.C.; Barry, B. W. Penetration enhancers. **Drug Deliv**, 56: 603-18, 2004.
- Yener, G.; Gonullu, U.; Uner, M.; Degim, T.; Araman, A. Effect of vehicles and penetration enhancers on in vitro percutaneous absorption of celecoxib through human skin. **Pharmazie**, 58:330-3, 2003.