EFEITO DO ULTRASSOM TERAPÊUTICO NA LIBERAÇÃO E PERMEACÃO DE CAFEÍNA LIPOSSOMADA EM SISTEMA DE DIFUSÃO VERTICAL

EFFECT OF THERAPEUTIC ULTRASOUND IN THE RELEASE AND PERMEATION OF CAFFEINE LIPOSOMES IN VERTICAL DIFFUSION SYSTEMS

MARQUES, Luana¹; TASSINARY, João Alberto¹(*); Schmidtt, Bárbara¹, Bianchetti, Paula¹, Stülp, Simone¹*

¹Universidade do Vale do Taquari – UNIVATES, Núcleo de Eletrofotocímica e Materiais Poliméricos.
Av. Avelino Talini, 171, CEP 95914-014, Lajeado – RS, Brasil
(fone: +55 51 3714 7000 ramal 5956)

* Simone Stülp
e-mail: stulp@univates.br

Received 28 November 2017; received in revised form 02 October 2018; accepted 02 October 2018

RESUMO

O desenvolvimento de formulações tópicas oferecem novos sistemas de liberação de substâncias capazes de contornar as limitações da permeabilidade cutânea imposta pelo estrato córneo. Um recurso utilizado para diminuir a resistência cutânea é o Ultrassom Terapêutico, que através da fonoforese, oferece concentração adequada do ativo sobre o tecido. O estudo compara o efeito da liberação e permeação da cafeína lipossomada 5% associada ao ultrassom. Em análise de liberação utilizou-se cafeína lipossomada com o ultrassom nos tempos de 5, 10, 15 e 20 minutos. Em análise da permeação utilizou-se biomembrana de pele de cobra em tempo de 20 minutos. Observou-se diferença na liberação da substância, porém quando comparado com os tempos utilizando o ultrassom, esta se apresenta de forma mais acentuada. Em termos de permeação, houve um maior incremento associado ao ultrassom. Sendo assim, os resultados sugerem a importância da fonoforese no aumento da permeação de substâncias sobre a pele.

Palavras-chave: *Ultrassom. Fonoforese. Cafeína.*

ABSTRACT

The development of new topical formulations provides new release systems of substances that are capable of outline the limitations imposed by the skin permeability of the stratum corneum. A resource used to reduce skin resistance is Therapeutic Ultrasound that by phonophoresis provides adequate concentration of the active to the skin. The study compares the effect of the release and permeation caffeine liposomes 5% combined with ultrasound. In release analysis, caffeine liposomes in times of 5, 10, 15 and 20 minutes were used with the ultrasound. In the permeation analysis, biomembrane snake skin was used in a time of 20 minutes. A difference in the release of the substance was observed, but when compared with the times using the ultrasound, the difference was noticed more markedly so. In terms of permeation, there was a greater increase associated with ultrasound. Thus, the results suggest the importance of phonophoresis increase in permeation of substances on the skin.

Keywords: *Ultrasound. Phonophoresis. Caffeine.*

INTRODUÇÃO:

O desenvolvimento das tecnologias de encapsulação de substâncias tem possibilitado à indústria farmacêutica condutas terapêuticas que oferecem resultados mais eficientes por meio do transporte de variadas formulações de compostos ativos, os quais representam novas possibilidades de sistemas de liberação de substâncias capazes de contornar as limitações existentes na permeabilidade cutânea (SILVA *et al.*, 2010; CHORILLI *et al.*, 2017; GOH *et al.*, 2015).

A pele é impermeável a macromoléculas, tais como peptídeos, proteínas, oligonucleotídeos e DNA. As barreiras físicas e enzimáticas criam uma barreira extremamente eficiente para permeação em circunstâncias normais.

Existem diversas formas de encapsular substâncias que são utilizadas para a administração de ativos (CHORILLI *et al.*, 2017), dentre elas estão os lipossomas, que são caracterizados por apresentar uma estrutura esférica e fechada, que possui uma ou várias membranas concêntricas, as quais são compostas por moléculas de fosfolipídios, com variação no seu tamanho de 20 nm ou até dezenas de μm e espessura de membrana 4-5 nm³ (BATISTA; CARVALHO; MAGALHÃES, 2007).

O seu sistema de liberação é bastante favorável, pois atinge características específicas que proporcionam a velocidade no transporte de ativos sobre o estrato córneo, otimizando os resultados, sendo atualmente disponíveis para a comercialização do uso em tratamentos clínicos (GOH *et al.*, 2015; BATISTA; CARVALHO; MAGALHÃES, 2007).

Assim como recursos farmacológicos estão sendo estudados, há interesse em estudos direcionados a recursos eletroterapêuticos, como o Ultrassom (US) Terapêutico, que quando associado à permeação de compostos é denominada fonoforese, apresentando o objetivo de diminuir a resistência cutânea, favorecendo a permeação transdérmica de substâncias, devido a sua capacidade de aumento da permeabilidade da membrana, acelerando a liberação de compostos ativos através do uso desta terapia (TASSINARY; BIANCHETTI; REMPEL, 2011; GUIMARÃES, 2011). A aplicação da fonoforese tem como objetivo principal oferecer concentração adequada de ativos sobre o tecido,

sem causar danos (EBRAHIMI *et al.*, 2012).

O tratamento realizado por terapia ultrassônica ocorre através de vibrações mecânicas com frequência entre 1 MHz e 3 MHz, sendo que potências maiores são facilmente absorvidas por tecidos superficiais. O estímulo proporciona variadas mudanças no tecido, que consequentemente sofrerá determinadas alterações devido à tensão mecânica produzida pela onda ultrassônica (EBRAHIMI *et al.*, 2012). A utilização do US terapêutico pode ocorrer com e sem a conjugação de fármacos, sendo que quando há esta associação o efeito esperado é o incremento de permeação.

A cafeína está entre as substâncias que pode ser utilizada e empregada com a terapia de fonoforese, além de ser também veiculada ao sistema de lipossomas para acelerar o seu transporte. A cafeína é caracterizada em ser um alcalóide, pertencente ao grupo 1,3,7 – trimetilxantinas, a qual é encontrada de forma natural principalmente nas sementes de café (Coffee), e em folhas de chá verde (*Camilla sinensis*) (TASSINARY, BIANCHETTI; REMPEL, 2011; MARIA; MOREIRA, 2007).

Utilizada como um agente terapêutico, a cafeína exerce ação na hipoderme, promovendo ação lipolítica (TASSINARY; BIANCHETTI; REMPEL, 2011), a qual se deve à mobilização de ácidos graxos livres nos tecidos, pois aumenta a concentração de AMP cíclico dentro das células, o que estimula a atividade da enzima lipase, que atua na quebra de triglicerídeos (KRUPEK; COSTA, 2012), além de apresentar ação sobre variações específicas no sistema cardiovascular, sistema nervoso central, e homeostase de cálcio (MARIA; MOREIRA, 2007).

A permeação transdérmica de substâncias depende da afinidade do composto com o tipo celular presente nas camadas da pele, assim como a estrutura da substância, acidez do meio, pKa do ativo, entre outros fatores (CHORILLI *et al.*, 2007). A pele é o maior órgão do corpo, pois possui 12% de peso total, sendo constituída por três camadas, a epiderme, responsável em proteger a pele contra agressores externos, a derme, camada intermediária que apresenta os anexos cutâneos, vasos sanguíneos, nervos e terminais nervosos, e a hipoderme, caracterizada como tela subcutânea preenchida com tecido adiposo. O estrato córneo é a última camada da epiderme, faz contato com o meio externo e é composto por

queratinócitos em seu citoplasma que dificultam a permeação de ativos, pois formam uma barreira protetora, evitando tanto a entrada quanto a saída de substâncias, sendo considerado o principal componente a controlar a permeação (SILVA *et al.*, 2010; CHORILLI *et al.*, 2007; DUTRA; BIANCHETTI; STÜLP, 2013; GUIRRO; GUIRRO, 2002).

Para avaliar a permeação de substâncias, são utilizados modelos de biomembrana de pele de cobra, pois possuem similaridade com a espessura e composição lipídica do estrato córneo humano, sendo que a pele da *Boa Constrictor* é sugerida como fonte para estudos a fim de simular uma barreira cutânea de permeação *in vitro* (NUNES *et al.*, 2005).

Diante disso, esse estudo teve como objetivo verificar o efeito da liberação e permeação da cafeína lipossomada associada ao ultrassom terapêutico *in vitro* a partir de um sistema de difusão vertical.

MATERIAL E MÉTODOS:

Cafeína Lipossomada 5% na forma de gel hidrossolubilizado (Inventiva, POA – Brasil), Membranas hidrofílicas de 0,45um de acetato de celulose (Sartorius Stedim Biotech), Água-álcool etílico 99,5% (Nuclear) 1:1, muda de pele de cobra (Museu de Ciências Naturais da Univates), Ultrassom Terapêutico Tone Derm, Banho ultratermostatizado Marconi, Célula de difusão vertical tipo Franz, Mesa agitadora.

Análise da liberação e permeação de cafeína lipossomada

O estudo de liberação da cafeína lipossomada 5% foi realizado utilizando uma célula de difusão vertical tipo Franz, preenchida com água e álcool etílico 99,5% (Nuclear) 1:1. Sobre a célula, foi disposta uma membrana de acetato de celulose (Sartorius Stedim Biotech) com porosidade de 0,45um, e posteriormente o gel, contendo a cafeína lipossomada, disposto sobre a célula de forma com que ficasse em contato com a membrana. Em seguida, a célula foi colocada dentro de um banho ultratermostatizado com água aquecida a 37 graus, a fim de simular a temperatura corpórea. O sistema estava sobre um agitador mecânico, pois dentro do compartimento receptor é colocado um agitador magnético a fim de manter a homogeneidade da amostra.

Posteriormente as análises de liberação da cafeína lipossomada foram realizadas com a aplicação do ultrassom terapêutico da marca Tone Derm, através da terapia de fonoforese, na seguinte modulação: modo contínuo, frequência de 3MHz, intensidade de 1,0W/cm².

Para a análise de permeação *in vitro* de cafeína lipossomada foi utilizado o ultrassom terapêutico com célula de difusão vertical tipo Franz com muda de pele de cobra (*Boa Constrictor*). A muda de pele de cobra foi obtida no Museu de Ciências Naturais da Univates, hidratada anteriormente com solução de azida sódica (concentração 0,002%) durante um período de 48 horas para serem utilizadas posteriormente na amostra.

Foram realizadas análises de varreduras espectrofotométricas 190 a 990nm, sendo que nos tempos de 0, 5, 10, 15 e 20 minutos, cada tempo realizado em triplicada, a absorção do composto ocorre no comprimento de onda de 257 nm. Os ensaios foram obtidos por meio de um espectrofotômetro Cary 100 Bio UV/Vis.

Todos os ensaios foram analisados com a aplicação do ultrassom terapêutico e sem a aplicação deste, os resultados foram expressos em média $\pm$ erro padrão da média (EPM). Foi utilizado o teste de Shapiro-Wilk para averiguar normalidade dos dados. As amostras foram processadas por análise de variância de uma via (ANOVA) e pós-teste de Bonferroni. Para os parâmetros com dois grupos, foi utilizado o teste de t de Student. Em todos os casos, os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$. Todas as análises foram realizadas utilizando o software SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) versão 18.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Análises Espectrofotométricas

A partir da curva de calibração, pode-se comparar a liberação de cafeína lipossomada 5% para o meio receptor com e sem a aplicação de fonoforese nos tempos de 0, 5, 10, 15 e 20 minutos, conforme figura 1. A análise comparativa entre os grupos controle e tratado com ultrassom mostrou que nos tempos de 5, 10, 15 e 20 minutos existe diferença em termos de liberação do ativo para a solução receptora.

Figura 1. Efeito do ultrassom terapêutico na liberação de cafeína lipossomada nos tempos de 5, 10, 15 e 20 minutos. Dados expressos em $\pm$ SEM. * $p < 0.05$ vs Controle

Em termos percentuais pode-se evidenciar que em 5 minutos de aplicação de fonoforese sobre o sistema de difusão, a liberação de cafeína aumentou 439,48% quando comparada com o grupo controle. Já o incremento implementado pela onda sonora na liberação do ativo quando comparado com o grupo controle no tempo de 10 minutos é de 643,77%. Nos tempos de 15 e 20 minutos o ultrassom ampliou em 507,33% e 314,67% respectivamente a liberação do ativo.

De acordo com os resultados obtidos, independentemente do tempo analisado, a onda sonora sempre incrementa a liberação da cafeína lipossomada para o meio receptor quando comparado com o grupo controle.

Estudos realizados em célula de difusão vertical, porém com outra classe de substâncias em membrana de acetato de celulose sugere que, a escolha da solução receptora para a análise de amostras depende da solubilidade da determinada substância, ou seja, a taxa de liberação é favorecida pela afinidade e característica do ativo e da fração aquosa do sistema (SILVA *et al.*, 2009).

É importante referir que a liberação do ativo elucidada no grupo controle, já é inicialmente facilitada devido à caracterização dos lipossomas de cafeína, pois classificam-se em unilamelares e são constituídos em uma bicamada e um compartimento aquoso, o qual varia de 20 a 50nm, beneficiando dessa forma a liberação do composto ativo em razão do diâmetro das partículas do lipossoma (CHORILLI *et al.*, 2007).

No entanto, cabe ressaltar que o

ultrassom terapêutico se mostrou ainda mais efetivo nas comparações de liberação com o grupo controle, este maior desempenho pode ser inicialmente atribuído aos fenômenos inerentes à onda sonora. É sabido que a fonoforese só é possível em função da utilização da força da corrente acústica que existe no ultrassom, porém os estudos ainda são muito escassos, mesmo existindo o entendimento que o mesmo consegue aumentar a absorção espectrofotométrica de algumas substâncias em célula de difusão (OGURA; PALIWAL; MITRAGOTRI, 2008; VALANDRO *et al.*, 2015).

De acordo com recentes estudos relacionados à terapia de fonoforese, o mecanismo conhecido como *microstreaming* tem sido o principal agente responsável pela fonoforese, favorecendo a administração de drogas, caracterizados pelos efeitos da cavitação. Esses efeitos são definidos de acordo com o crescimento, a oscilação e o colapso de bolhas de gás que estão sobre pressão da onda sonora em um meio, neste caso, a cafeína lipossomada 5% (EBRAHIMI *et al.*, 2012).

Um estudo *in vitro* realizado com cafeína em sistema de difusão vertical elucidou a eficácia do ultrassom terapêutico no aumento da liberação do ativo para o meio receptor, como fase inicial para novas propostas de estudos envolvendo permeação (TASSINARY; BIANCHETTI; REMPEL, 2011).

Na figura 2 tem-se a comparação da liberação de cafeína lipossomada nos tempos 5, 10, 15 e 20 minutos quando submetidos ao tratamento com onda ultrassônica.

Figura 2. Análise de liberação nos tempos de 5, 10, 15 e 20 minutos com a presença de fonoforese. Dados expressos em $\pm$ SEM. * $p < 0,05$ vs 5 min. ** $p < 0,05$ vs 10 min.

*** $p < 0,05$ vs 15 min. **** $p < 0,05$ vs 20 min

Os resultados demonstram que entre 5 e 10 minutos de aplicação de fonoforese houve um aumento e diferença estatística em termos de liberação do princípio ativo para o meio receptor, o mesmo acontecimento não pode ser evidenciado na comparação entre os tempos 10 e 15 minutos, em contrapartida, entre os tempos de 15 e 20 minutos a diferença estatística volta a se fazer presente. Em termos percentuais, pode-se identificar que em 10 minutos aumentou 205,96% a liberação do princípio ativo para o meio receptor utilizando a terapia de fonoforese em relação a 5 minutos. No tempo de 15 minutos houve aumento de 112% quando comparado a 10 minutos da liberação da substância. Já em 20 minutos observou-se incremento da liberação do ativo em 136,89% comparado ao tempo de 15 minutos.

Os resultados supracitados mostraram que quanto maior for o tempo de irradiação de onda sonora no sistema estudado, maior foi a liberação do princípio ativo, sendo que a liberação é fundamental para que ocorra a permeação de determinadas substâncias subsequentemente. Alguns autores sugerem que a partir da obtenção de bons resultados da liberação de substâncias transdérmicas, pode-se identificar a ocorrência de uma permeação mais acentuada e significativa (MARTINS; VEIGA, 2002). Neste sentido, avaliou-se a permeação de cafeína lipossomada 5% em sistema de difusão vertical, porém com biomembrana de pele de cobra em tempo de 20 minutos utilizando o ultrassom terapêutico.

Em um estudo *in vitro* realizado com hidrocortisona em biomembrana de pele de cobra identificou-se o aumento de fluxo do princípio ativo em sua passagem pelo estrato córneo, sugerido quando existe o incremento do coeficiente de difusão do ativo associado com a solubilidade da substância (DUTRA; BIANCHETTI; STÜLP, 2013).

Na figura 3 tem-se a comparação da permeação da cafeína lipossomada 5% em sistema de difusão vertical a partir do uso de pele de cobra, no tempo de 20 minutos com e sem à aplicação de fonoforese.

Figura 3. Gráfico comparando a permeação de cafeína lipossomada através de muda de pele de cobra, com e sem a aplicação do ultrassom terapêutico no tempo de 20 minutos. Dados expressos em $\pm$ SEM. * $p < 0,05$ vs Controle

O resultado mostrou uma diferença em termos de permeação de cafeína lipossomada, sugerindo um maior incremento da substância para o meio receptor quando associada à terapia de fonoforese. Acredita-se que a velocidade de liberação e, consequentemente, de permeação variam de acordo com as características das formulações (SILVA *et al.*, 2009). Contudo, a ação física causada pela onda ultrassônica que possibilita o mecanismo da cavitação exerce um papel fundamental no transporte transdérmico em virtude da desestruturação das moléculas lipídicas do estrato córneo (EBRAHIMI *et al.*, 2012).

Vale ressaltar que em termos de permeação da substância, observou-se um aumento de 302,62% utilizando a terapia da fonoforese no tempo de 20 minutos comparando ao grupo controle, ou seja, os resultados obtidos evidenciaram maior incremento da permeação de cafeína lipossomada 5% para o meio receptor, devido a aplicação da onda sônica.

É importante reiterar, que segundo a literatura, a cafeína lipossomada por si só já apresenta altos níveis de permeação, pelo fato de a estrutura dos lipossomas ser capaz de absorver e fundir-se com a superfície da pele, induzindo alterações em regiões lipídicas intercelulares nas camadas do estrato córneo, e consequentemente favorecer a permeação de princípios ativos (BETZ *et al.*, 2005).

CONCLUSÕES

Estudos relatam que a terapia da fonoforese favorece o transporte de ativos devido a alterações estruturais que ocorrem no estrato córneo. Essa alteração ocorre devido à desnaturação proteica de queratina, que modifica a forma estrutural lipídica intercelular entre os corneócitos, alterando transitoriamente a permeabilidade cutânea POLAT *et al.*, 2011). Além disso, outra ação produzida pelo ultrassom em tecidos é o conhecido efeito tixotrópico, responsável pela permeação de variadas substâncias (BIANCHETTI *et al.*, 2009).

A ação tixotrópica é considerada um efeito fisiológico do ultrassom terapêutico capaz de diminuir a viscosidade de determinados líquidos no momento em que são agitados mecanicamente. Teoricamente, sabe-se que o efeito tixotrópico quando associado ao ultrassom terapêutico é capaz de transformar em sua prática clínica o estado em que se encontra uma determinada substância diminuindo a sua consistência (BORGES, 2006).

Ao se utilizar a ação tixotrópica, cabe também ressaltar o efeito térmico produzido pelo pulso contínuo quando associado a pressão acústica do ultrassom terapêutico que determina a entrega do princípio ativo sobre o tecido, tendo em vista que é fundamental a absorção da onda ultrassônica para que as vibrações celulares e as partículas atritem entre si, consequentemente causando o efeito térmico, considerado um fator determinante que favorece a permeabilidade da membrana (BORGES, 2006).

Outro aspecto importante para a permeação de substâncias são as vias a qual ocorre: a via transapêndices ou a via transepidérmica, sendo que esta pode ser dividida em intercelular e transcelular. A via intercelular é considerada a mais rápida para a permeação, a substância percorre a matriz extracelular por apresentar características hidrofílicas, facilitando o seu transporte. Na via transcelular a substância por estruturas lipídicas da membrana celular e pelo citoplasma dos queratinócitos, deparando-se com estruturas lipofílicas e hidrofílicas, dificultando a sua permeação (TROMMER; NEUBERT, 2006). Outra via de permeação que não pode ser considerada neste estudo devido ao modelo experimental é o folículo

piloso e os ductos sudoríparos, originados na derme atingem 1% da superfície da pele, tornando irrelevante no transporte de substâncias (FRONZA, 2006). Diante disso, as características das vias de permeação cutânea requerem sistemas terapêuticos transdérmicos com características físico-químicas capazes de atender tais limitações. A ausência da utilização do ultrassom terapêutico associado à fonoforese restringe a disponibilidade da substância em seu aspecto de permeação (SAWAMURA; FRANCO, 2004).

AGRADECIMENTOS:

Os autores agradecem a Univates pelo apoio concedido.

REFERÊNCIAS:

1. Batista C.M., Carvalho C.M.B., Magalhães N.S.S. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: Estado da arte. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, **2007**, 2, 43.
2. Betz G., Aeppli A., Menshutina N., *et al.*: In vivo comparison of various liposome formulations for cosmetic application. *International Journal of Pharmaceutics*, **2005**, 296, 44–54.
3. Bianchetti P., Tassinari J.A.F., Cerutti D.G.U., *et al.*: Avaliação eletroquímica e espectrofotométrica de soluções de rutina submetidas a ultrassom terapêutico. *Revista Liberato*, **2009**, 10, 139-148.
4. Borges F.S. Dermato-funcional: modalidades terapêuticas nas disfunções estéticas. São Paulo: Phorte, **2006**.
5. Chorilli M., Brizante A.C., Rodrigues C.A., *et al.*: Aspectos gerais em sistemas transdérmicos de liberação de fármacos. *Revista Brasileira Farmacêutica*, **2007**, 88, 7-13.
6. Chorilli M., Rimério T.C., Oliveira A.G., *et al.*: Estudo da estabilidade de lipossomas unilamelares pequenos contendo cafeína por turbidimetria. *Revista Brasileira Farmacêutica*, **2007**, 88, 194-199.
7. Chorilli M., Rimério T.C., Oliveira A.G., Scarpa M.V. Obtenção e Caracterização de Lipossomas Unilamelares Pequenos

contendo Cafeína. *Latin American Journal of Pharmacy*, 2007, 5, 26.

8. Dutra C., Bianchetti P., Stülp S. Avaliação da difusão e permeação cutânea in vitro de acetato de hidrocortisona tópica comercial. *Scientia Plena*, **2013**, 9, 10.
9. Ebrahimi S., Abbasnia K., Motealleh A., *et al.*: Effect of lidocaine phonophoresis on sensory blockade: pulsed or continuous mode of therapeutic ultrasound? *Physiotherapy*, **2012**, 98, 57–63.
10. Fronza T. Estudo exploratório de mecanismos de regulação sanitária de produtos cosméticos de base nanotecnológica no Brasil. 2006. 92f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 21 dez. 2006.
11. Goh J.Z., Tang S.N., Chiong H.S., *et al.*: Evaluation of antinociceptive activity of nanoliposome encapsulated and free-form diclofenac in rats and mice. *International Journal of Nanomedicine*, **2015**, 10.
12. Guimarães G.N., Pires-de-campos M.S.M., Leonardi G.R., *et al.*: Efeito do ultrassom e do dexapantenol na organização das fibras colágenas em lesão tegumentar. *Revista Brasileira de Fisioterapia*, **2011**, 15, 227-32.
13. Guirro E., Guirro R. Fisioterapia dermatofuncional: fundamentos, recursos, patologias. São Paulo: Manole, 2002.
14. Krupek T., Costa C.E.M. Mecanismo de ação de compostos utilizados na cosmética para o tratamento da gordura localizada e da celulite. *Revista Saúde e Pesquisa*, **2012**, 5, 555-566.
15. Maria C.A.B., Moreira R.F.A. Cafeína: revisão sobre métodos de análise. *Química Nova*, 2007, 30, 99-105.
16. Martins M.R.F.M., Veiga F. Promotores de permeação para a liberação transdérmica de fármacos: uma nova aplicação para as ciclodextrinas. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, **2002**, 1, 38.
17. Nunes R.S., Azevedo J.R., Vasconcelos A.P., *et al.* Estudo de padronização da pele de cobra espécie – Boa constrictor - como modelo de estrato córneo para permeação de fármacos. *Scientia Plena*, **2005**, 7, 171-175.
18. Ogura M., Paliwal S., Mitragotri S. Low-frequency sonophoresis: current status and future prospects. *Adv Drug Deliv Rev* **2008**, 60, 1218-1223.
19. Polat B.E., Hart D., Langer R., *et al.* Ultrasound-Mediated Transdermal Drug Delivery: Mechanisms, Scope, and Emerging Trends. *Journal Control Release*, **2011**, 152, 330–348.
20. Sawamura A.M.S., Franco S.L. Sistemas Terapêuticos Transdérmicos. *Arq. Apadec*, **2004**, 1, 8.
21. Silva J.A., Apolinário A.C., Souza M.S.R., Damasceno, B.P.G.L., Medeiros, A.C.D. Administração cutânea de fármacos: desafios e estratégias para o desenvolvimento de formulações transdérmicas. *Revista Ciências Farmacêuticas Básica Apl.*, **2010**, 31, 125-131.
22. Silva J.A., Santana D.P., Bedor D.G.C., *et al.* Estudo de liberação e permeação in vitro do diclofenaco de dietilamônio em microemulsão gel-like. *Química Nova*, **2009**, 32, 1389-1393.
23. Tassinari J.A., Bianchetti P., Rempel C. Avaliação dos efeitos do ultrassom terapêutico sobre a cafeína e verificação da liberação em sistema de difusão vertical. *Quim Nova*, **2011**, 34, 1539-1543.
24. Trommer H., Neubert R.H.H. Overcoming the Stratum Corneum: The Modulation of Skin Penetration. *Skin Pharmacol Physiol*, **2006**, 19, 106–121.
25. Valandro F., Tassinari J.A.F., Bianchetti P., *et al.* Avaliação da liberação da rutina associada ao ultrassom contínuo. *Ciência e Natura*, **2015**, 37, 678-683