

Ana Leonilde Dias Couto

**Modelos Teóricos de Difusão Dérmica:
abordagens matemáticas e computacionais
para terapias transdérmicas da Obesidade**

Mestrado em
Tecnologia Bioquímica em Saúde

Setembro de 2013

Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto

Instituto Politécnico do Porto

Ana Leonilde Dias Couto

**Modelos Teóricos de Difusão Dérmica: abordagens
matemáticas e computacionais para terapias
transdérmicas da Obesidade**

Dissertação submetida à Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção de grau de Mestre em Tecnologia Bioquímica em Saúde, realizada sob a orientação do Professor Doutor Rúben Fernandes, Professor Adjunto de Ciências Químicas e das Biomoléculas da Escola Superior Tecnologia da Saúde do Porto do IPP e sob coorientação da Mestre Ana de Moura Pessoa, Assistente Convidada de Engenharia Biomédica da Escola Superior de Estudos Industriais e de Gestão do IPP e da Mestre Sara Reis, Assistente de Engenharia Biomédica da Escola Superior de Estudos Industriais e de Gestão do IPP.

Setembro de 2013

Agradecimentos

Ao terminar esta dissertação, é meu desejo manifestar o verdadeiro reconhecimento e gratidão a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram, auxiliaram e apoiaram a sua realização. Assim agradeço:

À Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Instituto Politécnico do Porto, em especial à Área Científica das Ciências Químicas e das Biomoléculas por me ter proporcionado o ingresso neste curso de mestrado, pelo acolhimento e dedicação durante a frequência do mesmo.

Ao Professor Doutor Rúben Fernandes, à Mestre Ana Moura Pessoa e à Mestre Sara Reis, expresso o meu agradecimento por me terem aceitado como orientanda, pela disponibilidade, incentivo e confiança que depositaram em mim ao longo de todo o trabalho, pelos ensinamentos transmitidos e pela forma amável como sempre me receberam e atenção que sempre me deram.

À Joana Pereira, expresso o meu reconhecimento e a minha gratidão por todo apoio e a ajuda dada na fase final do meu trabalho. Sem a sua ajuda seria mais complicada a finalização do mesmo.

A todos os meus amigos e ao Grupo de Jovens *El Shadday*, especialmente ao Gilberto Gonçalves, à Ermelinda Silva e ao Luís Rocha, por todo o apoio, paciência e amizade demonstrada ao longo destes anos, especialmente neste último ano, assim como toda a compreensão aquando da minha ausência.

A todos os meus familiares, especialmente aos meus avós, família Quinhentas e à tia Rosa Couto; e ainda aos pais do meu namorado, dona Irene e senhor Abílio, que sempre se preocuparam e ao mesmo tempo se interessaram pelo meu trabalho.

Aos meus pais que sempre me formaram enquanto pessoa e sempre me apoiaram na minha escolha profissional, pela confiança depositada desde sempre, e pelos esforços que fizeram diariamente para que conseguisse chegar a esta fase da minha vida.

Por último, agradeço ao meu namorado, Alfredo Silva, que desde início me acompanhou, ajudou e apoiou, pela sua infundável paciência, por toda a amizade, carinho e amor que me oferece desde que nos conhecemos.

A todos o meu muito **OBRIGADO**.

Resumo

É de senso comum que os nutrientes são fundamentais à vida e que a subnutrição leva à acumulação de gorduras que pode chegar a casos de obesidade, tendo como consequência inúmeras complicações de saúde.

Diferentes estruturas neuroanatômicas do cérebro têm um papel essencial no comportamento digestivo. A ação de várias moléculas de sinalização (hormonas, neurotransmissores e neuropéptidos) resulta na regulação da ingestão de alimentos, sendo que, por exemplo, algumas hormonas podem aumentar a sensação de saciedade podendo diminuir o apetite e a ingestão calórica. A descoberta de hormonas envolvidas no balanço energético proporcionou novas oportunidades para desenvolver meios para o tratamento da obesidade.

A transferência de medicação antiobesidade por via tópica ou transdérmica é um desafio pois a pele funciona como uma barreira natural e protetora. Sendo uma barreira com uma grande área de superfície e de fácil acessibilidade, a pele tem potencial interesse na libertação de fármacos específicos a cada terapia. Vários métodos têm sido estudados de modo a permitir um aumento da permeabilidade de moléculas terapêuticas para o interior da pele e através da pele.

As biotecnologias transdérmicas são um campo de interesse cada vez maior, devido as aplicações dérmicas e farmacêuticas que lhes estão subjacentes. Existem vários modelos computacionais e matemáticos em uso que permite uma visão mais abrangente de puros dados experimentais e até mesmo permite a extrapolação prática de novas metodologias de difusão dérmica. Contudo, eles compreendem uma complexa variedade de teorias e suposições que atribuem a sua utilização para situações específicas. Este trabalho, primeiramente analisa, de forma extensiva, as várias metodologias teóricas para o estudo da difusão dérmica e sistematiza as suas características, realizando depois a fase prévia duma nova abordagem computacional para o estudo da difusão dérmica, que determina características microscópicas de moléculas capazes de provocar a perda de peso, tais como a Leptina e/ou os seus agonistas.

Palavras-chave: Obesidade, difusão dérmica, modelos matemáticos da difusão, Lei de Fick, métodos computacionais.

Abstract

Nutrients are essential to life. However, malnutrition leads to accumulation of fat that can come to obesity, and consequently to countless health complications.

Different neuroanatomical structures in the brain play an essential role in digestive behaviour. The action of several signalling molecules (hormones, neurotransmitters and neuropeptides) results in the regulation of food intake, for example, some hormones can increase the feeling of satiety and may decrease appetite and caloric intake. The discovery of hormones involved in energy balance has provided new opportunities to develop means for obesity treatment.

The transfer of anti-obesity medication by topical or transdermal is a challenge because the skin acts as a natural barrier and protective. As a barrier with a large surface area and easy accessibility, the skin has potential interest in specific drug release therapy. Various methods have been studied in order to allow increased permeability of therapeutic molecules into the skin and through the skin.

Transdermal biotechnologies are a field of growing interest due to dermal and pharmaceutical applications underlying them. There are several mathematical and computational models in use that allows a more comprehensive view of pure experimental data and even allows the practical extrapolation of new methods of dermal dissemination. However, they comprise a complex variety of theories and assumptions that attach to their use for specific situations. This work, firstly analyses, broadly, various theoretical methodologies for the study of dermal diffusion and systematize their characteristics then executing after the first phase of a new computational approach to the study of dermal diffusion determining microscopic characteristics of molecules capable of causing weight loss, such as leptin and/or their agonists.

Keywords: obesity, Transdermal diffusion, Mathematical diffusion models, Fick's Law, Computational Methods.

Plano geral

A descoberta de hormonas envolvidas na regulação alimentar nomeadamente a leptina, proporcionou um grande avanço para o estudo da regulação do apetite e abriu caminho para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas da obesidade. O presente estudo tem por objetivo principal o desenvolvimento de um adesivo antiobesidade através da utilização terapêutica de moléculas anorexigénicas. Após definição do problema, logo nos deparamos com a barreira “pele”. Como é que ocorre a difusão de moléculas na camada córnea? Assim, e de forma a compreender a dinâmica de difusão de fármacos através da camada córnea da pele foi realizada uma *revisão sistemática* da literatura acerca dos modelos teóricos e leis de difusão através deste estrato. Posteriormente, foi elaborado um estudo teórico mediante estratégias da bioquímica computacional da forma a descrever a adsorção das moléculas anorexigénicas no ouro de maneira a compreender quais as possibilidades terapêuticas da utilização de nantransportadores de ouro atuarem na entrega de fármacos direcionados para os recetores da leptina.

O capítulo introdutório resulta da elaboração de um enquadramento teórico do tema, nomeadamente a problemática da obesidade à escala mundial e os fenómenos da difusão dérmica e transdérmica. Faz-se ainda referência à importância da química computacional no desenvolvimento de estratégias terapêuticas, isto é, dinâmica molecular e metodologias quânticas.

O Capítulo IV, descreve os resultados da revisão sistemática acerca dos modelos matemáticos que explicam a difusão dérmica. Da revisão da literatura surgiu uma extensa análise dos métodos matemáticos e teóricos da difusão dérmica permitindo uma visão profunda e fundamental do tema para contextualizar as vantagens do estudo. Dessa revisão resultou um artigo científico apresentado à revista *Journal of Controlled Release*, onde se encontra em fase de resposta aos *pares*.

Adicionalmente, para estudar a adsorção das moléculas anorexigénicas no ouro, iniciou-se a análise das moléculas através de programas de química computacional. Utilizou-se o *Gabedit* para modelar/editar os compostos e extrair a matriz Z. A análise computacional utilizou-se oito agonistas do recetor da leptina. Cada um foi modulado através do Software *Gabedit* e extraído as suas matrizes Z, assim como o ficheiro *input* do

software Gaussian. Presentemente, encontram-se em fase de cálculo antevendo um bom ritmo de conclusão.

Os estudos experimentais das moléculas fornecem uma valiosa informação sobre as suas características, pelo que os métodos de química são eficazes na caracterização preliminar das moléculas. O *Gabedit* permitiu a determinação de várias características dos compostos e provou ser útil na criação dos compostos e da matriz *Z*, bem como na fase preliminar, através da criação dos ficheiros *dat. file* do *Gaussian*. Assim espera-se que o presente trabalho permita apurar as possibilidades de nanotransportadores de ouro atuarem na entrega de fármacos.

Índice

Introdução	1
Capítulo I: Revisão geral	5
1. Obesidade: uma problemática à escala mundial	6
1.1. Etiologia	7
1.2. Complicações	8
1.3. Epidemiologia.....	8
2. Da neuro-endocrinologia da regulação do apetite à terapêutica	9
2.1. Adesivos	15
3. O Fenómeno da difusão dérmica e transdérmica	17
3.1. Difusão de compostos ativos	17
3.2. Remoção de compostos ativos/substâncias	19
4. A química computacional no desenvolvimento de estratégias terapêuticas	20
4.1. Dinâmica Molecular	21
4.2. Metodologias Quânticas	22
4.2.1. Métodos <i>ab initio</i>	23
4.2.2. Métodos Semi-Empíricos.....	23
4.2.3. Método DFT.....	24
4.2.4. <i>Software</i>	27
4.2.4.1. <i>Gabedit</i>	27
4.2.4.2. VASP	28
Capítulo II: Objetivos	29
Capítulo III: Materiais e Métodos.....	32
1.1. Compostos	32
1.2. Métodos	33
Capítulo IV: Resultados.....	35

1. Difusão Dérmica e Modelos Matemáticos.....	36
1.1. Primeira Lei de Fick	42
1.2. Segunda Lei de Fick	45
1.3. Hipótese híbrida: primeira e segunda lei de Fick	50
1.4. Transformada de Laplace	53
1.5. Teoria de partícula em escala	56
1.6. Modelo da membrana homogénea.....	57
2. Estudos computacionais sobre a adsorção e interação das moléculas da Leptina em superfícies de ouro	58
2.1. Acetato.....	59
2.2. Arginina.....	59
2.3. L-serina e D-serina	61
2.4. Etilenoglicol	62
2.5. Glutamato	63
2.6. Histidina	64
2.7. Prolina	65
Capítulo V: Discussão	69
Capítulo VI: Conclusão	71
Referências Bibliográficas	73
Anexos	81

Índice de abreviaturas

AgRP	<i>Agouti related peptide</i>
ARH	Núcleo arqueado do hipotálamo
BNDF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
CART	<i>Cocaine and amphetamine regulated transcript</i>
CCK	Colescistoquinina
CPPs	<i>Cell penetrating peptides</i>
DFT	Teoria Funcional de Densidade
DM	Dinâmica Molecular
DMH	Núcleo dorsomedial
DNA	Ácido desoxirribonucleico
GABA	Ácido γ -amino butírico
GHSR	Recetor segregador da hormona de crescimento
GLP-1	<i>Glucagon-like peptide 1</i>
HF	<i>Hartree-Fock</i>
IOTF	<i>International Obesity Task Force</i>
IMC	Índice de Massa corporal
LHA	Área hipotalâmica
LDA	Aproximação de densidade Local
LOD	Limites de deteção
MAP	Modelo Péptido Anfipático
MCH	Hormona concentradora da Melanina
MCRs	Recetores da Melanocortina
MC1R	Recetor 1 da melanocortina
MC2R	Recetor 2 da melanocortina

MC3R	Recetor 3 da melanocortina
MC4R	Recetor 4 da melanocortina
MC5R	Recetor 5 da melanocortina
MTPs	Péptidos de transdução da membrana
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
NMDA	N-metil-D-aspartato
NPY	Neuropéptido Y
NPY1R	Recetor do neuropéptidos Y1
NPY5R	Recetor do neuropéptidos Y5
NTS	Núcleo do trato solitário
OA	Ácido Oleico
OXM	Oxintomodulina
pAntp	<i>Penetratin</i>
PC	Perímetro de cintura
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PDGF	Fator de crescimento de plaquetas
POMC	Pro-opiomelanocortina
PP	Polipéptido pancreático
pSTAT-3	<i>Phosphorylated signal transducer e activator of transcription 3</i>
PTDs	Domínios de transdução de proteínas
PVH	Núcleo paraventricular
PYY	Péptido tirosina tirosina
RNA	Ácido Ribonucleico
SC	Estrato Córneo
SNC	Sistema nervoso central
SOCS-3	<i>Suppressor of cytokine signalling 3</i>

TAT	<i>Trans-acting activator of transcription</i>
TEWL	Perda de água transepidermal
TGF-β	Fator transformador de crescimento – β
VASP	<i>Vienna Ab-initio Simulation Package</i>
VTA	Área tegmental ventral
WHO	<i>World Health Organization</i>
%MG	Porcentagem de Massa gorda
αMSH	Hormona estimuladora do α -melanócito

Índice de tabelas

Tabela 1 – Classificação do Índice de Massa Corporal.....	6
Tabela 2 - Exemplos de diferentes Cell-penetrating peptides (CPPs) e das suas sequências.....	16
Tabela 3 – Diferentes ligandos do anticorpo monoclonal antagonista do recetor da leptina em estudo.....	33
Tabela 4 – <i>Hardware</i> e <i>Software</i> usado no estudo.....	34
Tabela 5 – Modelos Matemáticos de Difusão Dérmica.....	36
Tabela 6 – Composição das membranas modelo do estrato córneo.....	47

Índice de figuras

Figura 1 – Esquemática do estrato córneo.	4
Figura 2 – Representação esquemática do sistema leptina-melanocortina.....	11
Figura 3 - Representação esquemática das vias de permeação de um agente.	18
Figura 4 – Mecanismo da difusão passiva.....	42
Figura 5 – Processo de entrega entre duas regiões: estrato córneo e epiderme viável: $C1$, concentração do fármaco no estrato córneo; $C2$, Concentração do fármaco na epiderme viável; a , espessura do estrato córneo; b , espessura da epiderme viável.....	46
Figura 6 – Distribuição de Maxwell-Boltzmann: LE , Moléculas baixa energia; HE , moléculas de alta energia; $KA(B)$, Solubilidade do nó A (B); α , limite superior de integração para NA ; $V1$, Limite superior de integração para LE	51
Figura 7 – Representação do sistema reservatório e monolítico.	53
Figura 8 - Diagrama esquemático do modelo de estrutura ordenada: hSC^* , Comprimento caminho de difusão efetivo para estrutura ordenada; d, dS e dL , Comprimento; t , espessura; g e s , espaço entre corneócitos.....	58
Figura 9 - Estrutura 3D não otimizada do acetato, desenhada pelo <i>Software Gabedit</i>	59
Figura 10 - Matriz Z do acetato produzido pelo <i>Gabedit</i>	59
Figura 11 - Estrutura 3D não otimizada da arginina, desenhada pelo <i>Software Gabedit</i>	60
Figura 12 – Matriz Z da arginina produzido pelo <i>Gabedit</i>	60
Figura 13 - Estrutura 3D não otimizada da L-serina, desenhada pelo <i>Software Gabedit</i>	61
Figura 14 – Matriz Z da L-serina produzida pelo <i>Gabedit</i>	61
Figura 15 - Estrutura 3D não otimizada da D-serina, desenhada pelo <i>Software Gabedit</i>	62
Figura 16 - Matriz Z da D-serina produzida pelo <i>Gabedit</i>	62

Figura 17 - Estrutura 3D não otimizada do etilenoglicol, desenhada pelo <i>Software Gabedit</i>	63
Figura 18 - Matriz Z do etilenoglicol produzida pelo <i>Gabedit</i>	63
Figura 19 - Estrutura 3D não otimizada do glutamato, desenhada pelo <i>Software Gabedit</i>	64
Figura 20 - Matriz Z do glutamato produzida pelo <i>Gabedit</i>	64
Figura 21 - Estrutura 3D não otimizada da histidina, desenhada pelo <i>Software Gabedit</i>	65
Figura 22 - Matriz Z da histidina produzida pelo <i>Gabedit</i>	65
Figura 23 - Estrutura 3D não otimizada da prolina, desenhada pelo <i>Software Gabedit</i>	66
Figura 24 – Matriz Z da prolina produzida pelo <i>Gabedit</i>	66
Figura 25 – Instruções do <i>dat. file</i> para o acetato.....	67

Introdução

A obesidade é um distúrbio da composição corporal definido pelo excesso de gordura corporal, resultante de um estado de desequilíbrio entre as calorias ingeridas e as calorias gastas, que pode ter um efeito adverso sobre a saúde e levar a um aumento dos problemas de saúde[1].

A prevalência da obesidade tem aumentado dramaticamente nas últimas décadas tanto nos países industrializados[2] como nos países em desenvolvimento[3, 4] tornando-se um dos mais sérios problemas de saúde pública, superando mesmo outras questões clássicas como a desnutrição e as doenças infecciosas devido à sua prevalência, custos e efeitos na saúde[5].

O aumento da obesidade é multifatorial[2, 6] envolvendo uma interação complexa entre fatores genéticos, metabólicos, hormonais, ambientais, comportamentais e culturais[2, 7-9]. O excesso de peso e a obesidade são a quinta principal causa de morte a nível mundial. Estima-se que pelo menos 2,8 milhões de adultos morrem a cada ano com excesso de peso ou obesidade. Além disso, 44% de diabetes, 23% de doença isquémica do coração e entre 7% a 41% de certos cânceros são atribuídos ao excesso de peso e à obesidade[10].

Vários fatores atuam e interagem na regulação da ingestão de alimentos e de armazenamento de energia, contribuindo para o aparecimento e manutenção da obesidade, sendo estes fatores endócrinos e adipocitários, fatores neuronais e intestinais.

O núcleo arqueado do hipotálamo desempenha um papel importante na regulação do apetite através da receção de sinais a partir da periferia e através do tronco cerebral. Estão bem caracterizadas duas populações neuronais, uma de inibição do apetite (pro-opiomelanocortina – POMC e *a cocaine and amphetamine regulated transcript* – CART) e outra de estimulação do apetite (neuropéptido Y – NPY e o *agouti related peptide* – AgRP)[11, 12].

O sistema da melanocortina está envolvido nas funções fisiológicas complexas subjacentes à homeostasia energética. O sistema altera a alimentação em resposta à fome aguda (grelina) e aos sinais de saciedade (CCK), bem como os sinais relativos à composição da dieta, mas também fornece a entrada da leptina. Para além disso, o sistema da melanocortina, não só regula a ingestão de alimentos, como desempenha um papel

importante na regulação do gasto de energia, através dos efeitos de uma saída autónoma para uma variedade de tecidos, bem como os efeitos nos eixos endócrinos.

Uma análise detalhada da neuroanatomia do sistema da melanocortina demonstra que este sistema fornece um excelente substrato para a integração de uma variedade de sinais envolvidos no controlo do balanço energético. Os dados sobre o papel fisiológico do sistema da melanocortina sugerem um possível número de aplicações terapêuticas para distúrbios na regulação do peso, incluindo obesidade[13].

A obesidade é uma doença crónica multifatorial na qual a gordura corporal aumenta até estar associada a problemas de saúde ou ao aumento da taxa de mortalidade. A obesidade tem tratamento e este passa por uma dieta adequada e aumento do exercício físico, contudo nem sempre os objetivos são alcançados e são necessários outros procedimentos, como a cirurgia bariátrica e a terapia farmacológica. Normalmente, os fármacos usados incluem a *Sibutramina*, *Orlistat*, *Fentermina*, *Dietilpropiona*, *Fluoxetina* e *Bupropiona*, ou ainda *Anfetaminas* e *Metanfetaminas* para situações mais severas[14].

Os fármacos desenvolvidos concretizam o principal objetivo, redução da gordura corporal, contudo apresentam efeitos secundários, forçando a pesquisa de alternativas. Alternativas que podem passar pela difusão dérmica de fármacos, por meio de adesivos, capaz de provocar a perda de peso.

A pele sendo uma barreira com uma grande área de superfície e de fácil acessibilidade, possui um potencial interesse na libertação de fármacos. Os adesivos são um dos potenciais sistemas capazes de realizar o pretendido com determinadas vantagens, por exemplo, a ausência de dor e desconforto para os pacientes. Um exemplo do uso de adesivos é o tratamento da dependência de nicotina provocada pelo consumo de tabaco.

No entanto, devido à complexidade da barreira da pele, nem todas as abordagens são conseguidas pelo que é necessário compreender melhor a difusão dérmica através das novas biotecnologias de modo a contornar o problema e solucioná-lo.

A nanotecnologia representa o caminho e a fronteira da biotecnologia e da engenharia biomédica. A sua importância é atualmente indiscutível[15, 16] mas os desafios ainda são os que definem a sua própria designação: materiais de pequeno tamanho e/ou dispositivos com propriedades moleculares estáveis. Além disso, ela pode representar a solução das desvantagens dos atuais microdispositivos biomédicos que aumentam o

transporte de fármacos através da pele usando uma força adicional para o seu transporte ou fisicamente pela perturbação da barreira, como as microagulhas[16, 17].

Na verdade, as microagulhas, um dispositivo que pode proporcionar uma entrega transdérmica mais eficaz, são um exemplo de uma larga área de pesquisa: Difusão dérmica. A perfuração das microagulhas aumenta a permeabilidade da pele de uma variedade de compostos desde marcadores de baixo peso molecular, DNA e ainda nanopartículas[18, 19]. Além disso, as microagulhas podem ser integradas num sistema “*lab-on-a-chip*”, onde são combinados com microssensores e/ou microbombas. O principal objetivo desses dispositivos é criar canais transdérmicos minimamente invasivos para constantemente extrair e analisar fluido biológico e agir diretamente nos resultados analíticos através da entrega de fármacos. A aplicação deste sistema é visto, por exemplo, em pacientes com diabetes, para a detecção de glicose, a entrega de insulina e a regulação de glicose no sangue por meio de um microssensor, uma microbomba, e um microchip respetivamente, mesmo admitindo a existência de um sistema de administração integrado[16]. Tendo isto em vista, o desenvolvimento de dispositivos em microescala, dispositivos com pelo menos um parâmetro na escala micrométrica, tem visto um grande progresso nos últimos anos.

Os poros de tamanho micro destes dispositivos podem entregar várias moléculas terapêuticas ao longo de um amplo intervalo de peso molecular em pequenos períodos de duração, e os furos microscópicos são pequenos o suficiente para limitar os efeitos indesejáveis[18]. No entanto, o trauma sofrido pelos pacientes é ainda um problema e uma nanoagulha poderia prevenir tais problemas, uma vez que existem estudos que relacionam positivamente o estreito tamanho da agulha e a minimização do trauma [20].

Entender esta difusão específica significa perceber a base que sustenta a evolução dos métodos da entrega do fármaco. No entanto, isso é difícil, se não impossível em alguns casos, para determinar experimentalmente as nano idiosincrasias a nível molecular que explica a sustentabilidade do material e/ou o dispositivo a nível macroscópico.

Além disso, a apreensão a nível molecular da natureza do material e a reatividade química permitiria a extrapolação para outros cenários e até novos materiais. A importância dos modelos teóricos é cada vez mais fundamental não só para as atuais microtecnologias mas também para as futuras conquistas na nanopesquisa.

No entanto, a elaboração de tais modelos enfrenta a complexidade da barreira dérmica. Para estudar tal superfície implica um grande número de fragmentos individuais, cada uma com uma única composição química nano. A camada da pele que representa a primeira barreira na difusão dérmica é o estrato córneo (SC), apenas com 15 a 20 μm de espessura, e é constituída de queratinócitos diferenciados embebidos numa camada lipídica[17]. Não é só o SC complexo na constituição químicas, mas a sua organização, num inerente aspeto da identidade[21], adiciona-se à dificuldade de modelar a barreira. Mas, o SC é apenas a primeira barreira a ser levada em conta para um modelo de difusão dérmica. Por baixo está localizada a epiderme, cuja espessura varia de 130 a 180 μm e finalmente, conforme penetra a pele encontra a derme, preenchida de estruturas complexas como nervos, vasos sanguíneos, nociceptores, folículos capilares e glândulas sudoríparas[22-24]. A barreira da pele é esquematizada na figura 1.

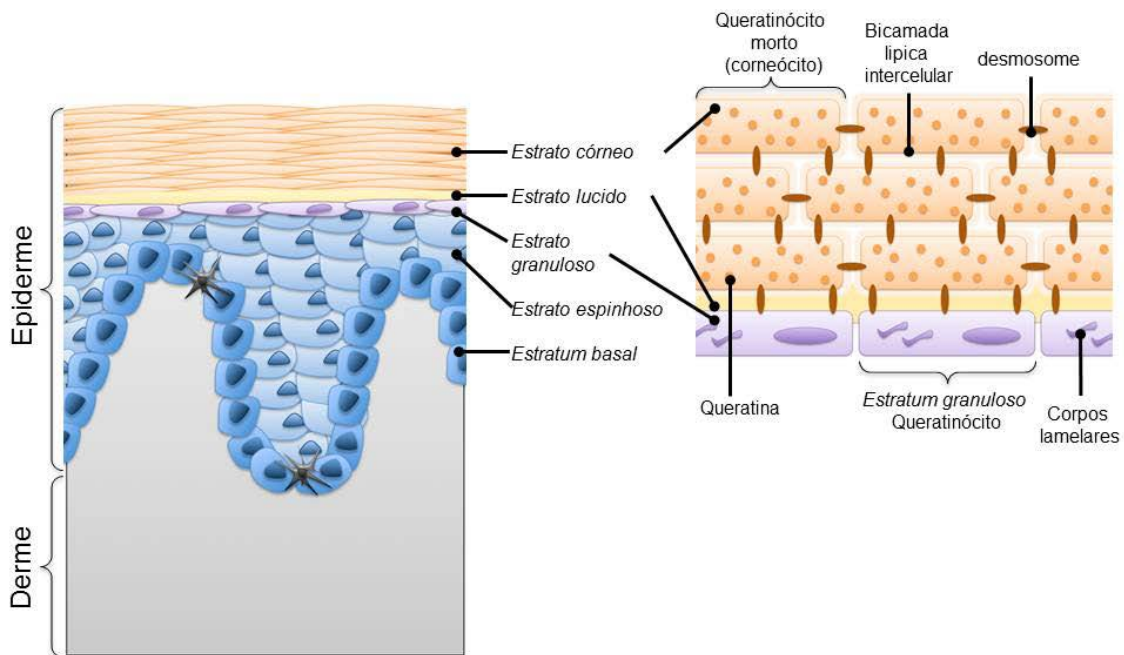


Figura 1 – Esquematização do estrato córneo.

Embora existam vantagens da administração de um fármaco através da penetração dérmica, tal como a prevenção de flutuações da concentração do fármaco entregue no sangue, na qual está associada com a toxicidade; a natureza das diversas multicamadas da barreira dérmica complica a entrega do fármaco (trans) dérmica. Isto explica porque a maioria dos produtos (trans) dérmicos no mercado são fármacos de baixo peso molecular com elevada potência[25-27].

Capítulo I:

Revisão geral

1. Obesidade: uma problemática à escala mundial

A obesidade pode ser definida como uma doença onde há grande acumulação de tecido adiposo (excesso de gordura) causada pelo consumo de energia na alimentação superior àquela usada pelo organismo para sua manutenção e realização das atividades do dia-a-dia na qual compromete a saúde do indivíduo obeso[1]. O desenvolvimento de obesidade pode ser de duas formas distintas: causa orgânica ou causa hereditária, genética ou endócrina. Quando a obesidade se forma na infância é causada devido ao aumento do número de adipócitos e isso favorece a sua continuidade na idade adulta[5].

O método mais utilizado para estimar a quantidade de gordura corporal é o Índice de Massa Corporal (IMC), contudo, existem outras técnicas válidas que também permitem avaliar o estado de adiposidade, nomeadamente o perímetro da cintura (PC) e a percentagem de massa gorda (%MG) obtida por bioimpedância[28]. O IMC é calculado através da divisão do peso em quilogramas pela altura em metros quadrado (kg/m^2). O resultado revela se o peso está dentro da faixa ideal, abaixo ou acima do desejado. A *World Health Organization* (WHO) considera excesso de peso a um IMC entre 25 e 29,9 kg/m^2 e obesidade a um IMC igual ou superior a 30 kg/m^2 [6, 7], as diferentes classificações estão representadas na Tabela 1.

Tabela 1 – Classificação do Índice de Massa Corporal.

	IMC	Risco de desenvolvimento de problemas saúde
Abaixo do peso	<18.5	Aumentado
Peso normal	18.5 a 24.9	Mínimo
Excesso de peso	25.0 a 29.9	Aumentado
Obesidade I	30.0 a 34.9	Alto
Obesidade II	35.0 a 39.9	Muito alto
Obesidade III	≥40.0	Extremamente alto

1.1. Etiologia

A escala vertiginosa da obesidade em diferentes populações, incluindo países industrializados e economias em transição, leva a pensar em quais fatores estariam a demarcar esta epidemia. Considerando que o património genético humano não pode ter sofrido mudanças importantes em poucas décadas, os fatores ambientais devem explicar esta epidemia, contudo, quando se avalia clinicamente um paciente obeso, deve-se considerar que vários fatores genéticos podem estar a desempenhar um papel expressivo no desequilíbrio determinante do excesso de peso.

O mecanismo responsável pela acumulação de tecido adiposo é complexo, e pode ser resultante de uma combinação de fatores genéticos, metabólicos, psicológicos, ambientais e comportamentais, atividade física e até medicação[8]. O excesso de peso, geralmente, é a consequência de um consumo excessivo de nutrientes juntamente com um crescente sedentarismo. Contudo, a dieta, por si só, não explica o significativo aumento da obesidade. Estima-se que 1 a 5% dos casos de obesidade sejam motivados por causas endógenas, ou seja por causas genéticas e/ou endócrinas; e os restantes 95 a 99% motivados por causas exógenas, essencialmente pela ingestão excessiva, sedentarismo e problemas emocionais[5, 7, 9].

É provável que a obesidade surja como resultante de fatores poligenéticos complexos. O chamado mapa genético da obesidade humana está em processo constante de evolução, à medida que se identificam novos genes e regiões cromossómicas associadas à obesidade[29].

Várias mutações monogénicas foram associadas com a obesidade grave e a hiperfagia, com um grande número de novas correlações genótipo-fenótipo sendo identificadas a cada ano. Já descritas foram as mutações envolvendo as vias de sinalização da melanocortina incluindo mutações no gene da leptina e no seu recetor, da POMC e do recetor da melanocortina (MC4R)[11-13].

A influência genética que mais se manifesta é a poligenética, conferindo aos indivíduos uma suscetibilidade resultante de fatores genéticos que podem inter-relacionar-se de forma bastante complexa, o que torna difícil a individualização destes genes. Já foram demonstrados centenas de genes que podem se expressar de forma diferencial em resposta a dietas ricas em gordura[30]. Inúmeros marcadores genéticos já foram

relacionados com a obesidade e as suas consequências metabólicas, mas as interações específicas entre genótipo e fenótipo permanecem mal compreendidas[31].

Com o aumento de hábitos de vida sedentários o prognóstico atual é de agravamento progressivo das altas taxas de prevalência da obesidade. A oferta ilimitada de alimentos baratos, palatáveis, práticos e de alta concentração energética, aliado a um sedentarismo crescente pode levar à obesidade, agravando-se com a influência dos fatores genéticos[3].

1.2. Complicações

Os indivíduos com excesso de peso e obesidade correm um risco elevado de desenvolver diversas patologias como diabetes Mellitus tipo 2 (não insulino-dependentes), doença cardíaca coronária, hipertensão arterial, acidentes vasculares cerebrais, doenças do aparelho urinário, alguns tipos de cânceros (endométrio, ovários, mama, útero, próstata, colón-rectal, bexiga, pâncreas, fígado e rins), dislipidémias (alterações das gorduras do sangue), doenças osteoarticulares e problemas psicossociais[3, 5, 8]. Pelas graves complicações que a obesidade pode causar ao nosso organismo, tornam-se evidente a importância da sua prevenção e do seu tratamento adequado.

1.3. Epidemiologia

A WHO classificou a obesidade como uma epidemia global e conseqüentemente um grave problema de saúde pública[5]. A epidemia atinge não apenas países desenvolvidos mas também os países em desenvolvimento[3, 4]. Nas últimas décadas, em crianças e adolescentes tem-se assistido a um dramático aumento dos custos em cuidados de saúde devido aos problemas de saúde que estão associados à obesidade[28].

Segundo uma análise (2010), a *International Obesity Task Force* (IOTF), estima que cerca de 1,0 bilhões de adultos estão acima do peso (IMC 25-29,9 kg/m²) e mais de 475 milhões são obesos. Globalmente, a IOTF estima que até 200 milhões de crianças em idade escolar estão acima do peso ou são obesos, dos quais, 40-50 milhões são classificados como obesos[32].

Na Europa, os países do sul, são os que apresentam maiores prevalências de excesso de peso, entre 20 a 35%, enquanto nos países situados a norte os valores variam entre 10 a 20% [28, 33]. Aproximadamente 60% de adultos e mais de 20% das crianças em idade escolar estão com excesso de peso ou são obesos. Isso equivale a cerca de 260 milhões de adultos e mais de 12 milhões de crianças que estão acima do peso ou com obesidade [28].

Em Portugal, no período de 2003 a 2005, a taxa de prevalência de excesso de peso nos homens, era de 45,2%, em idades compreendidas entre os 18 e os 64 anos de idade, e cerca de 15% eram obesos. No que diz respeito às mulheres, a taxa de prevalência de excesso de peso, no mesmo período de idades, era de 34,4%, e cerca de 13,4% referia-se a casos de obesidade [34, 35]. Em 2010, um estudo realizado a crianças e adolescentes portugueses, com idades entre os 10 e os 18 anos, revelou que a taxa de prevalência de excesso de peso e obesidade, foram respetivamente de 17 e 4,6% nas raparigas e de 17,7 e 5,8% nos rapazes [36].

2. Da neuro-endocrinologia da regulação do apetite à terapêutica

O excesso de peso e a obesidade representam o fator de risco *major* para o desenvolvimento da obesidade na idade adulta, dado que aproximadamente 30% das crianças obesas o permanecerão em adulto.

O tratamento da obesidade deve ser personalizado, adaptado à idade, ao grau de obesidade, às complicações metabólicas e às repercussões físicas e emocionais [5]. O objetivo do tratamento da obesidade é prevenir ou atenuar a morbilidade associada ao excesso de peso ou obesidade, e não apenas reduzir o peso ou alcançar o peso “ideal” do paciente. A dieta e o exercício físico são as opções terapêuticas de primeira escolha para a obesidade, os tratamentos farmacológicos, sempre aliados à dieta e exercícios, devem ser reservados para os pacientes obesos que não respondam às abordagens comportamentais.

O peso corporal é controlado pelo cérebro e a maioria dos centros relevantes estão localizados no hipotálamo [37]. Estudos de lesões hipotalâmicas identificaram áreas específicas no cérebro como regiões reguladoras centrais da alimentação. Durante as

últimas décadas, dois tipos de neurónios secretores de péptidos no hipotálamo lateral foram descobertos como reguladores do comportamento alimentar: Neurónios da hipocretina/orexina e neurónios produtores de MCH (hormona concentradora da Melanina).

O sistema da melanocortina é um componente crítico do sistema regulatório do cérebro envolvida no balanço energético. Este sistema é composto de neurónios do POMC que atuam através do MC4R[38]. Os neurónios do POMC controlam uma variedade de funções fisiológicas, sendo a mais característica a regulação do balanço energético. Reduzem a ingestão de alimentos e aumentam o gasto energético, através da libertação da α MSH (hormona estimuladora do α -melanócito), um produto do processamento da POMC[13, 38, 39]. Estudos recentes mostraram que os neurónios do POMC têm um papel importante na mediação das ações fisiológicas das hormonas metabólicas, tais como a leptina e a insulina [38, 40].

Os neurónios do POMC têm uma distribuição no sistema nervoso central (SNC), e os corpos celulares do POMC são encontrados em apenas dois núcleos do SNC: o núcleo arqueado do hipotálamo (ARH) prosencéfalo (também designado de cérebro anterior) e o núcleo do trato solitário (NTS) no tronco cerebral[1, 38].

Os neurónios do POMC fornecem amplas projeções em várias partes do cérebro, especialmente para os núcleos paraventricular (PVH) e dorsomedial (DMH) do hipotálamo; a área hipotalâmica lateral (LHA) e a área tegmental ventral (VTA). Estes núcleos e áreas também representam um papel fundamental na regulação do comportamento da alimentação central e do equilíbrio de energia[38].

Os recetores da melanocortina conhecidos (MCRs) estão acoplados à proteína G e compreendem uma família de cinco membros (MC1R-MC5R). Dos cinco recetores diferentes, a α MSH liga com várias afinidades a MC1R, MC3R, MC4R e MC5R, mas é ligada ao quarto recetor (MC4R) que tem implicações na regulação do balanço energético. Esta ideia é apoiada pelos resultados obtidos num estudo em que houve eliminação do MC4R e que se verificou o aparecimento de obesidade e diabetes. Para além de que, mutação no gene do MC4R está associada a obesidade humana severa e consumo de energia em excesso[1, 38, 41].

Após a estimulação pela leptina, os neurónios do POMC libertam melanocortinas e β -endorfinas, com uma posterior ativação dos recetores opióides, MC3R e MC4R. A

O equilíbrio energético é controlado através de um sistema neuro-hormonal, sendo a leptina e a insulina elementos essenciais nesse controlo. Quer a insulina, quer a leptina são expressas e segregadas em concentrações proporcionais à massa de gordura corporal[9, 41].

A insulina é produzida pelas células beta do pâncreas e a sua concentração sérica é proporcional à adiposidade[9]. A insulina é transportada através da barreira hematoencefálica causando a expressão de genes nas áreas cerebrais do controlo da fome. A infusão central de insulina reduz a ingestão calórica em animais[43].

A **leptina** é uma citocina, produzida pelos adipócitos e é libertada para a circulação promovendo a sensação de saciedade e regulando o balanço energético através dos recetores da leptina expressos no cérebro[13, 41].

Existe uma grande evidência que mostra que o sistema central da melanocortina é importante na mediação dos efeitos da leptina. Os recetores da leptina são expressos na maioria dos neurónios do POMC no ARH e os efeitos anoréticos da leptina administrada exogenamente em roedores são parcialmente revertidos pelo tratamento com SHU9119, um antagonista do recetor da melanocortina[13, 44] indicando que o sistema central da melanocortina está envolvido com o recetor da leptina sinalizando e desempenhando um papel fundamental na mediação dos efeitos desta hormona.

Para além disto, após a administração periférica de leptina, a expressão de proteínas envolvidas na cascata de sinalização do recetor da leptina, como pSTAT-3 (*phosphorylated signal transducer activator of transcription 3*) e SOCS-3 (*suppressor of cytokine signalling 3*) estão positivamente regulados nos neurónios do POMC do ARH[13, 45, 46]. E ainda, os níveis de mRNA do AgRP e do POMC são regulados pela leptina e pelo estado alterado do balanço energético, como o jejum. Contudo, os efeitos do sistema da melanocortina central no balanço energético não estão restritos à mediação dos efeitos da leptina[13].

No início dos anos 90 descobriu-se que a **colescistoquinina** (CCK), um péptido intestinal, atuava na promoção da saciedade. Foi demonstrado que a saciedade prandial é atribuída principalmente à ação da CCK, que é libertada pelo trato gastrointestinal, em resposta à presença de gorduras e proteínas no intestino. A CCK, para além de inibir a ingestão alimentar, também induz a secreção pancreática e biliar e a contração vesicular[9]. A CCK é libertada para a porção proximal do duodeno em resposta à presença de produtos de digestão e alcança níveis máximos em 30 minutos[41].

O *glucagon like peptide 1* (GLP-1) e a **oxintomodulina** (OXM) são produzidos por um processo pós-translacional do gene do preproglucagon no SNC, no intestino delgado e no cólon. Os dois são libertados na circulação em resposta ao consumo de nutrientes e parecem exercer funções de sinais de saciedade. Dois estudos a pessoas obesas sugerem que a OXM, ou péptidos relacionados, são uteis no tratamento da obesidade. Numa administração de OXM três vezes por dia, durante quatro semanas a pessoas obesas, verificou-se uma redução do peso de 1.8 kg e ainda aumento do gasto de energia[41].

O GLP-1 e a OXM quando injetados na periferia e no SNC inibem ou reduzem o consumo de alimentos. E o bloqueio do recetor do GLP-1 inibe a ação da OXM, o que sugere uma ação das duas hormonas pelo mesmo recetor. A quantidade necessária para causar os efeitos desejados não é idêntica nas duas hormonas. Para o GLP-1 concentrações fisiológicas são suficientes para haver redução significativa, no caso da OXM, o efeito só se consegue quando se atinge concentrações muito elevadas[47].

A **família dos NPY** contém 3 membros [NPY; Polipéptido pancreático (PP), e o péptido tirosina tirosina (PYY)], na qual são expressos pela ativação de genes independentes mas relacionados. Os péptidos desta família atuam em múltiplos recetores conhecidos como Y_1 , Y_2 , Y_3 , Y_4 , Y_5 e Y_6 .

O **NPY** é expresso em muitas áreas do cérebro e está associado à aprendizagem, memória e a uma variedade de outras funções como a ação orexigénica[41]. Ele estimula o consumo de alimentos, inibe o gasto energético, aumenta o peso corporal e aumenta os níveis de hormona anabólicas ativando os recetores Y_1 e Y_5 no hipotálamo. Com base nisto, vários antagonistas destes recetores são desenvolvidos para agirem como potenciais agentes antiobesidade[43].

O **PYY** é libertado pelas células L que reveste o intestino e maioritariamente circula como PYY₃₋₃₆[41]. O PYY₃₋₃₆ tem alta afinidade pelos recetores Y_1 e Y_4 . PYY está maioritariamente presente no íleo e é expresso pelas células endócrinas do intestino, aumenta pós-prandialmente em proporção com a ingestão de calorias e atua de maneira a inibir a secreção gástrica, pancreática e intestinal assim como a motilidade gastrointestinal[48].

O PYY inibe o apetite através da inibição dos neurónios NPY estimulantes do apetite presentes no núcleo arqueado. Em 2003 foi demonstrado, em humanos o efeito de redução da ingestão de alimentos em indivíduos voluntários obesos e em indivíduos com

peso normal. Nesse trabalho, foram observados níveis reduzidos de PYY₃₋₃₆ em obesos quando comparados aos indivíduos controlo magros. Isto sugere que a redução da produção de PYY₃₋₃₆ pelo TGI possa estar relacionada à presença de obesidade em humanos [47, 49].

O **PP** é encontrado predominantemente no pâncreas onde tem um importante papel na regulação da secreção pancreática. Ele liga-se com grande afinidade ao recetor Y₄[41, 50], e é libertado pelo consumo de alimentos, tendo elevações pós-prandiais proporcionais ao total de calorias ingerido[50]. O PP produz uma redução rápida e prolongada da ingestão alimentar, atuando dentro de 20 minutos e persiste por 24 horas. Para além de que estimula a atividade simpática e o consumo de oxigénio sugerindo um aumento do gasto energético[11]. A administração intravenosa de PP, em humanos, reduz a ingestão alimentar em obesos. Ainda, os níveis de PP no plasma e a sua secreção estão reduzidos em humanos obesos e aumenta em casos de anorexia nervosa. Este facto indica que o PP pode estar envolvido na regulação do balanço energético e na causa da obesidade [50]. No entanto, a administração central de PP aumenta a ingestão alimentar e o esvaziamento gástrico, tendo efeito contrário à administração periférica [11, 47].

A **grelina** é uma hormona sintetizada no estômago, e é considerada uma hormona orexigénica. A administração exógena de grelina estimula a ingestão alimentar, promovendo um balanço energético positivo[41, 51]. A grelina, o ligando endógeno para este recetor, pode estimular a ingestão alimentar atuando a nível do núcleo arqueado. Os principais alvos hipotalâmicos da grelina são os neurónios NPY/AgRP, dois potentes estimuladores da ingestão. A administração de grelina aumenta a expressão do NPY e da AgRP mas não a da POMC. O AgRP antagoniza a ação da α MSH inibindo o MC4R tendo portanto uma ação orexigénica. Por sua vez, anticorpos e antagonistas do NPY e da AgRP suprimem a ação estimuladora da ingestão induzida pela grelina[51]. Existem dados que sugerem que os antagonistas da grelina podem ser eficazes no tratamento da obesidade. O RNA Spiegelmer NOX-B11-2, liga-se seletivamente e com elevada afinidade á grelina circulante e inativa-a. Ele bloqueia a grelina induzida pela alimentação e promove a perda de peso em ratos obesos[41].

2.1. Adesivos

A pele é uma barreira com uma grande área de superfície e de fácil acessibilidade para a transferência de medicação por via tópica ou transdérmica por exemplo, através de adesivos. Um exemplo do uso de adesivos é o tratamento da dependência de tabaco (adesivos transdérmicos de nicotina) na qual têm mostrado eficácia no que diz respeito às taxas de abandono do consumo de tabaco[52]. Este é um exemplo de terapêutica de auxílio e suporte farmacológico do sistema neuro-endócrino e sendo a regulação do apetite um mecanismo endócrino, questiona-se o benéfico do uso deste tipo de abordagem no tratamento da obesidade.

Contudo, funciona como uma barreira natural e protetora, precisando da pesquisa de vários métodos de modo a aumentar a permeabilidade de moléculas terapêuticas para dentro da pele e através da pele.

Terapeuticamente, a eficiente permeabilidade de moléculas ativas, através das membranas biológicas, permanece um importante obstáculo na libertação de fármacos. *Protein transduction domains* (PTDs), *cell penetrating peptides* (CPPs) ou *membrane transduction peptides* (MTPs) compostos de 30 ou menos aminoácidos, são classificados como catiónicos ou anfipáticos e tem a capacidade para atravessar a membrana celular e entrar nas células.

A pesquisa de CPPs concentra-se principalmente nas características estruturais que lhes dão a capacidade de atravessar as barreiras das membranas celulares. A capacidade de CPPs, tais como *trans-acting activator of transcription* (TAT) e pAntp (*penetratin*) para deslocar é atribuída à sua sequência de aminoácidos que é principalmente constituído por aminoácidos básicos. Em geral, os péptidos de translocação podem ser básicos, anfipáticos, hidrofóbicos ou químera na natureza, alguns dos CPPs estão resumidos na tabela 2.

Tabela 2 - Exemplos de diferentes Cell-penetrating peptides (CPPs) e das suas sequências.

Cell penetrating peptides (CCPs)	Sequência
TAT (45-57)	YGRKKRRQRRR
Penetratin (43-58)	RQIKIYFQNRMMKWKK
VP22 (267-301)	DAATATRGSAASRPTERPRAPARSASRPRRPVE
Membrane translocating sequence peptide (MTS)	AAVALLPAVLLALLAP
Transportan (galanin/mastoparan)	GWTLNSAGYLLKINLKALAALAKKIL
Polyarginine	Rn(n=7-11)
Model amphipathic peptide (MAP)	KLALKLALKALKKAALKLA
Flock house virus (FHV) coat (35-49)	RRRRNRTRRNRRRV
Pep-1 (hydrophobic/NLS)	KETWWETWWTEWSQPKKKRKV

Devido à forte organização estrutural das camadas da pele, é difícil libertar macromoléculas na pele. Nos últimos anos, os CPPs têm sido utilizados para melhorar a libertação tópica de proteínas e péptidos. Um mecanismo para aumentar a permeabilidade da membrana é a interação de CPPs com lípidos, uma vez que esta interação pode destabilizar o estrato córneo (camada mais superficial da pele), aumentar a permeabilidade da membrana e assim facilitar a entrada de fármacos para dentro da pele[53].

Assim os CPPs tornaram-se uma das técnicas mais populares e eficazes para alcançar o meio intracelular. Eles podem ser derivados de fontes naturais ou serem concebidos sinteticamente. A primeira descoberta foi o TAT, uma sequência capaz de atravessar membranas celulares e com a evolução dos estudos, o número de CPPs aumentou e continua a aumentar com as novas descobertas. Embora a escolha do CPP geralmente depende da aplicação em questão, alguns dos péptidos mais utilizados incluem o TAT, poliarginina e *transportan*. Estes transferem com sucesso proteínas, ácidos nucleicos, entre outros[54].

3. O Fenómeno da difusão dérmica e transdérmica

A aplicação transdérmica é uma via de administração em que os compostos ativos são entregues através da pele para a distribuição sistémica. Embora a pele seja um grande e lógico alvo para a entrega do fármaco, as suas funções básicas, como a barreira protetora contra os agentes externos, limita a sua utilidade. Portanto, a compreensão das funções da barreira e a sua flexibilidade fornecem a base das aplicações como será descrito abaixo.

3.1. Difusão de compostos ativos

A entrega de fármacos através da pele tem múltiplos benefícios sobre a via oral e as injeções convencionais, ainda que a densa estrutura do estrato córneo e o limitado número de folículos capilares e glândulas sebáceas complicam a entrega de doses terapêuticas[16].

Uma das funções da pele, de entre muitas outras, é evitar a invasão de organismos, atuando como uma barreira defensiva às ameaças do meio externo, contudo ela pode ser utilizada como um meio de entrada de substâncias terapêuticas, como fármacos e vacinas.

A pele é composta por duas camadas principais, a epiderme e a derme[55, 56]. A derme subjacente com cerca de 2000 μm [16, 22-24] de espessura, contém uma variedade de células, nervos, vasos sanguíneos e vasos linfáticos envoltos numa densa rede de tecido conjuntivo. Acima, separada por uma membrana basal, encontra-se a epiderme com uma espessura de 130-180 μm [16, 22-24], composta por camadas estratificadas de queratinócitos, onde as células do estrato córneo são banhadas por uma camada de proteínas e por uma camada lipídica externa, rodeado pela matriz lipídica extracelular. Os queratinócitos sofrem um processo de queratinização, na qual as células se diferenciam e ascendem desde a camada basal à camada mais externa, o estrato córneo, aqui tornam-se anucleadas e achatadas. As células responsáveis pela produção de melanina (melanócitos), percepção sensorial (células de Merkel) e com função imunológica (células de Langerhans) estão intercaladas entre os queratinócitos e a epiderme viável. Para além disso, ainda existem os folículos capilares, as glândulas sebáceas e as glândulas sudoríparas.

O estrato córneo tem uma espessura de 15-20 μm [16, 22-24] e representa a principal barreira física da pele, sendo que a difusão de substâncias através do estrato córneo é o passo limitante[16, 57-59], para além da irregular e descontínua camada de sebo secretado

pelas glândulas sebáceas que se torna numa barreira adicional[59, 60]. Deste modo o transporte de substâncias através do estrato córneo ocorre através da difusão passiva e por três vias possíveis, via transcelular, intercelular e através de apêndices, esquematizada na figura que se segue (Figura 3).

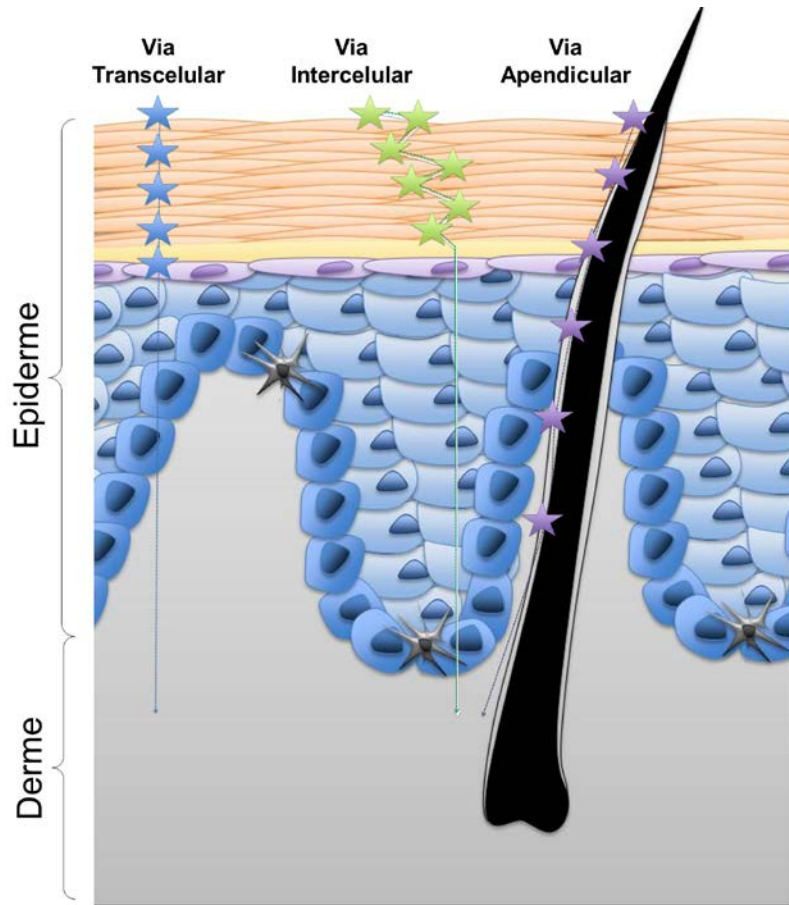


Figura 3 - Representação esquemática das vias de permeação de um agente.

Os compostos ativos, na via intercelular, entram para dentro da pele através da matriz lipídica ocupando os espaços intercelulares dos queratinócitos, ao passo que na via transcelular é através dos queratinócitos; e por meio de apêndices é através e ao longo dos eixos dos folículos capilares, através das glândulas sebáceas e das glândulas sudoríparas que estão dispersos por toda a pele. Os nanotransportadores podem entrar na pele e permanecer intactos ou podem ser degradados perto da superfície da pele libertando substâncias ativas para penetrar nas camadas da pele[56, 61].

Para a maioria dos agentes penetrantes, a via intercelular é a favorita. Pequenas moléculas são capazes de mover-se livremente entre os espaços intercelulares e as taxas de

difusão determinados pela sua lipofilia, mas também pelas propriedades físico-químicas, como o peso ou o volume molecular[59, 62]. Contudo, a livre circulação de macromoléculas ou partículas podem ser fisicamente restritas dentro dos canais lipídicos.

A entrega de fármacos ou de partículas através da via de apêndices é considerado uma alternativa realista para a entrega através do estrato córneo, apesar da escassez relativa destas na superfície da pele[59, 63]. À medida que os folículos estendem-se profundamente na pele, a espessura da camada do estrato córneo é progressivamente reduzida pelo que existe um rico capilar sanguíneo disponível para o transporte de solutos.

3.2. Remoção de compostos ativos/substâncias

A entrega do fármaco envolve um número de circunstâncias incluindo a possibilidade de extração de compostos ativos; um exemplo é a extração de glucose e de lactato[64]. A iontoforese transdérmica reversa permite a simultânea extração de glucose e lactato do indivíduo humano.

A monitorização transdérmica usando a iontoforese é possível pela permeabilidade da pele a pequenas moléculas e pela natureza microporosa e nanoporosa da estrutura da pele. A iontoforese reversa indica a passagem de um nível de corrente baixo através da pele, normalmente por meio de um par de elétrodos contendo um gel condutor, para promover a extração de ambas as moléculas carregadas e neutras[65].

Estudos de difusão *in vitro* foram realizados por Ching e os seus colaboradores usando uma membrana nanoporosa como a barreira da pele na célula da iontoforese com e sem a aplicação de corrente iontoforética. Isto demonstrou que a passagem de corrente facilita o movimento de lactato e glucose através da membrana nanoporosa quando comparada com a difusão comum; e durante os estudos, o lactato e a glucose foram extraídos com sucesso usando a iontoforese reversa[64, 66].

4. A química computacional no desenvolvimento de estratégias terapêuticas

A Química Computacional é um ramo natural da Química Teórica e pretende representar as estruturas moleculares simulando o seu comportamento com equações da Mecânica Clássica e da Mecânica Quântica.

Os programas da química computacional permitem aos cientistas gerar e apresentar dados moleculares incluindo geometrias (comprimentos de ligação, ângulos de ligação, ângulos de torção), energias (calor de formação, energia de ativação), propriedades eletrônicas (potencial de ionização, afinidade eletrônica, cargas), propriedades espectroscópicas (vibrações) e propriedades de massa e secção (volumes, áreas de superfície). Contudo, é necessário que investigadores e instituições sejam preparados para interpretar os resultados, sendo ainda importante a comparação com dados experimentais de modo a orientar tanto o laboratório como o trabalho computacional[67]. Teoricamente, torna-se possível reproduzir o comportamento dinâmico de reações e descrever os processos através de um modelo computacional.

A química computacional é um método bem desenvolvido que pode ser automatizado. Atualmente, para determinar as propriedades moleculares existem três abordagens: métodos quânticos *ab initio*, métodos semi-empíricos e métodos baseados na Teoria Funcional de Densidade (DFT)[68, 69]. Os métodos DFT surgiram aquando da necessidade de se tratar da correlação eletrónica de uma forma mais rápida, para sistemas moleculares de grandes dimensões.

Conjuntamente com estes métodos, têm vindo a impor-se como instrumentos poderosos para o estudo científico, outra classe de métodos. Eles podem dividir-se em dois grandes grupos: metodologias que utilizam o método de Monte Carlo, um método estocástico, e as metodologias que utilizam o método da Dinâmica Molecular, um método determinístico. Existem ainda métodos híbridos que aplicam simultaneamente as duas técnicas de simulação, além de outros que envolvem tanto técnicas de simulação como métodos quânticos.

Vários estudos foram já realizados com o intuito de tentar avaliar a difusão dérmica de pequenas moléculas através da simulação computacional. Foi investigado, através da simulação computacional, os processos de translocação física de nanopartículas com

diferentes formas e volumes através da bicamada lipídica[70], o efeito das altas concentrações das moléculas nas propriedades membranares[71], entre outros. No entanto, a proposta de estudo computacional para análise de difusão dérmica de agonistas da leptina é diferente destas estruturas, pois trata-se de cálculos realizados em modelos periódicos[58, 70-72]. O presente estudo pretende averiguar as possibilidades de utilizar adesivos com nanotransportadores metálicos que possibilitem a libertação inteligente de agonistas dos recetores da leptina.

4.1. Dinâmica Molecular

Os mecanismos da penetração de um fármaco através do estrato córneo são essenciais para compreender as propriedades físico-químicas relacionadas com a difusão desses fármacos. A técnica de simulação usada para estudar o sistema molecular realista é conhecida como Dinâmica Molecular[58].

A Dinâmica Molecular é baseada na descrição do movimento molecular por mecanismos clássicos. Permite calcular as propriedades termodinâmicas do sistema molecular com a estimativa do tempo. Desta forma, é um processo adequado para estudar as propriedades dependentes do tempo como a difusão[72, 73].

A Dinâmica Molecular é baseada nas equações de movimento de Newton:

$$(1) \quad F = ma$$

Onde F é a força aplicada no objeto, m é a massa do objeto e a é a aceleração. Para um átomo a equação pode reescrita da seguinte forma:

$$(2) \quad f_i = m_i \frac{d^2 r_i}{dt^2}$$

Onde f_i é a força aplicada ao átomo, m_i é a massa atômica e r_i é o vetor posição. O cálculo das forças de um dado sistema permite prever as posições e as velocidades de todos os átomos do intervalo de tempo seguinte baseando-se na equação (41).

Nas simulações da Dinâmica Molecular, a interação de energias são calculadas pela mecânica molecular. A Mecânica Molecular é um método para calcular termos de energia empíricos categorizados, tais como a energia de Van der Waals e a energia de interação

eletrostática. Estes termos de energia são baseados em parâmetros obtidos de estruturas conhecidas, são capazes de prever energias de estruturas desconhecidas.

A mecânica molecular torna possível simular o movimento realista de um sistema molecular a partir da mecânica clássica, mas o seu algoritmo é muito complicado. Contudo, de uma maneira mais simples, a dinâmica molecular controla as energias, forças, velocidades de um sistema molecular baseando-se na equação de movimento de Newton a uma temperatura específica em relação ao tempo. Apesar de a teoria ser baseada na descrição do movimento da mecânica clássica em vez da mecânica quântica, a dinâmica molecular pode fornecer informação detalhada sobre as propriedades termodinâmicas de largos sistemas moleculares em que outros métodos de simulações têm dificuldades em fazê-lo.

O comportamento de difusão pode ser descrito a partir dos ficheiros da trajetória. O deslocamento dos agentes penetrantes pode ser representado como uma função de tempo e o coeficiente de difusão pode ser calculado a partir da trajetória de átomos. Pelo que o coeficiente de difusão é definido como:

$$(3) \quad D = \frac{1}{6N} \lim_{t \rightarrow \infty} \frac{d}{dt} \langle \sum_i^N [r_i(t) - r_i(0)]^2 \rangle$$

Onde r_i é a posição do vetor do agente penetrante i , N é o número total de agentes penetrantes e os parêntesis angular representa o deslocamento quadrático médio[73] definido da seguinte forma:

$$(4) \quad \langle \sum_i^N [r_i(t) - r_i(0)]^2 \rangle = \lim_{\tau \rightarrow \infty} \frac{1}{\tau} \int_0^\tau (\sum_i^N [r_i(t + t_0) - r_i(t_0)]^2) dt_0$$

Onde τ é a diferença entre o tempo de simulação total e o t [73]. O deslocamento quadrático médio representa uma distância quadrática média acumulada ao longo de diferentes origens de tempo. D é proporcional ao declive do deslocamento quadrático médio. As equações (42) e (43) indicam que os coeficientes de difusão tornam-se mais precisos com simulações de dinâmica molecular longas[72].

4.2. Metodologias Quânticas

Antes da investigação propriamente dita, é necessário levar em conta o composto e os resultados esperados, de modo a escolher um método mais adequado. De entre os vários

métodos existentes, os mais adequados e usados são os métodos *ab initio*, semi-empíricos e DFT.

4.2.1. Métodos *ab initio*

“*Ab initio*”, expressão que deriva do latim e que significa “desde o início” e expressa computações que são derivadas diretamente de princípios teóricos, não incluindo dados experimentais[68, 74].

Os métodos *ab initio* traduzem o cálculo das interações entre todas as partículas com base nas leis fundamentais da Física Clássica referindo-se, na maioria das vezes a aproximações á mecânica quântica. O tipo de cálculo *ab initio* mais comum é chamado de cálculo Hartree-Fock (HF), onde a repulsão elétron-elétron não é levada em conta, por ser um método de aproximação para a determinação de ondas, no estado fundamental de energia.

Um método alternativo ao *ab initio* é a DFT, na qual a energia total é expressa em termos da densidade total de elétrões, em vez de uma função de ondas.

Uma das vantagens dos métodos *ab initio* é o facto de eles convergirem para uma solução exata, uma vez que todas as aproximações são suficientemente pequenas em magnitude. No entanto, o método é muito caro, necessitando muito tempo de processamento, memória e espaço no disco.

Em suma, estes métodos proporcionam bons resultados qualitativos e são capazes de fornecer resultados quantitativos cada vez mais precisos[74]. A complexidade dos sistemas moleculares de maiores dimensões obrigou à introdução de simplificações nos métodos *ab initio*, surgindo o grupo de métodos semi-empíricos como resultado[68].

4.2.2. Métodos Semi-Empíricos

Os métodos semi-empíricos são versões simplificadas da teoria HF usando correções empíricas (a partir de dados experimentais) de forma a melhorar o desempenho. O método trata explicitamente os elétrões de valência e as suas orbitais, sendo também incluídas simplificações de tal maneira que seja possível obter-se concordância ou com os resultados experimentais ou com os métodos *ab initio*[68].

Os cálculos semi-empíricos são muito mais rápidos que os *ab initio*, contudo os seus resultados podem ser erráticos. Se a molécula a ser calculada for semelhante ás da base de dados, os resultados podem ser muito bons, mas se a molécula é significativamente diferente, os resultados podem ser muito maus.

Os cálculos semi-empíricos têm sucesso na descrição da química orgânica, onde existe pouco elementos usados e as moléculas são de tamanho moderado, apesar destes métodos terem sido concebidos especialmente para a descrição da química inorgânica[74].

4.2.3. Método DFT

A Teoria Funcional de Densidade tem um uso aumentado em aplicações relacionadas com sistemas biológicos.

Estudos DFT podem complementar investigações experimentais, e calcular propriedades tais como a geometria, energia, mecanismos de reação e propriedades espectroscópicas.

DFT tem sido estabelecido como uma ferramenta de pesquisa valiosa, uma vez que pode servir para validar as conclusões chegadas a partir das análises experimentais, ou para distinguir entre possibilidades que foram deixadas em aberto. O cálculo de uma vasta gama de propriedades moleculares com DFT permite uma ligação entre a teoria e a experiencia e muitas vezes leva a pistas importantes sobre a geometria, a eletrónica, e as propriedades espectroscópicas[75].

O princípio da DFT assenta na ideia de que a energia de um sistema eletrónico pode ser descrita em termos de densidade eletrónica ρ . A energia eletrónica E , é um funcional de densidade eletrónica designando-se por $E[\rho]$. Neste funcional uma dada função $\rho[r]$ corresponde a uma única energia. Este método é, em tudo, semelhante á resolução da equação de Schrödinger, donde resulta uma teoria igualmente detalhada na descrição da estrutura eletrónica e propriedades da matéria[68].

Se utilizarmos o exemplo do átomo de hidrogénio, independentemente do tempo que descreve um eletrão no campo elétrico criado pelo núcleo do hidrogénio, a equação de Schrödinger tem a seguinte forma:

$$(5) \quad \left[-\frac{\hbar^2}{2m} \nabla^2 - k \frac{e^2}{|r|} \right] \psi(r) = E\psi(r)$$

A primeira contribuição dentro dos parêntesis retos é o termo cinético, escrito em função de $k = 1/4\pi \epsilon_0$, da constante de Planck, \hbar , da massa do electrão, m , e do operador laplaciano

$$(6) \quad \nabla^2 = \partial^2/\partial x^2 + \partial^2/\partial y^2 + \partial^2/\partial z^2$$

A segunda contribuição descreve a interação eletrostática entre o electrão (de carga $-e$) e o protão do hidrogénio (de carga $+e$). Esta equação de valores próprios a três dimensões determina os níveis de energia, E , que podem ser ocupados pelo electrão, e a função de onda do sistema, ψ . Assim, a densidade electrónica do sistema é o quadrado do módulo da função de onda,

$$(7) \quad \rho(r) = |\psi(r)|^2$$

No caso do hélio, com dois protões e dois electrões, verifica-se uma interação dos electrões com os protões no núcleo mas também um afastamento mútuo através da interação Coulombiana. Deste modo, a equação de Schrödinger escreve-se:

$$(8) \quad \left[-\frac{\hbar^2}{2m} (\nabla_1^2 + \nabla_2^2) - 2k \frac{e^2}{|r_1|} - 2k \frac{e^2}{|r_2|} + k \frac{e^2}{|r_1 - r_2|} \right] \psi(r_1, r_2) = E\psi(r_1, r_2)$$

Esta equação agora depende das coordenadas dos dois electrões, r_1 e r_2 .

Pela apresentação deste caso, é fácil perceber que quanto maior for o número de termos, cada vez mais variáveis tem-se e mais difícil é resolver a equação. Pelo que, num sistema com N electrões, ψ depende de $3N$ variáveis. Assim, Walter Kohn e Pierre Hohenberg propuseram a utilização da densidade electrónica, ou seja, para conhecer qualquer propriedade de um átomo, molécula ou sólido, apenas é necessário saber qual a densidade electrónica.

Como a energia é observável pode-se escreve-la em termos de $\rho(r)$, isto é, $E[\rho]$. Por sua vez, a partir da densidade pode-se calcular qualquer outra propriedade. Para descrever camadas, Walter Kohn com Lu Sham, mostrou através da construção de um sistema de electrões “fictícios”, onde os “electrões” não interagem uns com os outros, mas cuja densidade é igual à densidade do sistema original. Para isso, imerge-se os electrões fictícios num potencial efetivo, o potencial de Kohn-Sham, escolhido de modo a que a condição seja satisfeita. Como é um sistema de electrões independentes, eles obedecem a uma equação de Schrödinger semelhante à do hidrogénio. A diferença é que o potencial eléctrico criado pelo núcleo do hidrogénio, $-ke^2/|r|$, é substituído pelo potencial de Kohn-

Sham, $v_{KS}(r)$, pelo que pode-se provar que este potencial é um funcional de densidade, $v_{KS}[\rho](r)$. Escrevendo-se este funcional como a soma de três partes:

$$(9) \quad v_{KS}[\rho](r) = v_{ext}(r) + v_{Hartree}[\rho](r) + v_{xc}[\rho](r)$$

O primeiro termo representa o potencial externo, criado pelos núcleos atômicos numa molécula ou num sólido, o segundo, o potencial de HF que leva em conta a interação entre o eletrão e a densidade média de carga de todos os eletrões do sistema, e o último, denominado potencial de troca de correlação, inclui todos os termos não triviais da interação.

A melhor aproximação a este último termo e a mais simples é a aproximação da densidade local (LDA, de *Local Density Approximation*). A LDA utiliza um sistema onde os núcleos atômicos são substituídos por uma carga positiva contínua e constante[76].

Os métodos DFT puros são definidos através da combinação de um funcional de permuta com um funcional de correlação. Os métodos DFT híbridos são definidos através da combinação do termo de permuta HF, que traduz a interação de permuta entre eletrões com spins iguais com o funcional de permuta-correlação da Teoria dos Funcionais de Densidade[68]. Os funcionais híbridos mais usados são os funcionais desenvolvidos por Becke, representados da seguinte forma:

$$(10) \quad E_{xc}^{hib} = C_{HF}E_x^{HF} + C_{DFT}E_x^{DFT}$$

Onde C_{HF} e C_{DFT} são constantes. Por exemplo, o funcional híbrido de Becke com três parâmetros (B3LYP), E_{xc}^{B3LYP} , pode ser definido pela expressão:

$$(11) \quad E_{xc}^{LDA} + C_0(E_x^{HF} - E_x^{LDA}) + C_x E_x^{B88} + E_c^{VWN3} + C_c(E_c^{LYP} - E_c^{VWN3})$$

Nesta expressão, $C_0 = 0.20$, $C_x = 0.72$ e $C_c = 0.81$. Esta expressão revela o método híbrido B3LYP inclui uma mistura dos termos de permuta de HF e DFT, associados com o funcional de correlação de gradiente. De todos os funcionais recentes, o B3LYP continua a ser o mais popular até à data uma vez que o seu desempenho global é extremamente elevado [68].

Conhecendo a geometria estável de uma dada molécula pode-se usar o DFT para calcular a sua densidade eletrónica. De igual forma, pode-se analisar as ligações químicas, calcular as energias de ionização, afinidades eletrónicas, estudar os modos normais de vibração, calcular polarizabilidades, espectros de absorção e de emissão, suscetibilidades,

etc. Os programas de computadores mais utilizados para realizar este tipo de cálculos são o GAUSSIAN para moléculas e o VASP para sólidos[76].

A base da química computacional corresponde a um conjunto de funções conciliadas em combinações lineares (geralmente fazendo parte de cálculos de química quântica) para criar orbitais moleculares. Estas funções são orbitais atômicas centradas em átomos pelo que as ondas planas, ondas de frequência constante de planos paralelos infinitos[77], são frequentemente usadas em cálculos de materiais[78].

Uma técnica usada nos cálculos de estrutura *ab initio* é o PAW (*projector augmented wave*) que permite a realização de cálculos DFT com maior eficiência computacional e suavizar as oscilações, que tendem a ser rápidas perto do núcleo dos iões, provocadas pelas funções de onda[79].

4.2.4. Software

Existem alguns *softwares* para serem usados na química computacional. Aqui será utilizado o VASP para o estudo da difusão dérmica, após construção das estruturas no *Gabedit*.

4.2.4.1. Gabedit

O *Gabedit* é uma interface gráfica livre que oferece um pós-processamento e um pré-processamento a novos pacotes de *software* de química computacional, como o *Gamess-US*, *Molcas*, *Gaussian*, *Molpro* e *MPQC*.

No *Software* inclui ferramentas de edição, visualização, análise e conversão, e ainda sistemas moleculares animados. Os ficheiros de *software* de química computacional podem ser gerados através do *Gabedit*. É possível apresentar órbitas moleculares, densidade eletrónica, potencial eletrostático, densidade de ressonância magnética molecular, entre outras propriedades de dados volumétricos, como os espectros UV-Visível, Infravermelhos e *Raman*. O *Gabedit* também permite criar ficheiros *Povray* para geometrias, superfícies, contornos e superfícies coloridas e figuras animadas.

O *Gabedit* inclui um editor molecular avançado na qual pode ser usado para desenhar moléculas e analisa-las em três dimensões[80].

4.2.4.2. VASP

VASP (*Vienna Ab initio Simulation Package*) é um programa para a realização da Dinâmica Molecular (DM) da Mecânica Quântica *ab initio*. A hipótese implementada no VASP é baseada numa aproximação de densidade local a temperatura finita (com energia livre como quantidade variável) e numa avaliação exata do estado eletrónico instantâneo para cada etapa da DM[81].

O VASP calcula uma solução aproximada para a equação de Schrödinger, tanto na DFT, resolvendo as equações de Kohn-Sham, como na aproximação de HF, resolvendo as equações de Roothaan. Uma mistura funcional das hipóteses anteriores é igualmente bem implementada. Para além disso, também estão disponíveis no VASP os métodos funcionais de Green [GW quasiparticles (G é função de Green e W é interação de Coulomb selecionada dinamicamente) e ACFDT-RPA (*adiabatic-connection fluctuation-dissipation theorem method within the random phase approximation*)] e a teoria da perturbação (Møller-Plessetde segunda ordem)[82].

No VASP, as quantidades centrais, orbitais de um eletrão, a densidade da carga eletrónica e o potencial local são expressos num plano à base de ondas[82], pelo que a interação entre os iões e os eletrões é descrito usando pseudopotenciais *Vanderbilt ultrasoft* (US-PP) ou o método projetor de ondas aumentado (PAW)[81, 82]. Ambas as técnicas permitem uma redução do número necessário de plano de ondas por átomo para metais de transição e elementos de primeira linha[81, 83].

Capítulo II:

Objetivos

1. Objetivos

A descoberta de hormonas envolvidas no balanço energético proporcionou novas oportunidades para desenvolver meios para o tratamento da obesidade. A ação das hormonas atrás relatadas podem aumentar a sensação de saciedade, podendo diminuir o apetite e a ingestão calórica, assim o interesse principal seria o desenvolvimento de um adesivo antiobesidade. Este desenvolvimento surge integrado numa ação conjunta de investigadores do CFBQ (Centro de Farmacologia e Biopatologia Química), da Faculdade de Medicina com investigadores do REQUIMTE (Rede de Química e Tecnologia), da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.

Estabeleceram-se assim dois objetivos principais:

1) Para compreender a criação/uso de adesivos como meio de entrega de fármacos seria necessário perceber a dinâmica de difusão de fármacos através da pele, em particular do estrato córneo. Para tal seria necessário dominar a utilização de modelos matemáticos que explicassem o fenómeno de difusão. Deste modo, através de uma revisão sistemática, apresentada no ponto 1 do capítulo IV realizou-se uma extensa análise dos modelos matemáticos no estudo da difusão, da qual foi elaborado um artigo científico atualmente aceite para publicação. Este estudo igualmente permitiu avaliar as vantagens e inovações que o novo projeto de análise computacional do transporte de ligandos do anticorpo monoclonal antagonista do recetor da leptina, teria face ao contexto atual de estudos teóricos e matemáticos sobre difusão transdérmica.

2) Posteriormente, procedeu-se à seleção de um conjunto de moléculas anorexigénicas (neste caso utilizou-se a leptina e os ligandos do anticorpo monoclonal antagonista do recetor da leptina para estudar a adsorção das mesmas no ouro de modo a perceber quais as reais possibilidades de nanotransportadores de ouro atuarem na entrega de fármacos direcionados para a leptina. O uso de leptina implicaria cálculos muito extensos e pesados, donde a opção pelos ligandos. Portanto, numa primeira fase foi necessário desenhar, no *Gabedit*, as estruturas dos ligandos e a obtenção das suas coordenadas, para que depois, em fases posteriores, as estruturas sejam otimizadas no *Gaussian* e sejam realizados os cálculos das condições de adsorção dos ligandos em superfícies elementares de ouro [Au (100), (110) e (111)], já preparadas no REQUIMTE.

Capítulo III:

Materiais e Métodos

1. Materiais e Métodos

Nesta secção são apresentadas as moléculas, os materiais e métodos usados no estudo.

Inicialmente procedeu-se a uma revisão da literatura na *PubMed* e na *Web of Knowledge* com as seguintes palavras-chaves: *dermic diffusion, skin, computational methods, mathematical diffusion models*. Foram encontradas um total de 279 publicações e após a aplicação dos critérios de inclusão (qualidade dos estudos computacionais dos modelos, comparação com os resultados experimentais, adequação das explicações teóricas e aplicabilidade dos modelos em diversas situações) chegou-se a um total de 37 publicações. A revisão originou numa extensa análise de várias metodologias teóricas para o estudo da difusão dérmica e sistematiza as suas características. Posteriormente, iniciou-se a análise das moléculas usadas no presente estudo.

1.1. Compostos

As moléculas que serão analisadas, expostas na tabela 3, foram escolhidos com base no papel que desempenham na regulação alimentar.

O composto ideal seria a leptina devido ao seu papel na ingestão alimentar. A leptina é responsável pelo controlo da ingestão alimentar através da ativação de dois recetores específicos. O recetor ObRb, de cadeia longa com maior expressão no hipotálamo, e o recetor ObRa de cadeia curta, encontrados noutros órgãos como o pâncreas[84]. No entanto, devido ao seu elevado tamanho (167 aminoácidos) a sua análise torna-se difícil, senão mesmo incompatível, para o tipo de estudo pretendido. Assim, optou-se por estudar os ligandos do anticorpo monoclonal antagonista do recetor da leptina. São oito, os diferentes ligandos, recolhidos da *World Wide Protein Data Bank*[85], que interagem com os recetores da leptina, ativando-os e desencadeando a mesma resposta que a leptina.

Tabela 3 – Diferentes ligandos do anticorpo monoclonal antagonista do recetor da leptina em estudo

Ligando do anticorpo monoclonal antagonista do recetor da leptina	Nomenclatura IUPAC	Fórmula química
Acetato		$C_2H_3O_2$
Arginina	Ácido 2-amino-5-(diaminometilideno-amino)pentanóico	$C_6H_{14}N_4O_2$
L-serina e D-serina	Ácido 2-Amino-3-hidroxiopropanóico	$C_3H_7NO_3$
Etilenoglicol	Etano-1,2-diol	$C_2H_4(OH)_2$
Glutamato	Ácido (2S)-2-aminopentanodióico	$C_5H_9NO_4$
Histidina	Ácido (S)-2-amino-3-(3H-imidazol-4-yl)propanóico	$C_6H_9N_3O_2$
Prolina	Ácido (S) -Pirrolidina-2-carboxílico	$C_5H_9NO_2$

1.2. Métodos

A análise dos compostos será interpretada usando programas de química computacional. Deste modo, foram utilizados computadores (Hardware: Computador portátil HP e *Cluster Matheor* da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto) onde o *software* necessário está instalado para proceder à análise das moléculas (Software: *Gabedit 2.1.0* no computador portátil, e *Gaussian* no *Cluster Matheor* da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto).

Para inicializar os cálculos computacionais, procedeu-se ao uso do *Gabedit* para desenhar os compostos e extrair a Matriz Z. O arquivo extraído do *Gabedit* pode ser processado no *Gaussian* e otimizar a estrutura para posterior utilização em cálculos mais avançados.

Tabela 4 – *Hardware e Software* usado no estudo.

<i>Hardware</i>	<i>Software</i>
Computador portátil HP	<i>Gabedit 2.1.0</i>
Cluster Matheor do Super Computador: 216 Processadores dispersos em 27 nodes com os seguintes recursos: <ul style="list-style-type: none">- vendor_id : GenuineIntel- cpu family : 6- model : 30- modelname : Intel(R) Xeon(R) CPU X3430 @ 2.40GHz <ul style="list-style-type: none">- cpu MHz : 2394.187- cachesize : 8192 KB	<i>Gaussian</i>

Capítulo IV:

Resultados

1. Difusão Dérmica e Modelos Matemáticos

Esta secção resulta de uma revisão sistemática da literatura acerca dos modelos matemáticos utilizados até à data para explicar os diferentes fenómenos ocorridos na difusão dérmica de fármacos.

Tradicionalmente, a pele e os fenómenos de difusão associados têm sido estudados com modelos matemáticos puros, especialmente baseados nas equações de Fick[86-94]. Uma análise sistemática destes modelos implica uma divisão baseada na abordagem particular e no uso da lei de Fick. No entanto, visões particulares em dispositivos específicos elevaram novos desafios e outros modelos matemáticos foram desenvolvidos. Uma revisão extensiva destes modelos foi estudada e uma síntese relevante é apresentada na tabela seguinte.

Tabela 5 – Modelos Matemáticos de Difusão Dérmica.

Modelo	Hipótese Teórica	Modelo Matemático	Validação
Primeira Lei de Fick	A matriz lipídica do estrato córneo é vista como meio homogéneo circundado de corneócitos em que o produto químico difunde de altas para baixas concentrações de acordo com a primeira lei de Fick.	$(12) Q = \frac{DAT\nabla C_s}{h}$ $(13) J_{ss} = \frac{Q}{AT} = \frac{D\nabla C_s}{h}$ $(14) J_{max} = \frac{DS_s}{h}$ $(15) J_{ss} = \frac{KD\nabla C_v}{h}$ $(16) K_p = \frac{J_{ss}}{\nabla C_v}$	Os perfis de concentração na pele têm sido examinados para separar os efeitos sobre o coeficiente de partição e a difusão na permeação [101]. Além disso, os modelos matemáticos fornecem um meio para avaliar a probabilidade de

			<p>exposição sistémica em contacto dérmico com produtos químicos tóxicos [92].</p> <p>Nos Estados Unidos, as aplicações da modelação matemática para a avaliação do risco dérmico cita o uso de coeficientes de permeabilidade (K_p) e a sua estimativa baseada nos modelos.</p>
<p>Primeira Lei de Fick e os modelos de Difusão Passiva</p>	<p>Os Modelos de Difusão passiva são baseados na conservação do número de partículas e nas leis de difusão de Fick.</p>	<p>(17) $TEWL = \frac{K.D}{H} \cdot \Delta C = K_p \cdot \Delta C$</p> <p>(18) $TEWL_{(x)} = \frac{K.D}{(H-x)} \cdot \Delta C$</p> <p>(19) $1/TEWL_{(x)} = \frac{H}{K.D \cdot \Delta C} - \frac{x}{K.D \cdot \Delta C}$</p>	<p>TEWL aumenta lentamente no início e depois mais rapidamente com o grau de comprometimento do estrato córneo.</p> <p>Em segundo lugar, a impedância da pele de baixa frequência diminui exponencialmente em função da remoção progressiva do estrato córneo [103].</p>

Segunda Lei de Fick	O sistema é modulado como um sistema de difusão unidimensional usando um potenciador de penetração química (ácido Oleico)	$(20) \frac{\partial u}{\partial t} = D \frac{\partial^2 u}{\partial x^2};$ $0 \leq x \leq L; t \geq 0$ $(21) j = \left(-D \frac{\partial u}{\partial x} \right) \Big _{u(x=L,t)}$ $(22) \frac{\partial c_1}{\partial t} = D_1 \frac{\partial^2 c_1}{\partial x^2} + u_1 \frac{\partial c_1}{\partial u}; a \leq x \leq 0$ $(23) \frac{\partial c_2}{\partial t} = D_2 \frac{\partial^2 c_2}{\partial x^2} + u_2 \frac{\partial c_2}{\partial u}; a \leq x \leq b$	Na presença do promotor de penetração, a difusão e permeação das moléculas do modelo foram mais rápidas do que na membrana modelo sem ácido oleico[87].
Segunda Lei de Fick e os Modelos de Difusão Passiva	Os sistemas são representados pelo veículo, uma membrana da pele e um capilar	$(24) \frac{\partial c_1}{\partial t} = D_1 \frac{\partial^2 c_1}{\partial x^2};$ $a < x < 0, 0 < t \leq T$ $(25) \frac{\partial c_2}{\partial t} = D_2 \frac{\partial^2 c_2}{\partial x^2};$ $a < x < b, 0 < t \leq T$ $(26) C_1[x, 0] = C_{10},$ $a < x < 0$ $(27) C_2[x, 0] = C_{20},$ $a < x < b$ $(28) \frac{\partial c_1(a,t)}{\partial x} = 0;$ $0 < t \leq T$ $(29) \frac{D_1 \partial c_1[0,t]}{\partial x} = \frac{D_2 \partial c_2[0,t]}{\partial x};$ $0 < t \leq T$ $(30) K_m C_1[0, t] = C_2[0, t], 0 < t \leq T$	Esta técnica pode ser aplicada para estimar o doseamento necessário para atingir uma taxa de libertação específica. Uma concentração de fármaco plasmática constante é obtida aumentando o período de aplicação e/ou reduzindo o período de remoção que produz uma entrega de fármaco contínua [90].

Hipótese Híbrida	<p>Como mencionado previamente, os modelos matemáticos atuais usam as leis de difusão de Fick para descrever a absorção dérmica através do estrato córneo.</p>	$(31) -\frac{D_2 \partial C_2 [b, t]}{\partial x} = K_{cl} C_2 [b, t]; 0 < t \leq T$ $(32) \frac{dN_{iA}/N_A}{dt} = \frac{(S_{AB}D)}{(S_{Atot}R_A^2)}$ $(33) L_{EA} + H_{EA} = N_A$ $(34) \frac{dN_{AB}}{dt} = \frac{(H_{EA}/N_A) dN_{iA}/dt}{\frac{H_{EA}S_{AB}D}{(S_{Atot}R_A^2)}}$ $(35) \frac{dN_{AB}}{dt} = \frac{dN_{BA}}{dt} - \frac{dN_{AB}}{dt}$ $(36) \frac{dN_{AB}}{dt} = \frac{(H_{EA}/N_A) y dN_{iA}/dt}{\frac{H_{EA}S_{AB}D}{(S_{Atot}R_A^2)}}$ $(37) y(x) = \frac{(1 + \exp(-a(1-x)))}{(1 - \exp(-a))}$ $(38) y(x) = \frac{\exp(-ax) - \exp(-a)}{(1 - \exp(-a))}$ <p>Eles descobriram que qualquer quantidade de soluto no nó A é a mesma fração de soluto transferida para o nó B, na qual emita a Difusão de Fick. Ainda descobriram que quando a transferência de soluto através de todos os nós é integrada, a fração de soluto transferido permanece constante em toda a gama de doses, o que se assemelha á difusão de Fick. Capacidade do nó superior resulta em maiores taxas de transferência de soluto [94].</p>
Transformada de Laplace	<p>A transformada de Laplace pode ser usada para descrever a permeação de cutânea de</p>	$(39) \hat{C}(x, s) = \mathcal{L} \{ C(x, t) \} = \int_0^\infty C(x, t) e^{-st} dt$ $(40) s\hat{C}(x, s) - C(x, 0) = D \frac{d^2}{dx^2} \hat{C}(x, s)$ <p>Hadgraft [95,96] e Guy e Hadgraft [66] foram os pioneiros no uso da transformada de Laplace para a</p>

	<p>fármacos e metabolitos, admitindo o metabolismo cinético de primeira ordem.</p>	<p>(41) $\hat{C}(x, s) = A(s) \sinh\left(\frac{x}{h}\sqrt{st_d}\right) + B(s) \cosh\left(\frac{x}{h}\sqrt{st_d}\right)$</p> <p>(42) $\frac{\partial C_u}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C_u}{\partial x^2} - K_{on} C_u + K_{off} C_b$</p> <p>(43) $\frac{\partial C_b}{\partial t} = K_{on} C_u - K_{off} C_b$</p> <p>(44) $D \frac{\partial^2 \hat{C}_u}{\partial x^2} = \left(s + \frac{sK_{on}}{s+K_{off}}\right) \hat{C}_u$</p> <p>(45) $g(s) = s + \frac{sK_{on}}{s+K_{off}}$</p>	<p>modelação matemática do transporte da pele, e Anissimov e Roberts [113] usaram a inversão numérica das soluções da transformada de Laplace para a equação da difusão para as simulações e análise de dados de experiencias do transporte da pele Bando e a sua equipa [114, 115] desenvolveram um modelo de difusão de duas camadas que incorpora ambas as vias polar e não polar e as equações da Transformada de Laplace foram obtidas para descrever a permeação na pele do fármaco e metabolito [92].</p>
<p>Teoria da Partícula em</p>	<p>O coeficiente de partição entre o</p>	<p>(46) $K_{SC/v} = aP^b$</p>	<p>Esta teoria foi usada por Mitragotri [92]</p>

Escala	estrato córneo e o veículo é estimado a partir de algoritmos de atividade da estrutura relacionando com medições experimentais.	(47) $K_{SC/v} = \Phi_{lip}K_{lip/v} + \Phi_{cor}K_{cor/v}$	onde ele desenvolveu uma equação para descrever a difusão do soluto na bicamada lipídica. A teoria calcula o coeficiente de difusão com base na quantidade de trabalho necessário criando um volume livre para permitir a difusão do soluto.
Modelo de Membrana Homogénea	O estudo da difusão passageira através do modelo das estruturas do estrato córneo incluindo ambas as fases de corneócitos ordenados e desordenados.	(48) $h_{SC}^* = N(d + t + g)$ (49) $\frac{J_0}{J^*} = 1 + \frac{\alpha\Phi}{\sigma} + \frac{\alpha^2\Phi^2}{4(1-\Phi)}$ (50) $\frac{t_{lag*}}{t_{lag0}} = \frac{\sigma(1+\alpha\Phi)}{\alpha} \left(1 + \frac{\alpha\Phi}{\sigma} + \frac{\omega}{(1+\omega^2)} \frac{\alpha^2\Phi^2}{(1-\Phi)} \right)$	Equações (48) e (50) foram validadas para lípidos isotrópicos e corneócitos impermeáveis [128].

Os modelos matemáticos que abordam a pele a nível nano podem ser classificados de acordo com os pressupostos metodológicos, isto é, eles são baseados na primeira lei de Fick, transformada de Laplace, teoria da partícula em escala, modelo da membrana homogénea ou abordagem híbrida (usando a primeira e a segunda leis de Fick). Assim, analisando cada modelo implica uma análise da abordagem particular da escolha e as razões para tal escolha.

1.1. Primeira Lei de Fick

Quando um fármaco é colocado na superfície da pele, migra para as camadas mais profundas através do estrato córneo e da epiderme viável[91]. O estrato córneo é composto por queratinócitos que se torna a barreira substancial para a entrega do fármaco porque o transporte ativo e facilitado é dificultado na entrega do fármaco[17]. A difusão passiva é o mecanismo pela qual os químicos se movem através do estrato córneo. Tal mecanismo está ilustrado na figura 4[94].

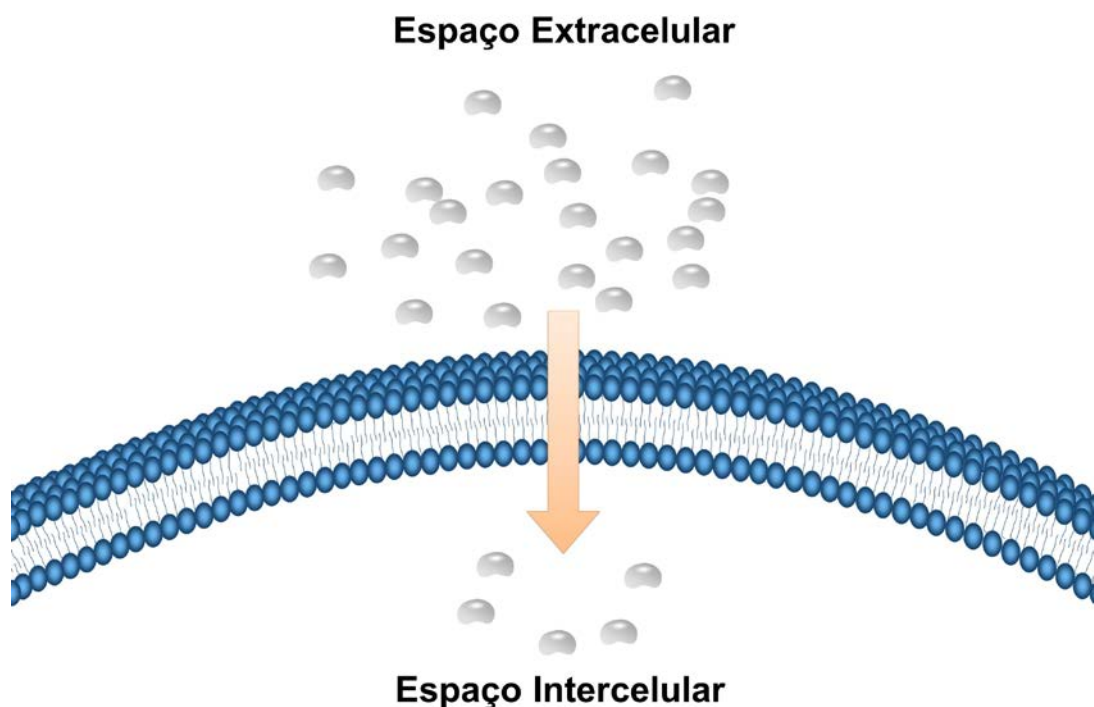


Figura 4 – Mecanismo da difusão passiva.

As leis de Fick da difusão determinam que a difusão ocorre a favor do gradiente de concentração, ou seja, ocorrem na direção de maior para menor concentração[94, 97]. Este princípio é aplicado nos recentes modelos matemáticos usados para descrever a absorção dérmica através do estrato córneo[94, 98, 99].

A matriz lipídica do estrato córneo é vista como um meio circundante de queratinócitos onde a substância difunde de alta para baixa concentração de acordo com a primeira lei de Fick. A fração que é absorvida num específico período de tempo é

constante e permanecerá constante em diferentes concentrações[94, 98]. A equação usada para descrever o transporte na pele em condições de estado estacionário é dada pela primeira lei de Fick:

$$(12) \quad Q = \frac{DA t \nabla C_s}{h}$$

Esta equação relaciona a quantidade de soluto, Q , atravessando a membrana da pele de área, A , ao longo do período de tempo t , o gradiente de concentração de duas superfícies da pele, ∇C_s , o coeficiente de difusão na membrana da pele, D , e o comprimento de percurso, h [92]. Esta abordagem assume que a absorção dérmica é um processo de primeira ordem, que pode ser descrito de acordo com a primeira lei da difusão de Fick[94].

O estrato córneo comporta-se como uma membrana pseudo-homogénea e as propriedades da barreira não variam com o tempo ou a posição. A equação anterior (equação n.º 12) pode ser expressa em termos de fluxo na pele no estado estacionário, J_{ss} , como se segue:

$$(13) \quad J_{ss} = \frac{Q}{At} = \frac{D \nabla C_s}{h}$$

Pelo qual, o fluxo máximo, J_{max} , é dado quando a solubilidade, S_s , de um soluto no estrato córneo é alcançado, e a equação pode ser descrita como[92, 100]:

$$(14) \quad J_{max} = \frac{D S_s}{h}$$

A atividade termodinâmica para qualquer soluto é definida pela solubilidade fracionada do soluto na pele (C_s/S_s). No entanto, a não linearidade pode surgir como um resultado de interações não ideais do soluto-pele e soluto-veículo[57, 92]. É mais conveniente expressar as concentrações em função da concentração do soluto no veículo (C_v) e o coeficiente de partição, K , do soluto entre a pele e o veículo como se segue:

$$(15) \quad J_{ss} = \frac{K D \nabla C_v}{h}$$

Onde $K = C_s/C_v$.

A avaliação do coeficiente de permeabilidade (K_p), tem sido o foco principal do modelo de permeação. K_p é definido como o fluxo no estado estacionário de químicos através da pele (J_{ss}) normalizado pelo gradiente de concentração, C_v :

$$(16) \quad K_p = \frac{J_{ss}}{\nabla C_v}$$

A compreensão da penetração cutânea é melhor exemplificada em modelos que são sustentados pela experiência. Por exemplo, os perfis de concentração na pele têm sido examinados para separar os efeitos sobre o coeficiente de partição e a difusão na permeação[101]. Além disso, os modelos matemáticos fornecem um meio para avaliar a probabilidade de exposição sistêmica em contacto dérmico com produtos químicos tóxicos. Nos estados unidos, as aplicações da modelação matemática para avaliar o risco dérmico cita o uso dos coeficientes de permeabilidade e a estimação baseada nos modelos[92].

1.1.1. Primeira Lei de Fick e os modelos de Difusão Passiva

Os modelos de Difusão Passiva são baseados na conservação do número de partículas e nas leis de difusão de Fick. Algumas abordagens matemáticas relatadas por vários autores são baseadas nos modelos de difusão que consiste nas equações diferenciais parciais descrevendo a entrega do fármaco no espaço e tempo de acordo com as leis da difusão de Fick[93]. De acordo as leis de difusão de Fick, os penetrantes são transportados, através da pele, por via transcelular, intercelular e via apêndices[56, 90, 102]. Estes diferentes transportes são ilustrados na figura 3.

Em relação aos estudos de Mitragotri e os seus parceiros, os processos de transporte na pele podem ser descritos pela primeira lei de Fick[92]. Além disso, Higuchi e a sua equipa derivaram modelos matemáticos que descrevem a absorção cutânea como um processo de difusão passiva no veículo e em série de camadas de membrana[100].

Sekkat e os seus assistentes avaliaram as propriedades biofísicas, tais como a perda de água transepidermal (TEWL) da pele de orelha de suínos e compararam os resultados com dados de pele humana *in vivo*[103]. Eles usaram a primeira lei de difusão de Fick para descrever a TEWL através da pele:

$$(17) \quad TEWL = \frac{K \cdot D}{H} \cdot \Delta C = K_p \cdot \Delta C$$

Onde K é o coeficiente de partição do estrato de córneo/ água, D é a difusividade da água através do estrato córneo de espessura H , e ΔC é a diferença de concentração de água através da barreira.

Se o X do estrato córneo é removido por *tapestripping*, e TEWL aumentou para $TEWL_{(x)}$ e se K é conhecido ou assumido, então um gráfico de $1/TEWL_{(x)}$ Versus X permite que H , D e K_p sejam determinados[103, 104].

$$(18) \quad TEWL_{(x)} = \frac{K.D}{(H-x)} \cdot \Delta C$$

$$(19) \quad 1/TEWL_{(x)} = \frac{H}{K.D.\Delta C} - \frac{X}{K.D.\Delta C}$$

TEWL aumenta lentamente no início e depois mais rapidamente com o grau de comprometimento do estrato córneo. Em segundo lugar, a impedância da pele de baixa frequência diminui exponencialmente em função da remoção progressiva do estrato córneo. As sensibilidades diferenciais do TEWL e as medições da impedância de baixa frequência para o grau de comprometimento da barreira sugerem que as técnicas usadas em conjunto representam uma maneira de caracterizar a funcionalidade do estrato córneo[103].

1.2. Segunda Lei de Fick

Outros modelos matemáticos que descrevem a entrega do fármaco através da derme são baseados na segunda lei de Fick. Qualquer fármaco difusivo dermicamente é colocado na superfície da pele e viaja para a camada mais interna através do estrato córneo e da epiderme viável, como visto anteriormente. Pode localizar-se a origem do processo de entrega do fármaco na interface entre duas regiões[91], como ilustra a figura 5.

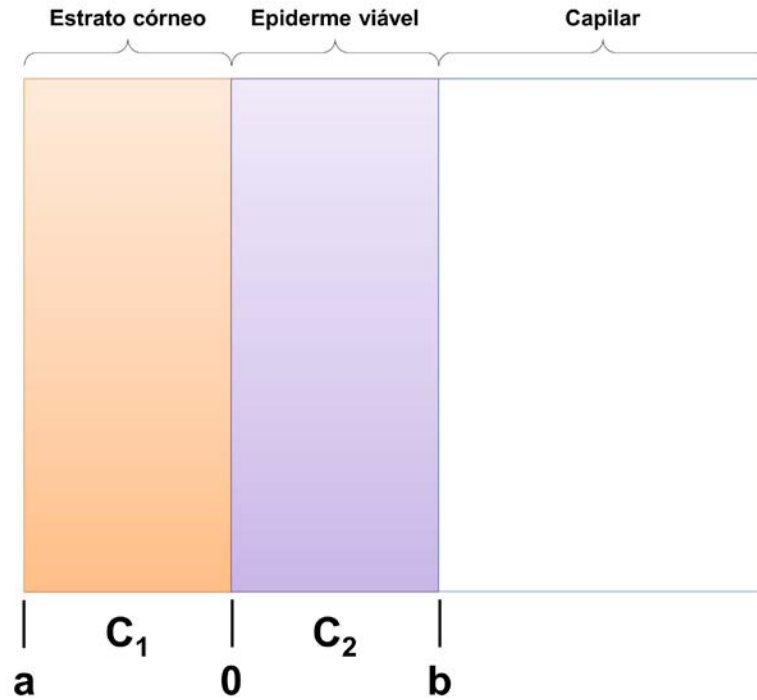


Figura 5 – Processo de entrega entre duas regiões: estrato córneo e epiderme viável: C_1 , concentração do fármaco no estrato córneo; C_2 , Concentração do fármaco na epiderme viável; a , espessura do estrato córneo; b , espessura da epiderme viável.

Para estimar a concentração de fármaco ao longo de um eixo perpendicular da membrana normalmente designado por $u(t,x)$, [86, 87, 91] deve ser encontrada a solução de uma equação de difusão linear unidimensional, de acordo a segunda lei de difusão de Fick:

$$(20) \quad \frac{\partial u}{\partial t} = D \frac{\partial^2 u}{\partial x^2}; \quad 0 \leq x \leq L; t \geq 0$$

Onde x é a espessura da membrana e t é o período de tempo, e a taxa de entrega ou o fluxo são definidos por:

$$(21) \quad j = \left(-D \frac{\partial u}{\partial x} \right) \Big|_{u(x=L,t)}$$

Uma vez que a origem esta localizada na interface entre duas regiões, as equações são definidas como:

$$(22) \quad \frac{\partial c_1}{\partial t} = D_1 \frac{\partial^2 c_1}{\partial x^2} + u_1 \frac{\partial c_1}{\partial u}; \quad a \leq x \leq 0$$

e

$$(23) \quad \frac{\partial C_2}{\partial t} = D_2 \frac{\partial^2 C_2}{\partial x^2} + u_2 \frac{\partial C_2}{\partial u} ; a \leq x \leq b$$

Onde C_1 e C_2 são a concentração do fármaco no estrato córneo e na epiderme viável, respetivamente; D_1 e D_2 são a difusão do fármaco efetiva no veiculo e na pele [90].

Para além dos métodos físicos, para a permeação do fármaco através do estrato córneo pode-se usar intensificadores de penetração química[86, 87, 105, 106]. Ácido Cis-9-Octadecenóico (ácido oleico, OA) é um bom potenciador da penetração[86, 107, 108], e foi conduzida uma investigação em relação ao impacto do intensificador de penetração, ácido oleico, sobre as propriedades da barreira do modelo lipídico do estrato córneo.

A segunda lei foi estudada através de duas membranas de modelo lipídico (membrana I e membrana II) com ácido oleico incorporado. A composição das membranas estão resumidas na tabela 6, e foi caracterizado o impacto dos seus compostos na função da barreira através de estudos de permeação e de difusão de três moléculas (Ureia, Cafeína e diclofenac sódio).

Tabela 6 – Composição das membranas modelo do estrato córneo.

Membrana modelo	Composição
<u>Membrana I</u>	Cer [AP] / Chol / PA / ChS
<u>Membrana II</u>	Cer [AP] / Cer [EOS] / Chol / PA
<u>Membrana Ia</u>	Cer [AP] / Chol / PA / ChS / OA
<u>Membrana IIa</u>	Cer [AP] / Cer [EOS] / Chol / PA / OA

O estudo mostrou que a presença de ácido oleico enfraqueceu a função da barreira da membrana I e demonstrou o efeito oposto na membrana II. Na presença do promotor de penetração a difusão e permeação das moléculas modelo foram mais rápidas do que na membrana modelo sem ácido oleico.

Estudos anteriores mostraram que não só: (1) a difusão de ureia foi mais rápida do que a permeação de cafeína e diclofenac sódio; (2) a ureia, a droga mais hidrofílica, difunde

mais rápido que a cafeína, a molécula mais lipofílica; e a (3) ureia é ainda mais rápida que a droga mais lipofílica, o diclofenac sódio[87].

Vários autores utilizaram um modelo baseado na Segunda Lei de difusão de Fick para calcular o coeficiente de difusão de fármacos modelo. Assim a concentração do fármaco, $u(t,x)$, na membrana modelos pode ser aproximado por uma solução da equação de difusão linear unidimensional, como mencionado antes[86, 87].

1.2.1. Segunda Lei de Fick e os modelos de Difusão Passiva

O modelo de difusão Fickiana é também aplicado em estudos de sistemas transdérmicos com multicamadas, planar, adesivo com fármaco em polímero aplicado na pele, onde cada camada contém uma concentração diferente de fármaco encapsulado na matriz polimérica. Isto também pode ser visto em casos onde os sistemas são representados por um veículo, uma membrana de pele e um capilar, como relatado previamente[90]. Neste modelo, as concentrações do fármaco no veículo e na pele são diferentes de modo a simular o processo anterior.

$$(24) \quad \frac{\partial C_1}{\partial t} = D_1 \frac{\partial^2 C_1}{\partial x^2}; \quad a < x < 0, 0 < t \leq T$$

e

$$(25) \quad \frac{\partial C_2}{\partial t} = D_2 \frac{\partial^2 C_2}{\partial x^2}; \quad a < x < b, 0 < t \leq T$$

As espessuras do veículo e da pele são a e b , respetivamente; e T é o período de aplicação. As condições iniciais são:

$$(26) \quad C_1(x, 0) = C_{10}, \quad a < x < 0$$

e

$$(27) \quad C_2(x, 0) = C_{20}, \quad a < x < b$$

As condições fronteira são:

$$(28) \quad \frac{\partial C_1(a,t)}{\partial x} = 0; \quad 0 < t \leq T$$

$$(29) \quad \frac{D_1 \partial C_1(0,t)}{\partial x} = \frac{D_2 \partial C_2(0,t)}{\partial x}; \quad 0 < t \leq T$$

$$(30) \quad K_m C_1(0, t) = C_2(0, t), \quad 0 < t \leq T$$

$$(31) \quad -\frac{D_2 \partial C_2(b,t)}{\partial x} = K_{cl} C_2(b, t); \quad 0 < t \leq T$$

Onde K_m é o coeficiente de partição adesivo-pele, K_{cl} é definido como a distância por unidade de área do medicamento por unidade de excesso de concentração em $x = b$ [90, 109]. A equação (28) indica que não ocorre troca de material entre o veículo e o meio envolvente; a equação (29) é a continuidade do fluxo através da interface veículo/pele; a equação (30) corresponde a uma condição equilíbrio na interface veículo/pele; a equação (31) indica que a eliminação do fármaco do sistema capilar segue uma cinética de primeira ordem em $x = b$. O transporte é feito na direção perpendicular à superfície da pele.

Simon e os seus colaboradores[90], têm-se dedicado ao estudo do transporte de um agente medicinal através do veículo e a subsequente penetração no estrato córneo. Os “*eigenmodes*” e os “*eigenvalues*” foram computorizados e introduzidos numa fórmula inversa para estimular a taxa de entrega e a quantidade do fármaco no veículo e na pele. Os resultados foram obtidos por um programa usando *Mathematica*® (*Wolfram Research, Inc.*), um *software* de computador.

Verificou-se que as aplicações repetidas de uma dose conduzem a uma acumulação de fármaco na pele. Esta acumulação é contrabalançada pelo aumento do fluxo do fármaco para o local do recetor[90, 109]. Um patamar é atingido quando as taxas de absorção e eliminação são iguais. Esta técnica pode ser aplicada para estimar o doseamento necessário para atingir uma taxa de libertação específica. Uma concentração de fármaco plasmática constante é obtida aumentando o período de aplicação e/ou reduzindo o período de remoção que produz uma entrega de fármaco continua[90].

1.3. Hipótese híbrida: primeira e segunda lei de Fick

Como mencionado anteriormente, os modelos matemáticos atuais usam as leis de difusão de Fick para descrever a absorção dérmica através do estrato córneo[94, 98, 99]. Os químicos, na matriz lipídica do estrato córneo, difundem de altas para baixas concentrações de acordo com a primeira lei de Fick. A fração de uma dose química que é absorvida através da pele durante um período de tempo específico é constante, e permanecerá constante para várias concentrações de químico aplicado na superfície da pele.

Schumm e os seus colaboradores[94] propuseram outra abordagem para a modelação matemática da cinética química na matriz lipídica do estrato córneo. Representaram a estrutura lipídica como uma rede onde as regiões lipídicas são representadas como nós e usaram três modelos para descrever o processo pela qual a transferência de soluto entre os dois nós adjacentes, com base na lei de Fick.

O primeiro modelo é projetado para ter uma transferência de soluto linear. Para o nó A com N_A moléculas, uma fração da sua molécula será na interface A-B durante cada intervalo de tempo como uma função de tamanhos de interface relativos e a difusibilidade do soluto.

$$(32) \quad \frac{(dN_{iA}/N_A)}{dt} = \frac{(S_{AB}D)}{(S_{Atot}R_A^2)}$$

Onde dN_{iA} é o número de moléculas de soluto no nó A que migram para a interface A e B, durante o intervalo de tempo, t ; S_{AB} é a área de superfície partilhada pelos nós A e B; S_{Atot} é a área de superfície total do nó A; D é a difusibilidade do soluto no nó A; e R_A^2 é o raio da região representada pelo nó A.

As moléculas no nó A na interface do nó A com B irão dividir para o nó B se eles têm energia suficiente para atravessar a fronteira do nó. A distribuição de Maxwell-Boltzmann (exemplificada na figura 6) caracteriza a energia de um grupo de molecular. As moléculas com maior energia serão as energias do lado direito da distribuição e as de baixa energia serão as do lado esquerdo.

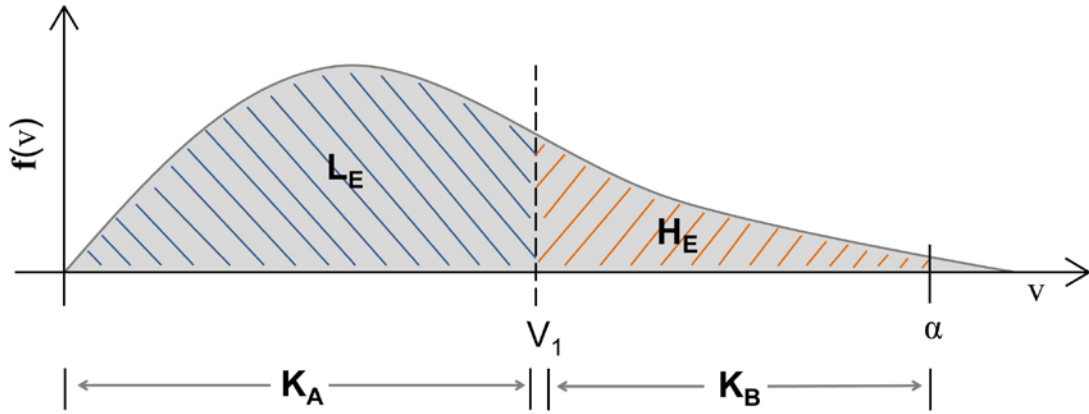


Figura 6 – Distribuição de Maxwell-Boltzmann: L_E , Moléculas baixa energia; H_E , moléculas de alta energia; $K_{A(B)}$, Solubilidade do nó A (B); α , limite superior de integração para N_A ; V_1 , Limite superior de integração para L_E .

A área total abaixo da distribuição é o número de moléculas de soluto no nó A.

$$(33) \quad L_{EA} + H_{EA} = N_A$$

As moléculas que repartem do nó A para o nó B são as moléculas na interface A-B com energia suficiente para atravessar a fronteira do nó.

$$(34) \quad \frac{dN_{AB}}{dt} = (H_{EA}/N_A)dN_{iA}/dt = \frac{H_{EA}S_{AB}D}{(S_{Atot}R_A^2)}$$

O nível de soluto do nó A é então atualizado com a diferença da transferência entre o nó A e B.

$$(35) \quad \frac{dN_{AB}}{dt} = \frac{dN_{BA}}{dt} - \frac{dN_{AB}}{dt}$$

O segundo é projetado para aumentar a transferência de soluto do nó com maior concentração para o de menor concentração. Concentrações de soluto maiores causa mudanças físico-químicas na matriz lipídica que diminui as suas propriedades da barreira. Quando a quantidade de A é maior que a B, a difusividade em A será maior que em B. A diferença induz um gradiente aumentando a transferência do nó A para o nó B. E o terceiro modelo foi desenvolvido para impor uma capacidade do nó e permitir apenas uma quantidade finita de soluto num nó em qualquer momento[94]. Este modelo calcula a fração y para transferir do nó A para o nó B com a fração x de N_B sobre N_{Bmax} .

$$(36) \quad \frac{dN_{AB}}{dt} = (H_{EA}/N_A) y dN_{iA}/dt = \frac{H_{EA}S_{AB}D}{(S_{Atot}R_A^2)}$$

A equação $y(x)$ é dada para um modelo roll-off e um modelo exponencial. No primeiro modelo a transferência no nó B atinge a sua capacidade (quando x tende para 1) e no segundo modelo a transferência decai com o nó B a atinge a sua capacidade.

(roll-off model)

$$(37) \quad y(x) = \frac{(1 + \exp(-a(1-x)))}{(1 - \exp(-a))}$$

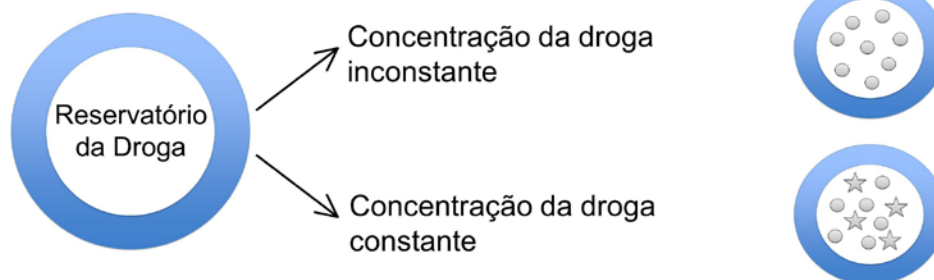
(exponential model)

$$(38) \quad y(x) = \frac{\exp(-ax) - \exp(-a)}{(1 - \exp(-a))}$$

Schum e a equipa, simularam os modelos básicos ao longo do tempo e divergiram as concentrações de soluto na interface e descobriram que qualquer quantidade de soluto no nó A é a mesma fração de soluto transferido para o nó B, o que imita a difusão Fickiana. Concluíram, ainda que quando a transferência de soluto através de todos os nós é integrada, a fração de soluto transferido permanece constante em toda a gama de doses, na qual também se assemelha à difusão Fickiana. O nó com capacidade superior resulta numa taxa de soluto transferido maior[94].

Além disso, Siepmann e os seus colaboradores mencionam várias teorias baseadas nas leis de difusão de Fick, e concluem que o tratamento matemático pode ser bastante simples, se o fármaco for controlado como coeficientes de difusão contantes[88]. Distinguem dois tipos de sistemas: o sistema de reservatório e o sistema monolítico, como ilustrado na figura 7. O primeiro sistema é rodeado por uma membrana de barreira de controlo de libertação. No segundo, não existe local de separação entre um reservatório do fármaco e a barreira de controlo da taxa de libertação[88].

Sistema de Reservatório



Sistema Monolítico

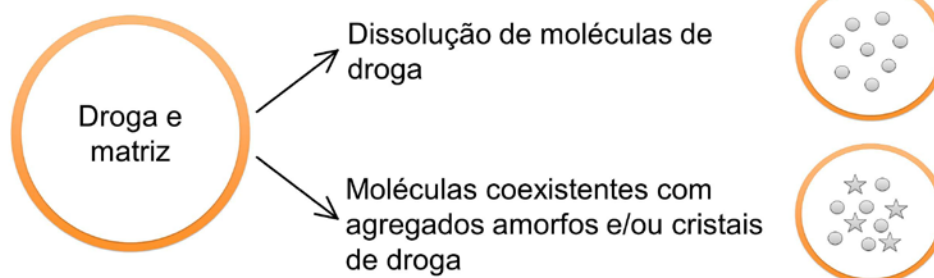


Figura 7 – Representação do sistema reservatório e monolítico.

No dispositivo de reservatório, se a concentração do fármaco inicial é inferior à solubilidade do fármaco, as moléculas do fármaco libertadas não são substituídas e a concentração do fármaco no interior da superfície da membrana diminui com o tempo. Ainda, se a concentração de fármaco inicial é maior que a solubilidade do fármaco, a libertação das moléculas são repostas pela dissolução parcial de agregados amorfos/cristal do fármaco, resultando numa concentração constante no interior da superfície da membrana. No dispositivo monolítico, a geometria do sistema tem influência no resultado da libertação do fármaco. Se a concentração inicial é inferior à solubilidade do fármaco, as moléculas do fármaco são dissolvidas no interior do material. Se não, as moléculas do fármaco dissolvido coexistem com agregados amorfos e/ou cristais do fármaco[88, 110].

1.4. Transformada de Laplace

A expressão do transporte de um soluto através da pele envolve um número de passos num processo variante de espaço e de tempo que não é fácil. Não é simples descrever o processo numa única equação devido à complexidade das equações[92]. A

transformada de Laplace pode ser utilizada para descrever a permeação do fármaco e do metabolito, admitindo a cinética de primeira ordem.

A transformada de Laplace é uma transformação integral usada para resolver equações diferenciais parciais e ordinárias[87, 92, 93, 111, 112]. A transformada de Laplace é definida por:

$$(39) \quad \hat{C}(x, s) = \mathcal{L} \{ C(x, t) \} = \int_0^{\infty} C(x, t) e^{-st} dt$$

Onde \mathcal{L} é o operador de Laplace, s é a variável de Laplace e o chapéu sobre a função denota a transformada de Laplace.

A transformada de Laplace reduz a equação de difusão diferencial parcial numa equação diferencial ordinária na qual é muito mais fácil de resolver, e desta forma, a equação de difusão da transformada de Laplace é a seguinte:

$$(40) \quad s\hat{C}(x, s) - C(x, 0) = D \frac{d^2}{dx^2} \hat{C}(x, s)$$

Onde $C(x, 0)$ é a condição inicial. Se a pele inicia sem qualquer produto, $C(x, 0) = 0$ e a equação acima torna-se em:

$$(41) \quad \hat{C}(x, s) = A(s) \sinh\left(\frac{x}{h} \sqrt{st_d}\right) + B(s) \cosh\left(\frac{x}{h} \sqrt{st_d}\right)$$

Onde h é a espessura do estrato córneo, $t_d = h^2/D$ e corresponde ao tempo característica da difusão, e $A(s)$ e $B(s)$ são as funções de apenas s , na qual são determinadas pelas condições fronteira e h pode também ser adicionalmente manipulado para calcular o fluxo transdérmico e o transporte do fármaco cumulativo[66, 92, 95, 96].

Simon e os seus colaboradores disseram que as equações de entrega de fármaco são resolvidas usando a transformada de Laplace[91]. A estratégia de solução baseada na transformada de Laplace foi escolhido devido ao cálculo direto de uma constante de tempo efetivo. Esta constante de tempo é o tempo que demora a atingir a taxa de libertação e concentrações no estado estacionário desejadas na pele.

Por outro lado Roberts e a sua equipa consideraram a cinética associada com o efeito reservatório do estrato córneo[57]. À medida que a fração não ligada é menor que a unidade, a ligação conduz a uma difusão mais lenta. Se a ligação/particionamento não é rápida em comparação com a difusão, a equação de difusão simples tem de ser substituída por equações diferenciais parciais conjugadas:

$$(42) \quad \frac{\partial C_u}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C_u}{\partial x^2} - K_{on} C_u + K_{off} C_b$$

$$(43) \quad \frac{\partial C_b}{\partial t} = K_{on} C_u - K_{off} C_b$$

Onde C_b e C_u são as concentrações de solutos ligados e não ligados, D é o coeficiente de difusão se o soluto não ligado (soluto ligado é assumido imóvel, ou a sua difusão é tão lenta que pode ser negligenciada) e K_{on} e K_{off} são as quantidades de constantes ligadas e não ligadas.

Tomando a transformada de Laplace destas equações e expressões de \hat{C}_b e \hat{C}_u temos:

$$(44) \quad D \frac{\partial^2 \hat{C}_u}{\partial x^2} = \left(s + \frac{sK_{on}}{s+K_{off}} \right) \hat{C}_u$$

A única diferença entre a equação de difusão simples no domínio Laplace é que s é substituído pela função $g(s)$, onde:

$$(45) \quad g(s) = s + \frac{sK_{on}}{s+K_{off}}$$

Assim as equações para a concentração não ligada e o fluxo através do estrato córneo podem ser definidos pela substituição de s por $g(s)$ nas equações anteriores[92, 113].

Estudos de marca de Hadgraft e os seus colaboradores[95, 96] e Guy e Hadgraft [66] tornaram-se os pioneiros no uso da transformada de Laplace para a modelagem matemática do transporte da pele. Recentemente Anissimov e Roberts[113] seguindo estas ideias usaram a inversão numérica de soluções da transformada de Laplace para a equação de difusão em simulações e análise de dados de experiências de transporte da pele. Bando e a sua equipa[114, 115] desenvolveram um modelo de difusão de duas camadas na qual incorpora ambos as vias polares e não polares, e as equações da transformada de Laplace foram obtidas para descrever a permeação na pele de um fármaco ou substância[92].

1.5. Teoria de partícula em escala

Há três parâmetros que são necessários para prever a permeabilidade da pele. São eles o coeficiente de partição, coeficiente de difusão e o comprimento do percurso. O coeficiente de partição envolve a partição entre múltiplas fases, matriz lipídica do estrato córneo e o veículo, queratinócitos e o veículo, os lípidos e os queratinócitos e entre o estrato córneo e as camadas mais internas da pele. O coeficiente de partição entre o estrato córneo e o veículo é estimado a partir de algoritmos da atividade da estrutura relativas a medições experimentais:

$$(46) \quad K_{SC/v} = aP^b$$

a foi classificado para estar perto de 1, enquanto que b varia entre 0.4 e 0.9 dependendo do conjunto de dados usados na regressão.

Para estimar $K_{SC/v}$ foram derivadas expressões que consideram contribuições individuais de lípidos e queratinócitos[92, 116].

$$(47) \quad K_{SC/v} = \Phi_{lip}K_{lip/v} + \Phi_{cor}K_{cor/v}$$

Onde $K_{lip/v}$ é o coeficiente de partição entre lípido e veículo, $K_{lip/v}$ é o coeficiente de partição entre queratinócitos e veículo e Φ_{lip} e Φ_{cor} são as frações de volume de lípidos e queratinócitos no estrato córneo respectivamente, que em conjunto somam para 1.

A teoria de partículas em escala tem sido usada para simplificar a utilização de detalhes moleculares das estruturas predizendo a permeabilidade da pele[117]. Existem dois fatores de soluto particionando em bicamadas lipídicas. São eles um fator químico e um físico. No fator químico, a camada lipídica é mais hidrofóbica que as condições aquosas circundantes e no fator físico, as cadeias lipídicas na bicamada são altamente organizadas, reduzindo assim o coeficiente de partição[92, 118, 119].

A teoria mostrou que o coeficiente de partição de um soluto de água para dentro dos lípidos do estrato córneo é comparável a um solvente isotrópico. Assim a Teoria razoavelmente imita o ambiente químico nos lípidos do estrato córneo. Vários solventes foram utilizados como modelos para os lípidos do estrato córneo (Octanol, hexadecano, azeite, butadieno e dodecadieno). O mais conveniente parece ser o octanol[92, 116, 120-125].

Mitragotri e os seus colaboradores também usaram esta teoria. Eles desenvolveram uma equação para descrever difusão de soluto na bicamada lipídica. A teoria calcula o coeficiente de difusão baseado na quantidade de trabalho requerido criando um volume livre para permitir a difusão do soluto[92].

1.6. Modelo da membrana homogénea

A Geometria do estrato córneo e o arranjo detalhado dos queratinócitos e dos lípidos faz uma grande diferença nos cálculos do modelo, como isso afeta o comprimento do caminho para a difusão, o fator da tortuosidade lipídica é importante[123, 126, 127]. Uma vez que a difusão é primeiramente transcelular, então o fator da tortuosidade é de segunda importância. Sendo o transporte da fase de queratinócitos reduzida o impacto da tortuosidade lipídica aumenta [92].

Frasch e Barbero estudaram a difusão transitória através do modelo de estruturas do estrato córneo incluindo ambas as fases de queratinócitos ordenados e desordenados[128]. Eles descobriram que a difusão foi bem descrita por um modelo de membrana homogénea; no entanto, o coeficiente de difusão efetiva D^* , e o comprimento de difusão efetivo para a estrutura ordenada, h_{SC}^* , eram diferentes das variáveis de entrada[92, 128]. h_{SC}^* é dado por:

$$(48) \quad h_{SC}^* = N(d + t + g)$$

O valor de D^* não foi expresso tão compacto. As expressões do fluxo e do tempo de atrasado relativo para uma membrana homogénea tendo a mesma difusividade lipídica D_0 e espessura h_0 .

$$(49) \quad \frac{J_0}{J^*} = 1 + \frac{\alpha\Phi}{\sigma} + \frac{\alpha^2\Phi^2}{4(1-\Phi)}$$

e

$$(50) \quad \frac{t_{lag*}}{t_{lag0}} = \frac{\sigma(1+\alpha\Phi)}{\alpha} \left(1 + \frac{\alpha\Phi}{\sigma} + \frac{\omega}{(1+\omega^2)} \frac{\alpha^2\Phi^2}{(1-\Phi)} \right)$$

Onde $\alpha = d/t$ é a relação de aspeto do queratinócito representado pela divisão do comprimento d pela espessura t do queratinócito; $\sigma = s/t$, $\Phi = t/(t + g)$ e $\omega = d_L/d_s$ é a relação de compensação. O fluxo e o tempo de desfaseamento relativo são estimados usando um fluxo macroscópico/ tempo de desfaseamento e pelo fluxo

efetivo/temo de desfasamento[92]. As equações (48) e (50) foram validadas para lípidos isotrópicos e queratinócitos impermeáveis[128]. Um diagrama da estrutura ordenada é representado na figura 8.

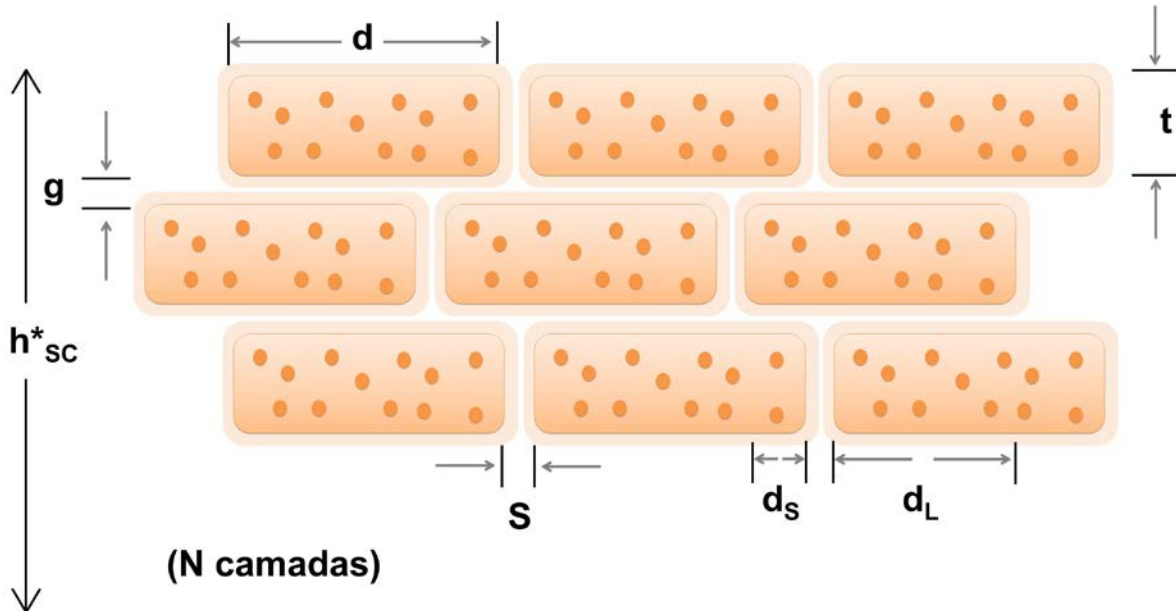


Figura 8 - Diagrama esquemático do modelo de estrutura ordenada: h^*_{sc} . Comprimento caminho de difusão efetivo para estrutura ordenada; d, d_s e d_L , Comprimento; t , espessura; g e s , espaço entre corneócitos.

2. Estudos computacionais sobre a adsorção e interação das moléculas da Leptina em superfícies de ouro

Sendo a leptina um controlador central do metabolismo agindo a partir da ativação de dois recetores específicos, o ObRb e o ObRa, torna-se um bom modelo farmacológico no tratamento da obesidade. Assim através do estudo da adsorção dos ligandos do anticorpo monoclonal antagonista do recetor da leptina no ouro e as suas condições, é possível averiguar quais as possibilidades de nanotransportadores de ouro que atuem ao nível da entrega de fármacos direcionados para a leptina.

Abaixo está representado o desenho obtido pelo *Gabedit*, de cada molécula em estudo. De cada uma destas moléculas foi extraída uma matriz de coordenadas, a Matriz Z,

que indicará as coordenadas dos átomos constituintes através das distâncias, ângulos e diedros internos.

2.1. Acetato

O acetato, também conhecido como etanoato, é expresso pela fórmula química $C_2H_3O_2$, podendo ser um ião de um sal orgânico, éster ou base conjugada do ácido acético[129].

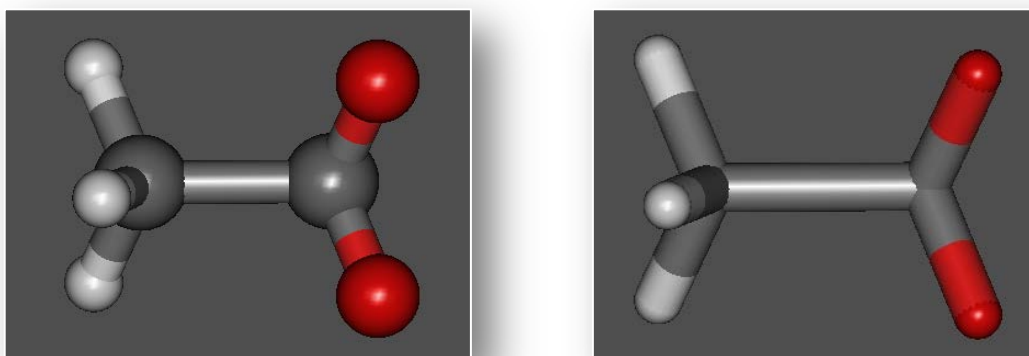


Figura 9 - Estrutura 3D não otimizada do acetato, desenhada pelo *Software Gabedit*.

C						
C	1	1.339775				
H	2	2.090865	1	26.303947		
H	3	1.853270	2	63.722277	1	0.039189
O	4	3.040715	3	52.413204	2	0.013085
O	5	1.853218	4	52.443087	3	179.990197
H	6	2.401439	5	67.284212	4	32.170970

Figura 10 - Matriz Z do acetato produzido pelo *Gabedit*.

Os resultados do acetato: estrutura 3D (figura 9) e matriz Z (figura 10) obtido pelo *Gabedit*.

2.2. Arginina

A arginina é designada por ácido 2-amino-5-(diaminometilideno-amino)pentanóico e representada pela fórmula química $C_6H_{15}N_4O_2$, sendo um dos aminoácidos codificados

pelo código genético, sendo portanto um dos componentes das proteínas dos seres vivos. Em proteínas a arginina tem um caracter anfipático, uma vez que parte da sua cadeia lateral é hidrofóbica. A síntese de arginina ocorre principalmente no eixo intestinal-renal e é usado no tratamento de carência ou desequilíbrio alimentar[130].

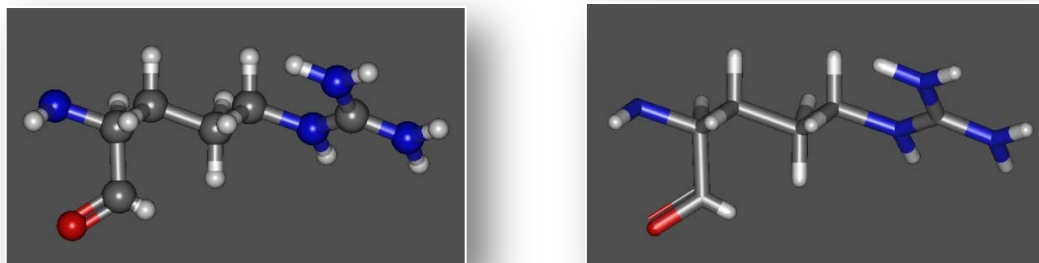


Figura 11 - Estrutura 3D não otimizada da arginina, desenhada pelo *Software Gabedit*.

N					
H	1	1.009222			
C	2	2.023152	1	42.489072	
H	3	1.090162	2	134.798213	1
C	4	2.154853	3	41.563275	2
O	5	1.230031	4	129.696815	3
C	6	3.418783	5	31.938000	4
H	7	1.090043	6	142.091942	5
H	8	1.780999	7	35.215047	6
C	9	2.149524	8	65.526114	7
H	10	1.090000	9	93.882972	8
H	11	1.780191	10	35.259239	9
C	12	2.149868	11	65.545458	10
H	13	1.089649	12	94.267446	11
H	14	1.786259	13	34.994817	12
N	15	2.098947	14	65.232760	13
H	16	1.009690	15	128.636832	14
C	17	2.017147	16	35.360599	15
N	18	1.330863	17	148.133778	16
H	19	1.009534	18	119.760153	17
H	20	1.751722	19	29.813012	18
N	21	2.512774	20	96.287248	19
H	22	1.009592	21	173.541322	20
H	23	1.751937	22	29.853406	21
H	24	7.832502	23	41.634129	22
					14.602228

Figura 12 – Matriz Z da arginina produzido pelo *Gabedit*.

Os resultados da arginina: estrutura 3D (figura 11) e matriz Z (figura 12) obtido pelo *Gabedit*.

2.3. L-serina e D-serina

A serina, segundo a nomenclatura IUPAC, Ácido 2-Amino-3-hidroxi-3-propanoico, apresenta a fórmula química $C_3H_7NO_3$. É um aminoácido constituinte das proteínas, não essencial. A serina é indispensável na formação de fosfolípidos e fosfoglicerídeos, compostos de grande importância metabólica especialmente no cérebro. A L-serina é a forma comum e pode transformar-se em D-serina, que é um neuromodulador do recetor N-metil-D-aspartato (NMDA), implicado no desenvolvimento do sistema nervoso, na plasticidade cerebral e na neurodegenerescência. A D-serina está presente no período perinatal, no cérebro[131].

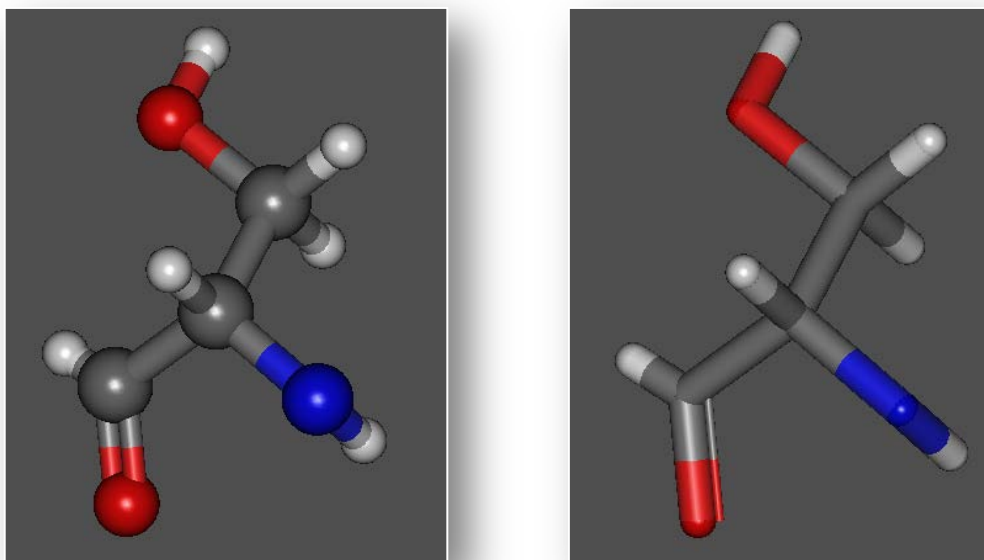


Figura 13 - Estrutura 3D não otimizada da L-serina, desenhada pelo Software Gabedit.

N						
H	1	1.009222				
C	2	2.023152	1	42.489072		
H	3	1.090162	2	134.798213	1	-0.005013
C	4	2.154853	3	41.563275	2	-120.680042
O	5	1.230031	4	129.696815	3	81.397264
C	6	3.418783	5	31.938000	4	-76.022037
H	7	1.090043	6	142.091942	5	112.730216
H	8	1.780999	7	35.215047	6	96.566352
O	9	2.066431	8	64.494234	7	38.679639
H	10	0.960859	9	93.190306	8	91.499798
H	11	3.496253	10	22.085234	9	66.337964

Figura 14 – Matriz Z da L-serina produzida pelo Gabedit.

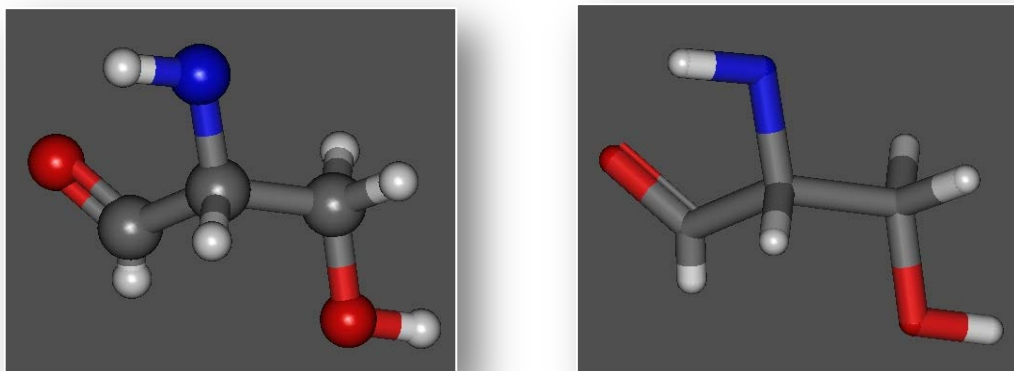


Figura 15 - Estrutura 3D não otimizada da D-serina, desenhada pelo *Software Gabedit*.

N					
H	1	1.009222			
C	2	2.023152	1	42.489072	
H	3	1.090162	2	91.669959	1
C	4	2.154853	3	41.563275	2
O	5	1.230031	4	129.696815	3
C	6	3.418422	5	31.928305	4
H	7	1.090771	6	78.590831	5
H	8	1.780999	7	35.234403	6
O	9	2.067666	8	64.493097	7
H	10	0.960660	9	93.086767	8
H	11	3.495678	10	22.147466	9
					123.913508
					96.627230
					-81.397264
					75.998851
					139.984122
					141.523529
					38.711983
					91.423991
					-117.177119

Figura 16 - Matriz Z da D-serina produzida pelo *Gabedit*.

Os resultados da L-serina e da D-serina: estrutura 3D (figura 13 e 15) e matriz Z (figura 14 e 16) obtido pelo *Gabedit*.

2.4. Etilenoglicol

O etilenoglicol é um álcool com a fórmula química $C_2H_6O_2$ e segundo a IUPAC designado por Etano-1,2-diol. É um composto utilizado como anticongelante e tóxico, pelo que a sua ingestão deve ser considerada uma emergência médica[132].

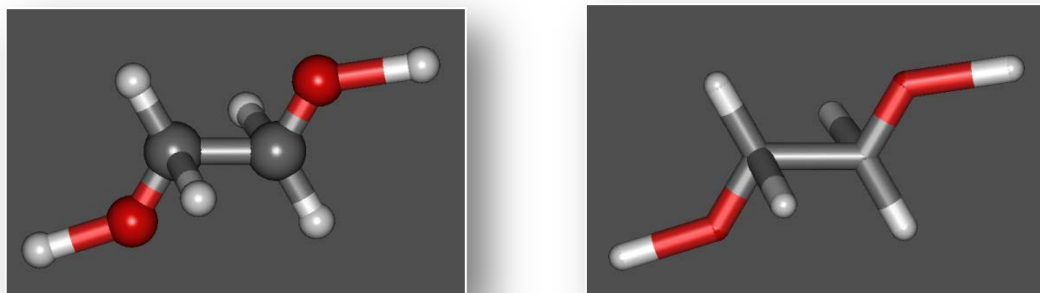


Figura 17 - Estrutura 3D não otimizada do etilenoglicol, desenhada pelo *Software Gabedit*.

C	1	1.620357				
C	2	1.409186	1	40.605902		
H	3	1.474826	2	125.173743	1	18.342938
H	4	3.021380	3	25.887152	2	46.087792
O	5	1.708184	4	94.734814	3	-71.066038
H	6	2.227764	5	86.613819	4	11.104606
H	7	1.946976	6	45.866170	5	-76.106134
H	8	3.689753	7	50.618317	6	135.828085
H	9	5.664003	8	20.612040	7	-53.656881

Figura 18 - Matriz Z do etilenoglicol produzida pelo *Gabedit*.

Os resultados do etilenoglicol: estrutura 3D (figura 17) e matriz Z (figura18) obtido pelo *Gabedit*.

2.5. Glutamato

O glutamato ou ácido glutâmico, é um dos aminoácidos não essenciais codificados pelo código genético, sendo um dos componentes das proteínas dos seres vivos. Segundo a IUPAC é designado ácido (2S)-2-aminopentanodióico sendo a sua fórmula química $C_5H_9NO_4$. O Glutamato ajuda no controlo do desejo do açúcar[133].

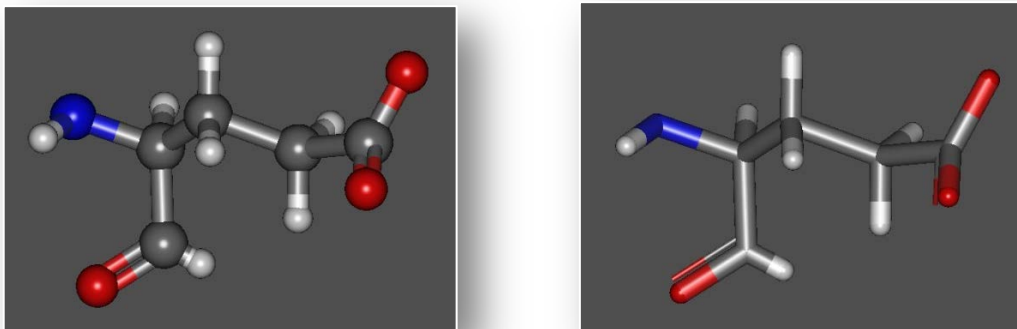


Figura 19 - Estrutura 3D não otimizada do glutamato, desenhada pelo Software Gabedit.

N						
H	1	1.009222				
C	2	2.023152	1	42.489072		
H	3	1.090162	2	134.798213	1	-0.005013
C	4	2.154853	3	41.563275	2	-120.680042
O	5	1.230031	4	129.696815	3	81.397264
C	6	3.418783	5	31.938000	4	-76.022037
H	7	1.090043	6	142.091942	5	112.730216
H	8	1.780999	7	35.215047	6	96.566352
C	9	2.136068	8	65.386220	7	39.326014
H	10	1.090000	9	93.788862	8	-158.540365
H	11	1.780691	10	35.282405	9	144.775704
C	12	2.152146	11	65.557970	10	39.639114
O	13	1.260094	12	140.299151	11	10.729225
O	14	2.241147	13	27.174542	12	158.207789
H	15	5.036681	14	61.095229	13	0.544970

Figura 20 - Matriz Z do glutamato produzida pelo Gabedit.

Os resultados do glutamato: estrutura 3D (figura 19) e matriz Z (figura 20) obtido pelo Gabedit.

2.6. Histidina

A histidina é um dos aminoácidos codificados pelo código genético, ou seja, um dos componentes das proteínas dos seres vivos. A histidina tem a fórmula química $C_6H_9N_3O_2$ e designada por ácido (S)-2-amino-3-(3H-imidazol-4-yl)propanóico segundo a nomenclatura da IUPAC. Apresenta elevada importância na ligação do centro ativo de proteínas com os seus substratos e portanto pode ser encontrada na maioria dos sítios ativos das enzimas[134].

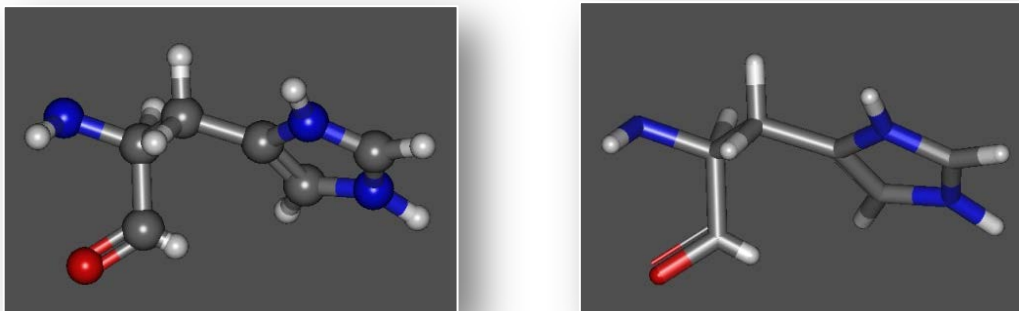


Figura 21 - Estrutura 3D não otimizada da histidina, desenhada pelo *Software Gabedit*.

N					
H	1	1.009222			
C	2	2.023152	1	42.489072	
H	3	1.090162	2	134.798213	1
C	4	2.154853	3	41.563275	2
O	5	1.230031	4	129.696815	3
C	6	3.418783	5	31.938000	4
H	7	1.088895	6	140.598362	5
H	8	1.802434	7	34.176710	6
C	9	2.086307	8	66.184459	7
N	10	1.390553	9	105.721063	8
H	11	1.008726	10	126.044596	9
C	12	3.180579	11	12.200545	10
H	13	1.090083	12	158.453511	11
C	14	3.237451	13	12.687938	12
H	15	1.089826	14	154.944702	13
N	16	2.136349	15	29.968789	14
H	17	1.010167	16	100.426240	15
H	18	4.414977	17	49.873886	16
					156.996318

Figura 22 - Matriz Z da histidina produzida pelo *Gabedit*.

Os resultados da histidina: estrutura 3D (figura 21) e matriz Z (figura 22) obtido pelo *Gabedit*.

2.7. Prolina

A prolina é um dos aminoácidos codificados pelo código genético. Diferencia-se dos demais aminoácidos devido à sua estrutura coesa e rígida. É representado pela fórmula química $C_5H_9NO_2$ e designado por ácido (*S*)-Pirrolidina-2-carboxílico segundo a nomenclatura da IUPAC. A prolina é importante na manutenção da pele jovem bem como reparação do músculo, tecido conjuntivo e danos da pele [135].

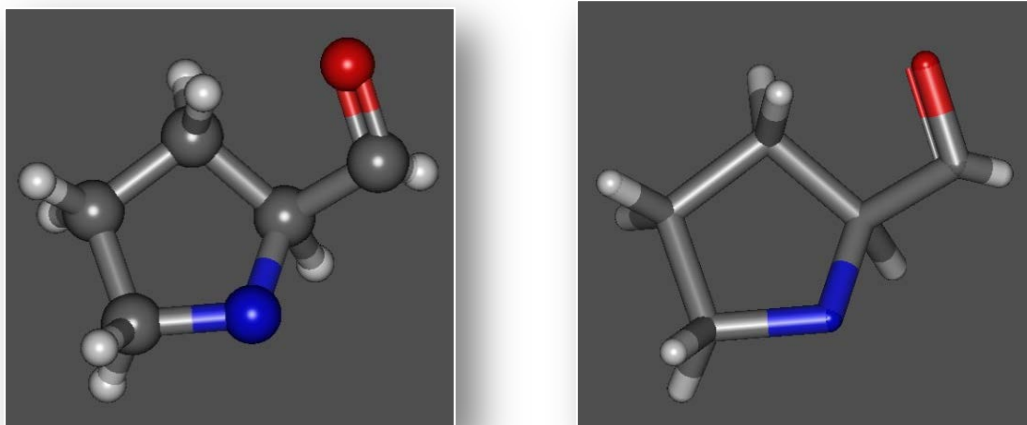


Figura 23 - Estrutura 3D não otimizada da prolina, desenhada pelo *Software Gabedit*.

N					
C	1	1.494868			
H	2	1.088174	1	111.851850	
C	3	2.087028	2	44.150538	1
O	4	1.270537	3	150.080609	2
C	5	2.996260	4	56.438757	3
H	6	1.089316	5	59.772115	4
H	7	1.762935	6	35.860043	5
C	8	2.187816	7	66.261724	6
H	9	1.088204	8	84.211631	7
H	10	1.794909	9	34.435496	8
C	11	2.161596	10	65.463228	9
H	12	1.088747	11	82.826059	10
H	13	1.757787	12	36.080545	11
H	14	4.841684	13	83.725139	12
					23.688492

Figura 24 – Matriz Z da prolina produzida pelo *Gabedit*.

Os resultados da prolina: estrutura 3D (figura 23) e matriz Z (figura 24) obtido pelo *Gabedit*.

Posteriormente seria necessária a otimização das estruturas no *Gaussian* e para tal utilizaram-se instruções como a que se segue (neste caso, o exemplo de um *dat. file* para o acetato):

```
Exemplo de dat.file para otimizar as estruturas):
%nproc=8
%mem=500MB
%chk=opt_acetato_agonist
#B3LYP/6-31G**opt=(maxcyc=500)scf=(maxcyc=500)TEST

Otimização de acetato

O 2
C
C 1 dist1
H 2 dist2 1 ang1
H 3 dist3 2 ang2 1 died1
O 4 dist4 3 ang3 2 died2
O 5 dist5 4 ang4 3 died3
H 6 dist6 5 ang5 4 died4

dist1 1.339775
dist2 2.090865
ang1 26.303947
dist3 1.853270
ang2 63.722277
died1 0.039189
dist4 3.040715
ang3 52.413204
died2 0.013085
dist5 1.853218
ang4 52.443087
died3 179.990197
dist6 2.401439
ang5 67.284212
died4 32.170970
```

Figura 25 – Instruções do *dat.file* para o acetato.

Capítulo V:

Discussão

1. Discussão

O principal objetivo deste estudo foi analisar, recorrendo à química teórica e computacional, a absorção dérmica das moléculas da leptina. Este trabalho exigiu uma extensa análise sobre os métodos matemáticos e teóricos de difusão dérmica, resultando num artigo (presente neste trabalho) apresentado à revista *Journal of Controlled Release*, recentemente aceite para publicação, permitindo uma visão transversa e profunda sobre o tema. Esta etapa foi fundamental para contextualizar as vantagens e o carácter do estudo de nanotransportadores metálicos de ligandos do anticorpo monoclonal antagonista do recetor da leptina como terapia.

Inserido no trabalho do grupo de pesquisa, optou-se por utilizar oito ligandos: acetato, arginina (ácido 2-amino-5-(diaminometilideno-amino)pentanóico), D-serina e L-serina (ácido 2-Amino-3-hidroxiopropanóico), etilenoglicol (etano-1,2-diol), glutamato (ácido (2S)-2-aminopentanodióico), histidina (ácido (S)-2-amino-3-(3H-imidazol-4-yl)propanóico) e prolina (ácido (S)-Pirrolidina-2-carboxílico), desenhando os compostos no *Software Gabedit*. O *Gabedit* permite desenhar moléculas por átomo ou fragmento, possuindo uma base de dados com mais de 100 fragmentos disponíveis (moléculas lineares, moléculas de anel, polipéptidos, entre outros). É importante verificar todas as estruturas, para examinar se todos os títulos e átomos estão nas posições corretas, uma vez que esta etapa irá condicionar todos os outros resultados.

Depois de todos as moléculas serem corretamente desenhadas, obtiveram-se as Matriz Z dos compostos, e conseqüentemente o ficheiro *input* do *software Gaussian*. Os mesmos encontram-se em fase de cálculo presentemente, perspetivando-se boas possibilidades de se manter um ritmo viável de conclusão positiva das várias fases de pesquisa computacional já mencionadas.

Capítulo VI:

Conclusão

1. Conclusão

Os modelos teóricos são muito importantes quando estamos face a uma nano e uma micropesquisa. A modelação matemática da pele tem sofrido notável progresso nas últimas décadas. Devido a avanços da informação tecnológica a precisão destes modelos aumenta e eles tornam-se mais fáceis de aplicar. Seria mais favorável utilizar uma única teoria geral aplicável a qualquer tipo de sistema de entrega de fármaco, no entanto, existe um amplo espectro de modelos matemáticos diferentes, aplicáveis a diferentes tipos de dispositivos que diferem na geometria, no tipo de fármaco e excipiente.

As leis de Fick usam o conceito da difusão passiva para descrever a entrega de fármaco através da pele, o fármaco entra para as camadas mais profundas da pele através da difusão passiva e este conceito é o principal princípio usado nos modelos matemáticos.

A permeabilidade da pele é descrita por três parâmetros: coeficiente de partição, coeficiente de difusão e o comprimento do percurso. O primeiro envolve a repartição entre múltiplas fases: o estrato córneo e o veículo, lípidos, queratinócitos entre outros. O coeficiente de partição é também chamado pelo coeficiente de permeabilidade e sua estimativa através dos modelos matemáticos pode ser usada para prever a massa do fármaco que penetra a pele a partir de uma determinada exposição.

Existem dois grandes desafios na frente da pesquisa transdérmica teórica. O primeiro grande desafio seria combinar as teorias matemáticas com modelos quantificando o transporte do fármaco no organismo vivo, incluindo a distribuição do fármaco em vários órgãos e mesmo dentro de diferentes compartimentos celulares. O segundo grande desafio diz respeito a realização de um modelo computacional da pele que pode validar os princípios moleculares na difusão dérmica como um plano de dispositivos futuros.

No que diz respeito à obesidade, a pesquisa da literatura revela que a leptina tem uma enorme ação no sistema nervoso central (hipotálamo) com a redução da ingestão alimentar e aumento do gasto energético, e a regulação do metabolismo da glicose e dos lípidos.

A sua sinalização no hipotálamo estimula a produção de neuropeptídeos anorexigénicos, como POMC, α MSH, CART que diminuem a ingestão alimentar pela sensação de saciedade. Por outro lado esses neuropeptídeos também inibem a produção do NPY, que tem como função estimular a ingestão de alimentos. Para além de diminuir a

ingestão alimentar a leptina estimula o gasto energético, através do estímulo das ações da norepinefrina e a lipólise no tecido adiposo.

Pelo referido anteriormente, a leptina torna-se uma molécula relevante para os estudos de novos tratamentos da obesidade, contudo, o seu grande tamanho dificulta a sua análise. Portanto, a necessidade de recorrer a alternativas é fundamental, o que levou à análise dos aminoácidos da leptina.

Os estudos experimentais das moléculas fornecem uma valiosa informação sobre as suas características, no entanto é fundamental uma compreensão profunda das moléculas. Assim, os métodos de química teórica foram introduzidos como um novo caminho, barato, e eficaz para realizar a caracterização preliminar das moléculas.

Os *softwares* usados para analisar os aminoácidos da leptina são o *Gabedit* e o *Gaussian*. *Softwares* de química computacional que permite a determinação de um largo número de características dos compostos como o cálculo de energias, geometrias, frequências vibracionais, estados de transição, estados excitados e um número de propriedades baseadas em funções de onde correlacionadas e não correlacionadas.

No presente estudo, o *Gabedit* provou ser um método útil para criar os compostos e extrair a matriz *Z*, bem como na fase preliminar de escrever os ficheiros *dat.* do *Gaussian*.

Há a esperança de que o presente trabalho nos permitirá averiguar quais as possibilidades de nanotransportadores de ouro atuarem ao nível da entrega de fármacos direcionados para a leptina, através do estudo da adsorção dos ligandos do anticorpo monoclonal antagonista do recetor da leptina no ouro.

Assim sendo, como perspetivas futuras, pretende-se realizar o cálculo das condições de adsorção desses aminoácidos em todos os sites de superfícies elementares de ouro, Au (100) (110) e (111) já preparadas.

Referências Bibliográficas

1. Korner, J. and L.J. Aronne, *The emerging science of body weight regulation and its impact on obesity treatment*. The Journal Of Clinical Investigation, 2003. **111**(5): p. 565-570.
2. Kaila B and R. M., *Obesity: a review of pathogenesis and management strategies*. Can J Gastroenterol., 2008. **22** (1): p. 61-8.
3. Das, U.N., *Obesity: Genes, brain, gut, and environment*. Nutrition, 2010. **26**(5): p. 459-473.
4. Aballay, L.R., et al., *Overweight and obesity: Prevalence and their association with some social characteristics in a random sample population-based study in Córdoba city, Argentina*. Obesity Research & Clinical Practice, 2009. **3**(2): p. 75-83.
5. Joana, S., I. Loureiro, and I. do Carmo, *A obesidade infantil: um problema emergente*. 2008.
6. Davies, G.A.L., et al., *Obesity in Pregnancy: No. 239, February 2010*. International Journal of Gynecology & Obstetrics, 2010. **110**(2): p. 167-173.
7. Boné, M. and J. Bonito, *Sobrepeso e obesidade na infância e na adolescência. A importância do fator ambiental: análise comparativa*. 2011.
8. Tsigos, C., et al., *Management of Obesity in Adults: European Clinical Practice Guidelines*. The European Journal of Obesity, 2008: p. 106-116.
9. Ribeiro, S., *Tese de mestrado em Medicina - Obesidade Infantil*. 2008, Universidade da Beira Interior. p. 102.
10. *Obesity and overweight*. 2013, World Health Organization available from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>.
11. Small, C.J. and S.R. Bloom, *Gut hormones as peripheral anti obesity targets*. Current Drug Targets. CNS And Neurological Disorders, 2004. **3**(5): p. 379-388.
12. Adan, R.A.H., L.J.M.J. Vanderschuren, and S. E. la Fleur, *Anti-obesity drugs and neural circuits of feeding*. Trends in Pharmacological Sciences, 2008. **29**(4): p. 208-217.
13. Ellacott, K.L. and R.D. Cone, *The role of the central melanocortin system in the regulation of food intake and energy homeostasis: lessons from mouse models*. Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences, 2006. **361**(1471): p. 1265-1274.
14. O. Dietrich, M. and T. L. Horvath, *Limitations in anti-obesity drug development: the critical role of hunger-promoting neurons*. Nature Reviews Drug Discovery, 2012.
15. Cevc, G. and U. Vierl, *Nanotechnology and the transdermal route: A state of the art review and critical appraisal*. Journal of Controlled Release, 2010. **141**(3): p. 277-299.
16. van der Maaden, K., W. Jiskoot, and J. Bouwstra, *Microneedle technologies for (trans)dermal drug and vaccine delivery*. Journal of Controlled Release, 2012. **161**(2): p. 645-655.
17. Elias, P., *Epidermal lipids, barrier function, and desquamation*. J. Invest. Dermatol., 1983. **80**: p. 44s-49s.

18. Arora, A., M.R. Prausnitz, and S. Mitragotri, *Micro-scale devices for transdermal drug delivery*. International Journal of Pharmaceutics, 2008. 364(2): p. 227-236.
19. Mikszta, J.A. and J.B. Alarcon, *Improved genetic immunization via micromechanical disruption of skin-barrier function and targeted epidermal delivery*. Nat. Med., 2002. 8: p. 415-419.
20. Gupta, J., E.I. Felner, and M.R. Prausnitz, *Minimally Invasive Insulin Delivery in Subjects with Type 1 Diabetes Using Hollow Microneedles*. Diabetes technology & therapeutics, 2009. 11.
21. R. Potts, et al., *Strategies to enhance permeability via stratum corneum lipid pathways*. Adv. Lipid Res., 1991. 24: p. 173-210.
22. J. Kanitakis, *Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin*. Eur. J. Dermatol., 2002. 12 (4): p. 390-399.
23. E. N. Marieb, *Human Anatomy and Physiology*. 2004, Dayl Fox,.
24. S. M. Bal, et al., *Advances in transcutaneous delivery: do all ways lead to rome?* J. Control. Release, 2010. 148 (3): p. 266-282.
25. T. Tanner and R. Marks, *Delivering drugs by the transdermal route: review and comment*. Skin. Res. Technol., 2008. 14 (3): p. 249-260.
26. G. Chopda, *Transdermal Drug Delivery Systems: A Review*. 2006: available from <http://www.pharmainfo.net/reviews/transdermal-drug-delivery-systems-review>.
27. R.K.Subedi, et al., *Recent advances in transdermal drug delivery*. Arch. Pharm. Res., 2010. 33 (3): p. 339-351.
28. Ferreira, F., J.A. Mota, and J. Duarte, *Prevalência de excesso de peso e obesidade em estudantes adolescentes do distrito de Castelo Branco: um estudo centrado no índice de massa corporal, perímetro da cintura e percentagem de massa gorda*. Revista Portuguesa de Saúde Pública, 2012. 30(1): p. 47-54.
29. Snyder, E.E., et al., *The Human Obesity Gene Map: The 2003 Update*. Obesity Research, 2004. 12(3): p. 369-439.
30. Schadt, E.E., et al., *Genetics of gene expression surveyed in maize, mouse and man*. Nature, 2003. 422(6929): p. 297-302.
31. Clement, K. and P. Ferre, *Genetics and the Pathophysiology of Obesity*. Pediatr Res, 2003. 53(5): p. 721-725.
32. IOTF, *The Global Epidemic*. 2010: International Obesity TaskForce. Available from <http://www.iaso.org/iotf/obesity/obesitytheglobalepidemic/>.
33. IOTF. *Childhood obesity report*. 2004.
34. do Carmo I, d.S.O., Camolas J, Vieira J, Carreira M, Medina L, Reis L, Myatt J, & Galvão-Teles A., *Overweight and obesity in Portugal: national prevalence in 2003–2005*. 2007: Obesity Reviews 2007: Available from <http://www.iaso.org/resources/world-map-obesity/?map=adults>.
35. Do Carmo, I., et al., *Overweight and obesity in Portugal: national prevalence in 2003–2005*. Obesity Reviews, 2008. 9(1): p. 11-19.
36. SARDINHA LB , S.R., VALE S, SILVA AM, FERREIRA JP, RAIMUNDO AM, MOREIRA H, BAPTISTA F & MOTA J., *A study in a representative sample of 10 – 18-year-old children and adolescents*. 2010: International Journal of Paediatric Obesity. Available from <http://www.iaso.org/resources/world-map-obesity/?map=children>.

37. Fernández-López, J.A., et al., *Pharmacological Approaches for the Treatment of Obesity*. *Drugs*, 2002. 62(6): p. 915-944.
38. Coupe, B. and S.G. Bouret, *Development of the Hypothalamic Melanocortin System*. *Frontiers in Endocrinology*, 2013. 4.
39. Cone, R.D., *Studies on the physiological functions of the melanocortin system*. *Endocr.Rev.*, 2006. 27: p. 736-749.
40. Belgardt, B.F. and J.C. Brüning, *CNS leptin and insulin action in the control of energy homeostasis*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2010. 1212(1): p. 97-113.
41. Kennett, G.A. and P.G. Clifton, *New approaches to the pharmacological treatment of obesity: Can they break through the efficacy barrier?* *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 2010. 97(1): p. 63-83.
42. Lett, T.A.P., et al., *Pharmacogenetics of antipsychotic-induced weight gain: review and clinical implications*. *Mol Psychiatry*, 2012. 17(3): p. 242-266.
43. Parker, E., M. Van Heek, and A. Stamford, *Neuropeptide Y receptors as targets for anti-obesity drug development: perspective and current status*. *European Journal of Pharmacology*, 2002. 440(2-3): p. 173-187.
44. Seeley, R.J., et al., *Melanocortin receptors in leptin effects*. *Nature* 390, 349. (doi:10.1038/37016), 1997.
45. Elias, C.F., et al., *Leptin differentially regulates NPY and POMC neurons projecting to the lateral hypothalamic area*. *Neuron*, 1999. 23: p. 775-786 (doi:10.1016/S0896-6273(01)80035-0).
46. Munzberg, H., et al., *Role of signal transducer and activator of transcription 3 in regulation of hypothalamic proopiomelanocortin gene expression by leptin*. *Endocrinology*, 2003. 144: p. 2121-2131. (doi:10.1210/en.2002-221037).
47. Neto, B.G. and J.C. Pareja, *Mecanismos hormonais do controle de peso corporal e suas possíveis implicações para o tratamento da obesidade / Hormonal mechanisms in body weight regulation and therapeutic implications*. 2006, Einstein (São Paulo). p. S18-S22.
48. Boggiano, M.M., et al., *PYY3-36 as an anti-obesity drug target*. *Obesity Reviews: An Official Journal Of The International Association For The Study Of Obesity*, 2005. 6(4): p. 307-322.
49. Rachel L. Batterham, M.B., B.S., Mark A. Cohen, M.B., Ch.B., et al., *Inhibition of Food Intake in Obese Subjects by Peptide YY3-36* *The new england journal of medicine*, 2003.
50. Asakawa, A., et al., *Characterization of the effects of pancreatic polypeptide in the regulation of energy balance*. *Gastroenterology*, 2003. 124(5): p. 1325-1336.
51. Lacerda, I.M.d.C., *Grelina - Uma nova e promissora hormona*. Faculdade de ciências da nutrição e alimentação.
52. Stead, L.F., et al., *Nicotine replacement therapy for smoking cessatio*. *Cochrane Database Syst Rev.*, 2012. 11:CD000146.
53. Desai, P., R.R. Patlolla, and M. Singh, *Interaction of nanoparticles and cell-penetrating peptides with skin for transdermal drug delivery*. *Molecular Membrane Biology*, 2010. 27(7): p. 247-259.

54. Fonseca, S.B., M.P. Pereira, and S.O. Kelley, *Recent advances in the use of cell-penetrating peptides for medical and biological applications*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2009. 61(11): p. 953-964.
55. Teo MA, et al., *In vitro and in vivo characterization of MEMS microneedles*. *Biomed Microdevices*, 2005. 7(1): p. 47-52.
56. Valenzuela, P. and J.A. Simon, *Nanoparticle delivery for transdermal HRT*. *Maturitas*, 2012. 73(1): p. 74-80.
57. Roberts, M.S., Cross, S.E., Pellett, M.A., *Skin transport*. In: Walters, K.A. (Ed.), *Dermatological and Transdermal Formulations*. Marcel Dekker, New York, 2002: p. 89-195.
58. Torin Huzil, J., et al., *Drug delivery through the skin: molecular simulations of barrier lipids to design more effective noninvasive dermal and transdermal delivery systems for small molecules, biologics, and cosmetics*. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 2011. 3(5): p. 449-462.
59. Prow, T.W., et al., *Nanoparticles and microparticles for skin drug delivery*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2011. 63(6): p. 470-491.
60. R.T. Tregear, *The permeability of mammalian skin to ions*. *J. Invest. Dermatol.*, 1966. 46: p. 16-23.
61. P, D., P. RR, and S. M., *Interaction of nanoparticles and cellpenetrating peptides with skin for transdermal drug delivery*. *Mol Membr Biol*, 2010. 27(7): p. 247-59.
62. R.O. Potts, R.H.G., A predictive algorithm for skin permeability: the effects of and P.R. molecular size and hydrogen bond activity.
63. M.S. Roberts and K.A. Walters, *Dermal Absorption and Toxicity Assessment*. Marcel Dekker, New York, 1998.
64. Ching, T.S. and P. Connolly, *Simultaneous transdermal extraction of glucose and lactate from human subjects by reverse iontophoresis*. *International journal of Nanomedicine*, 2008. 3 (2): p. 211-223.
65. P, C., C. C, and M. F, Opportunities at the skin interface for continuous patient monitoring: a reverse iontophoresis model tested on lactate and glucose. 2002. 1 (1): p. 37-41.
66. Guy, R.H. and J. Hadgraft, *A theoretical description relating skin penetration to the thickness of the applied medicament*. *Int. J. Pharm.*, 1980. 6: p. 321-332.
67. Richon, A.B., *An introduction to molecular modeling*. *Mathematech*, 1994. 1: p. 83.
68. Pessoa, A.M., *Estudo teórico de adsorção de OH em suerfícies de Ouro*, in *Departamento de Química*. 2005, Universidade do Porto: Faculdade de Ciências. p. 1-66.
69. Pessoa, A.M., *Estudo Teórico de Adsorção de OH em Superfícies de Ouro* in *Departamento de Química*. 2004/2005, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.
70. Kai, Y. and M. Yu-Qiang, *Computer simulation of the translocation of nanoparticles with different shapes across a lipid bilayer*. *Nature Nanotechnology*, 2010. 5(8): p. 579-583.
71. Wong-Ekkabut, J., et al., *Computer simulation study of fullerene translocation through lipid membranes*. *Nature Nanotechnology*, 2008. 3(6): p. 363-368.
72. Li, T., D.O. Kildsig, and K. Park, *Computer simulation of molecular diffusion in amorphous polymers*. *Journal of Controlled Release*, 1997. 48(1): p. 57-66.

73. Haile, J.M., *Molecular Dynamics Simulation*. 1992, New York.
74. Young, D., *Introduction to computational chemistry*. Chem. Aust., 1998. **11**: p. 5.
75. Orio, M., D. Pantazis A., and F. Neese, *Density functional theory*. Photosynth Res, 2009. **102**: p. 443-453.
76. Marques A. L., M. and S. Botti, *O que é e para que serve a Teoria dos Funcionais de Densidade?*
77. Jackson, J.D., *Classical electrodynamics*. 1998, New York.
78. Balabin, R.M., *Communications: Intramolecular basis set superposition error as a measure of basis set incompleteness: Can one reach the basis set limit without extrapolation?* J. Chem. Phys., 2010. **132 (21)**: **211103**.
79. Blöchl, P.E., *Projector augmented-wave method*. Phys. Rev. B, 1994. **50**: p. 17953-17979.
80. Allouche, A.-R., *Gabedit—A graphical user interface for computational chemistry softwares*. Journal of Computational Chemistry, 2011. **32(1)**: p. 174-182.
81. CSAR, VASP. available from http://www.csar.cfs.ac.uk/user_information/software/chemistry/vasp.shtml.
82. Vasp, *What is VASP?* 2009: available from <https://www.vasp.at/index.php/about-vasp/59-about-vasp>.
83. Pennstate, VASP - Materials Simulation. 2000: available from <http://msc.psu.edu/software/vasp>.
84. Smith, M.W. and M. Gumbleton, *Endocytosis at the blood–brain barrier: From basic understanding to drug delivery strategies*. Journal of Drug Targeting, 2006. **14(4)**: p. 191-214.
85. *Worldwide Protein Data Bank*. available from <http://www.wwpdb.org/>.
86. Ochalek, M., et al., *SC lipid model membranes designed for studying impact of ceramide species on drug diffusion and permeation – Part II: Diffusion and permeation of model drugs*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2012. **82(2)**: p. 360-366.
87. Ochalek, M., et al., *SC lipid model membranes designed for studying impact of ceramide species on drug diffusion and permeation, Part III: Influence of penetration enhancer on diffusion and permeation of model drugs*. International Journal of Pharmaceutics, 2012. **436(1–2)**: p. 206-213.
88. Siepmann, J. and F. Siepmann, *Mathematical modeling of drug delivery*. International Journal of Pharmaceutics, 2008. **364(2)**: p. 328-343.
89. Nauman, E.B., K. Patel, and P. Karande, *Design of optimized diffusion-controlled transdermal drug delivery systems*. Drug Development & Industrial Pharmacy, 2011. **37(1)**: p. 93-102.
90. Simon, L., *Repeated applications of a transdermal patch: Analytical solution and optimal control of the delivery rate*. Mathematical Biosciences, 2007. **209(2)**: p. 593-607.
91. Simon, L., K.S. Kim, and K. Kanneganti, *Effects of epidermal turnover on the dynamics of percutaneous drug absorption*. Mathematical Biosciences, 2011. **229(1)**: p. 16-21.

92. Mitragotri, S., et al., *Mathematical models of skin permeability: An overview*. International Journal of Pharmaceutics, 2011. **418**(1): p. 115-129.
93. Manitz, R., et al., *On mathematical modeling of dermal and transdermal drug delivery*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 1998. **87**(7): p. 873-879.
94. Schumm, P., C.M. Scoglio, and D. van der Merwe, *A network model of successive partitioning-limited solute diffusion through the stratum corneum*. Journal of Theoretical Biology, 2010. **262**(3): p. 471-477.
95. Hadgraft, J., *The epidermal reservoir: a theoretical approach*. Int. J. Pharm., 1979. **2**: p. 265–274.
96. Hadgraft, J., *Theoretical aspects of metabolism in the epidermis*. Int. J. Pharm., 1980. **4**: p. 229–239.
97. Van Milligen, B.P., *On the applicability of Fick's law to diffusion in inhomogeneous systems*. Eur.J.Phys., 2005. **26**: p. 913.
98. Van der Merwe, D., et al., *A physiologically based pharmacokinetic model of organophosphate dermal absorption*. Toxicol.Sci., 2006. **89**: p. 188–204.
99. Fitzpatrick, D., J. Corish, and B. Hayes, *Modelling skin permeability in risk assessment — the future*. Chemosphere, 2004. **55**: p. 1309–1314.
100. Higuchi, T., *Physical chemical analysis of percutaneous absorption process from creams and ointments*. J. Soc. Cosmet. Chem., 1960. **11**: p. 85-97.
101. Herkenne, C., et al., *Dermatopharmacokinetic prediction of topical drug bioavailability in vivo*. J. Invest. Dermatol., 2007. **127**: p. 887-894.
102. Jaganathan, H. and B. Godin, *Biocompatibility assessment of Si-based nano- and micro-particles*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2012. **64**(15): p. 1800-1819.
103. Sekkat, N., Y.N. Kalia, and R.H. Guy, *Biophysical study of porcine ear skin in vitro and its comparison to human skin in vivo*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2002. **91**(11): p. 2376-2381.
104. YN, K., P. F, and G. RH, *Homogeneous transport in a heterogeneous membrane: Water diffusion across stratum corneum in vivo*. Biophys J, 1996. **71**: p. 2692-2700.
105. Walker, R.B. and E.W. Smith, *The role of percutaneous penetration enhancers*. Adv. Drug Deliver., 1996. **18**: p. 295–301.
106. Williams, A.C. and B.W. Barry, *Penetration enhancers*. Adv. Drug Deliver., 2004. **56**: p. 603–618.
107. Francoeur, M.L., G.M. Golden, and R.O. Potts, *Oleic acid: its effects on stratum corneum in relation to (trans)dermal drug delivery*. Pharm. Res., 1990. **7**: p. 621–627.
108. Walker, M. and J. Hadgraft, *Oleic-acid—a membrane fluidizer or fluid within the membrane*. Int. J. Pharm., 1991. **71**: p. R1-R4.
109. Kubota, K., et al., *A repeated-dose model of percutaneous drug absorption*. Appl. Math. Model., 2002. **26**: p. 529.
110. Baker, R., *Controlled Release of Biologically Active Agents*. 1987, John Wiley & Sons, New York.
111. Crank, J., *The Mathematics of Diffusion*. 1975, Clarendon Press, Oxford.
112. Carslaw, H. and J. Jaeger, *Conduction of Heat in Solids*. 1959, Oxford University Press, Oxford, Great Britain.

113. Anissimov, Y.G. and M.S. Roberts, *Diffusion modeling of percutaneous absorption kinetics: 4. Effects of a slow equilibration process within stratum corneum on absorption and desorption kinetics*. J. Pharm. Sci., 2009. **98**: p. 772–781.
114. Bando, H.S.M., et al., *In vivo evaluation of acyclovir prodrug penetration and metabolism through rat skin using a diffusion/ bioconversion model*. Pharm. Res., 1997. **14**: p. 56-62.
115. Bando, H.S.M., et al., *Analysis of in vitro skin penetration of acyclovir prodrugs based on a diffusion model with a metabolic process*. Int. J. Pharm., 1996. **135**: p. 91-102.
116. Nitsche, J.M., T.-F. Wang, and G.B. Kasting, *A two-phase analysis of solute partitioning into the stratum corneum*. J. Pharma. Sci., 2006. **95**: p. 649-666.
117. Mitragotri, S., *A theoretical analysis of permeation of small hydrophobic solutes across the stratum corneum based on Scaled Particle Theory*. J. Pharm. Sci., 2002. **91**: p. 744-752.
118. Egberts, E., S. Marrink, and H. Berendsen, *Molecular dynamics simulation of a phospholipid membrane*. Eur. Biophys. J., 1974. **22**: p. 423-436.
119. Tieleman, D., S. Marrink, and H. Berendsen, *A computer perspective of membranes: molecular dynamics studies of lipid bilayer systems*. Biochim. Biophys., 1997: p. 235-270.
120. Raykar, P., M. Fung, and B. Anderson, *The role of protein and lipid domains in the uptake of solutes by human stratum corneum*. Pharm. Res., 1998. **5**: p. 140-150.
121. Anderson, B. and P. Raykar, *Solute structure–permeability relationships in human stratum corneum*. J. Invest. Dermatol., 1989. **93**: p. 280-286.
122. Xiang, T. and B. Anderson, *The relationship between permeant size and permeability in lipid bilayer membranes*. J. Membr. Biol., 1994. **140**: p. 111-122.
123. Johnson, M.E., D. Blankschtein, and R. Langer, *Evaluation of solute permeation through the stratum corneum: lateral bilayer diffusion as the primary transport mechanism*. J. Pharm. Sci., 1997. **86**: p. 1162-1172.
124. Yamamoto, H. and H. Liljestrand, *Partitioning of selected estrogenic compounds between synthetic membrane vesicles and water: effects of lipid components*. Environ. Sci. Technol., 2004. **38**: p. 1139-1147.
125. Kwon, J., H. Liljestrand, and L. Katz, *Partitioning of moderately hydrophobic endocrine disruptors between water and synthetic membrane vesicles*. Environ. Toxicol. Chem., 2006. **25**: p. 1984-1992.
126. Michaels, A.S., S.K. Chandrasekaran, and J.E. Shaw, *Drug permeation through human skin: theory and in vitro experimental measurement*. Am. Inst. Chem. Eng. J., 1975. **21**: p. 985-996.
127. Wang, T.-F., G.B. Kasting, and J.M. Nitsche, *A multiphase microscopic model for stratum corneum permeability. II. Estimation of physicochemical parameters and application to a large permeability database*. J. Pharm. Sci., 2007. **96**: p. 3024-3051.
128. Frasch, H.F. and A.M. Barbero, *Steady-state flux and lag time in the stratum corneum lipid pathway: results from finite element models*. J. Pharm. Sci., 2003. **92**: p. 2196-2207.
129. Acetate ion. available from <http://www.rcsb.org/pdb/ligand/ligandssummary.do?hetId=ACT>.

130.	<i>Arginine.</i>	available	from
	http://www.rcsb.org/pdb/ligand/ligandsummary.do?hetId=ARG.		
131.	<i>Serine.</i>	available	from
	http://www.rcsb.org/pdb/ligand/ligandsummary.do?hetId=SER.		
132.	<i>1,2-ethanediol.</i>	available	from
	http://www.rcsb.org/pdb/ligand/ligandsummary.do?hetId=EDO.		
133.	<i>Glutamic acid.</i>	available	from
	http://www.rcsb.org/pdb/ligand/ligandsummary.do?hetId=GLU.		
134.	<i>Histidine.</i>	available	from
	http://www.rcsb.org/pdb/ligand/ligandsummary.do?hetId=HIS.		
135.	<i>Proline.</i>	available	from
	http://www.rcsb.org/pdb/ligand/ligandsummary.do?hetId=PRO.		

Anexos

Anexo 1

Artigo submetido à revista **Journal of Controlled Release**

Mathematical models for dermic diffusion: a state of the art review

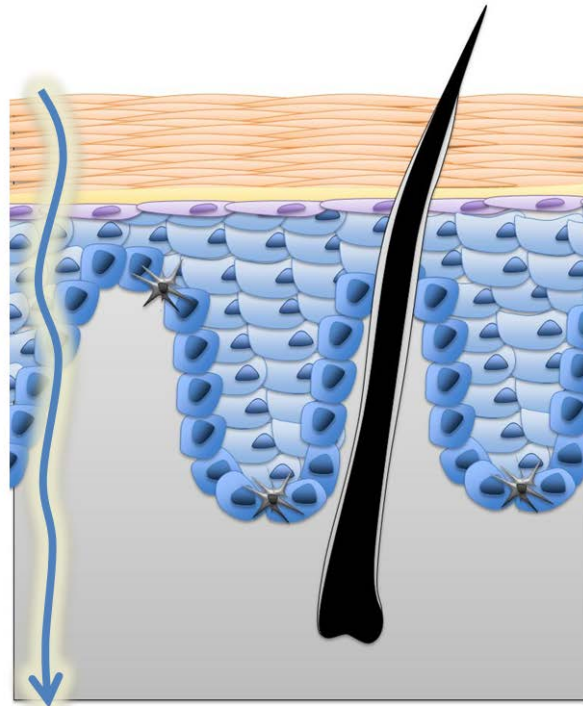
Ana Couto^a, Rúben Fernandes^{a,b,c}, M. Natália S. Cordeiro^d, Sara S. Reis^b, Rogério T. Ribeiro^{e,f}, Ana M. Pessoa^{a,b,d,*}

- a) Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto (ESTSP), Instituto Politécnico do Porto (IPP), 4400-330 Vila Nova de Gaia, Portugal
- b) Escola Superior de Estudos Industriais e de Gestão(ESEIG), Instituto Politécnico do Porto (IPP), 4480-876 Vila do Conde, Portugal
- c) Centre of Pharmacology and Chemical Biopathology, (U38-FCT), Faculty of Medicine, University of Porto,
- d) REQUIMTE/Department of Chemistry and Biochemistry, Faculty of Sciences, University of Porto, Rua do Campo Alegre 687, 4169-007 Porto, Portugal
- e) APDP – Diabetes Portugal (Departamento: ERC – Education and Research Center), Rua do Salitre, 118-120, 1250-203 Lisboa, Portugal
- f) CEDOC (Chronic Diseases Research Center – FCM-NOVA), Campo Mártires da Pátria, 130, 1169-056 Lisboa, Portugal

Abstract

Transdermal biotechnologies are an ever increasing field of interest, due to the medical and pharmaceutical applications that they underlie. There are several mathematical models at use that permit a more inclusive vision of pure experimental data and even allow practical extrapolation for new dermal diffusion methodologies. However, they grasp a complex variety of theories and assumptions that allocate their use for specific situations. Models based on Fick's First Law found better use in contexts where Scaled Particle Theory Models would be extensive in time-span but the reciprocal is also true, as context of transdermal diffusion of particular active compounds changes. This article reviews extensively the various theoretical methodologies for studying dermic diffusion and systematizes its characteristics, their proper context of application, advantages and limitations, as well as future perspectives.

- Fick's First Law
- Fick's First Law Passive diffusion model
- Fick's Second Law
- Fick's Second Law Passive diffusion model
- Hybrid Approach
- Laplace Transform
- Scaled Particle Theory
- Homogeneous Membrane Model



Keywords: Transdermal diffusion, mathematical diffusion models, Fick's Law, sensors, hybrid approach

Contents:

<i>Abstract</i>	82
1. <i>Introduction</i>	83
2. <i>Transdermal applications:</i>	85
2.1. <i>Diffusion of active compounds</i>	85
2.2. <i>Removal of active compounds/substances</i>	87
2.3. <i>Dermal reconstruction/skin regeneration</i>	87
2.4. <i>Sensors</i>	88
3. <i>Dermic Diffusion and Mathematical models: a review</i>	89
3.1. <i>Fick's First Law</i>	94
3.2. <i>Fick's Second Law</i>	97
3.3. <i>Hybrid Approach: First and Second Law of Fick</i>	100
3.4. <i>Laplace Transform</i>	103
3.5. <i>Scaled Particle Theory</i>	104
3.6. <i>Homogeneous Membrane Model</i>	105
4. <i>Conclusion</i>	106
<i>Bibliography</i>	107

1. Introduction

Nanotechnology represents the avenue and the frontier of Biotechnology and Biomedical Engineering. Its importance is presently undisputed[1, 2] but the challenges are still the ones that defined the designation itself: small sized materials and/or devices with stable molecular properties. Furthermore, it may represent the solution for the disadvantages of many current biomedical microdevices that increase transport across the skin by using an added driving force for drug transport or by physically disrupting the barrier, such as microneedles[2, 3].

Indeed, microneedles, a device that may provide a more efficient transdermal drug delivery, are an example of a larger research area: dermic diffusion. The microneedle piercing increases the skin permeability of the variety of compounds ranging from low molecular weight tracers to proteins, DNA and even nanoparticles [4, 5]. Moreover, the microneedles can be integrated into “lab-on-a-chip” systems, where they are combined with either microsensors, micropumps or both. The main purpose of these devices is to create minimally invasive transdermal channels for constantly extracting and analysing biological fluid and directly acting on analytical results through the delivery of drugs. Application of this system is seen, for example, in patients with diabetes, for glucose detection, the delivery of insulin and regulation of the blood glucose by means of a microsensor, a micropump and a microchip, respectively, even allowing the existence of an integrated management system [2]. In view of that, the development of micro-scale devices, devices with at least a parameter in micrometer range, has seen great progress in the last years.

Micron-sized pores of the micro-scale devices can deliver several therapeutic molecules over a broad molecular weight range in shorter durations of time, and the microscopic holes are small enough to limit undesired effects [4]. However, the trauma suffered by the patients is still an issue, and a nanoneedle could prevent such problems, since there are studies relating positively the narrowness of the needle size and the minimization of trauma [6].

Understanding this specific diffusion means understanding the ground that sustains drug delivery method's evolution. However, it is difficult, if not impossible in some cases, to determine experimentally the nanoidiosyncrasies at molecular level that explain the sustainability of the material and /or device at macroscopic level.

Furthermore, the apprehension at molecular level of the material's nature and chemical reactivity would permit extrapolation for other scenarios and even new materials. The importance of theoretical models, thus, is increasingly paramount not only for the present micro technologies but also for future achievements in the nanoresearch.

Nevertheless, the elaboration of such models faces the complexity of the dermic barrier. To study such surface implies a large number of individual fragments, each one with a unique nano chemical composition. The skin layer that presents the first barrier in dermic diffusion is the *stratum corneum* (SC), just 15 to 20 μm thick, and is constituted by differentiated keratinocytes embedded in lipid layers [3]. Not only is the SC complex in merely chemical constitution but its organization, an inherent aspect of the identity of the SC [7], adds to the difficulty of modelling the barrier. But SC is just the first barrier to be taken into account for a dermal diffusion model. Beneath it is located the epidermis, which thickness ranges from 130 to 180 μm and finally, as one penetrates the skin, one finds the dermis, filled with complex structures such as nerves, blood vessels, nociceptors, lymph vessels, hair follicles and sweat glands[8, 9]. The full skin barrier is schematized in Figure 1.

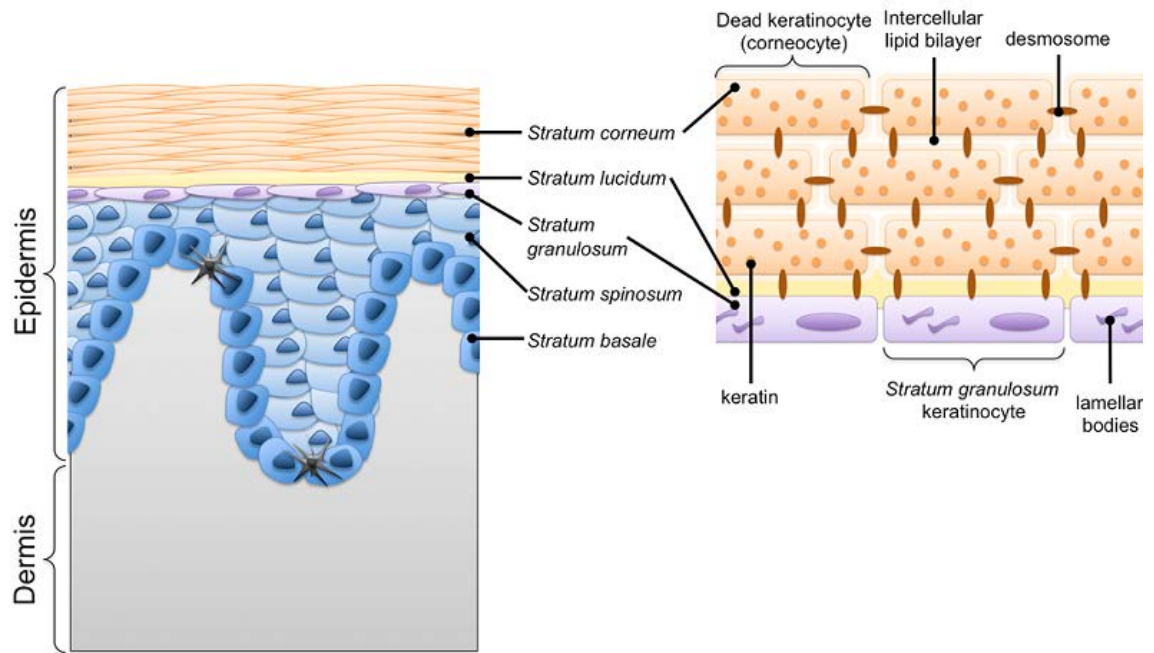


Figure 1. *Stratum corneum.*

Though there are several advantages of the administration of a biologically active substance by simply piercing through the skin onto the target of the injection over both the oral route and conventional injections. Such advantages include the avoidance of fluctuations of the delivered drug concentration in the blood, which is associated with toxicity. Nevertheless the dense multilayered nature of the dermic barrier complicates the (trans) dermal drug delivery. That explains why the majority of (trans) dermal products in the market are low molecular-weight drugs with high potency[10-12].

The following processes exemplify the potential applications of transdermal diffusion mathematical models, in view of the many experimental limitations at present.

2. Transdermal applications:

Transdermal application is a route of administration wherein active compounds are delivered across the skin for systemic distribution. Although the skin is a large and logical target for drug delivery, its basic functions, as a protective barrier against external pervasive agents, limit its utility. Therefore, understanding the barrier's functions and namely its flexibility, provide the basis of applications, as described below.

2.1. Diffusion of active compounds

Drug delivery through the skin has multiple benefits over both oral route and conventional injections, although the dense structure of the *stratum corneum* and the limited number of hair follicles and sebaceous glands complicates the delivery of therapeutic doses [2].

The dermis and the overlying epidermis compose the skin. The outermost layer of the epidermis is the *stratum corneum*, comprised of a multi-layered structures of keratinocytes embedded in a matrix of hydrophobic lipids organized into tight lamellar structures [13, 14]. The dermis contains a network of capillaries that connect to the systemic circulation and if a drug penetrates the *stratum corneum*, then it can readily reach the dermis and enter the bloodstream by passive diffusion. Diffusion is considered the rate-limiting step for the transdermal transport of drug molecules, through the delivery of molecules into and across the skin and depends on the substance's physicochemical properties.

The particles, which are described to have a better drug delivery, are the nanoparticles. They enhance drug absorption allowing sustained drug release for a prolonged period of time and protecting the capsulated substance from chemical degradation. The active compounds can enter into the skin by different routes: intercellular pathway, transcellular pathway, transappendageal pathway and paradermic pathway

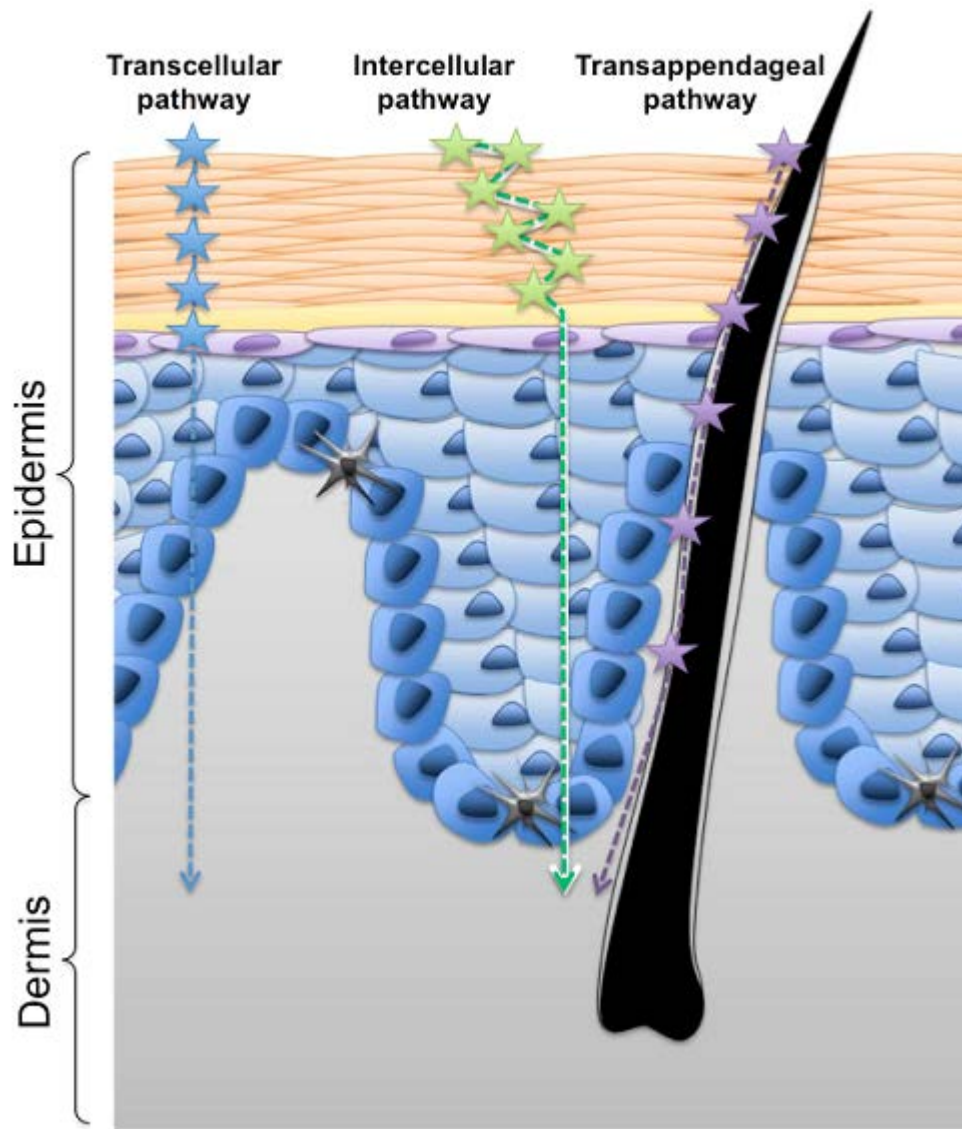


Figure 2. Schematic presentation of the routes for permeation of the agent applied

Whereas the active compounds enter the skin through the lipidextracellular matrix (ECM) in the (1) intercellular pathway, occupying the intercellular spaces of the keratinocytes, in the (2)transcellular pathway is through the keratinocytes; finally, the active compounds may also cross along the shafts of hair follicles in the (3) transappendageal pathway, through the sebaceous and sweat glands that are dispersed all over the skin. Nanocarriers can enter into the skin and remain intact or can be degraded near the skin surface releasing the active substance to penetrate into the skin layers[14, 15].

2.2. Removal of active compounds/substances

Drug delivery involves a numbers of circumstances including the possibility of extracting the active compounds; one example is the extraction of glucose and lactate[16, 17].Using transdermal reverse iontophoresisallows the simultaneously extraction of glucose and lactate from human subjects.

Transdermal monitoring using iontophoresis is made possible by the skin's permeability to small molecules and the nanoporous and microporous nature of the structure of skin. Reverse iontophoresis refers to the passage of a low level of current through the skin, normally via a pair of skin electrodes containing a conducting gel, to promote the extraction of both charged and neutral molecules[16].

In vitro diffusion studies were performed by Ching and colaboradores using an anoporous membrane as the skin-like barrier in the iontophoresis cell with and without application of iontophoretic current. This showed that passage of a current facilitates movement of lactate and glucose across the nanoporous membrane when compared to ordinary diffusion; and during the studies, lactate and glucose were extracted successfully using reverse iontophoresis[17].

2.3. Dermal reconstruction/skin regeneration

Dermal reconstruction is a complex process, which involves many cells, such as epidermal, fibroblastic, and endothelial cells, and various processes such as proliferation, cell migration, matrix synthesis, and contraction. Wound healing is a complex and dynamic process of restoring cellular structures and tissues layers which progresses in an arranged and conventional fashion such as inflammation (reactive), proliferation (regenerative) and maturation (remodelling)[18].

When the skin is breached, initially there is the laying down of a fibrin blood clot which plugs the defect and seals off the underlying tissues from oxygen in the air. The degenerating platelet secretes platelet-derived growth factor (PDGF) and stimulates the first phase of cell proliferation of epidermal cells, fibroblasts and endothelial cells. Then, neutrophils arrive at the wound site and clear out debris and contaminating bacteria and secrete proinflammatory

cytokines which activate local fibroblasts and keratinocytes. Past few days, the blood-borne macrophages replace the neutrophils and they produce cytokines and growth factors essential to wound healing. After a week, the wound is infiltrated by activated fibroblasts, stimulated by TGF- β that increases the synthesis of single strands of collagen. Then wound fibroblasts are transformed into myofibroblasts, which express α -smooth muscle actin (α -SMA) acquiring the ability to generate strong contractile forces. The proliferation of myofibroblasts results in the formation of scar tissue[19].

2.4. Sensors

An electrochemical biosensor has been defined as a device which is capable of providing specific quantitative or semi-quantitative information, usually through enzymatic catalysis of a redox reaction[20]. A biosensor is distinguished from a chemical sensor in the sense that it processes a biological recognition element (a protein, peptide or oligonucleotide). However, if this targeted biological molecule is irreversibly bound to the sensor it cannot be used for continuous monitoring [21].

When a sensor is brought into contact with biological tissues, its performance may deteriorate, due to the passive adsorption of biomolecules on the sensor/probe surface and active processes couples to tissue response[22]. Performance criteria for *in vivo* biosensor are not only dependent on the specific analyte, but also on the intended application for the biosensor. In particular, glucose biosensors have been the most studied mainly because of its the importance in the follow-up of diabetes [22-24].

Biosensors have also been developed for neuroscience research. In brain research a major challenge for *in vivo* biosensor development is providing adequate performance to distinguish among cell signalling entities and neurotransmitters in a manner that leads to enhanced understanding of biological function. Such challenge requires, besides acceptable sensitivity and limits of detection (LOD) for each analyte, sensor specificity with appropriate spatial and temporal resolution. It is necessary to achieve optimum balance among the numerical figures for a specific application. In addition, the biosensor must be reasonably stable. It is intended that it last longer than a few hours, preferably days or weeks. The most demanding application and the greatest focus for biosensor development over the last few years has been neurobiology research.

Biosensor sensitivity, LOD, and linear range are functions of the physical design and the molecular recognition element (e.g. biomolecule activity) and the required sensitivity for a particular analyte is determined by the concentration levels found in the measurement environment of interest and it can be enhanced by changing the surface of the electrode [25]. Selectivity for biosensors is gained by employing analyte specific molecular recognition elements, primarily enzymes. To produce reagentless sensors, oxidases are used for implantable applications, because the co-substrate, oxygen, is relatively abundant in biological

applications[26] and catalyse the electron transference which can be easily detected with proper electrochemical detectors.

Electrochemical biosensors are susceptible to interference from endogenous electroactive compounds such as uric acid, dopamine and ascorbate. Ascorbate is the most troublesome because it has high concentration and broad oxidation potential range, and ascorbate levels do not remain constant during neural stimulation[27-30].

If a sensor is design to provide a reliable reflection of the analyte concentration in the surrounding tissue, the mutual interactions of such sensor and the biological medium must not influence results. Biocompatibility for implants is considered from a perspective linked with the events of the inflammatory response [22, 31]. For biosensors, this translates to three considerations with increasing long term importance: influence of the initial inflammatory events; effect the implant has on the local host response that may be coupled to fluctuation in sensor response; and biosensor degradation[22]. The phases of a biosensor implant are presented in Figure 3.

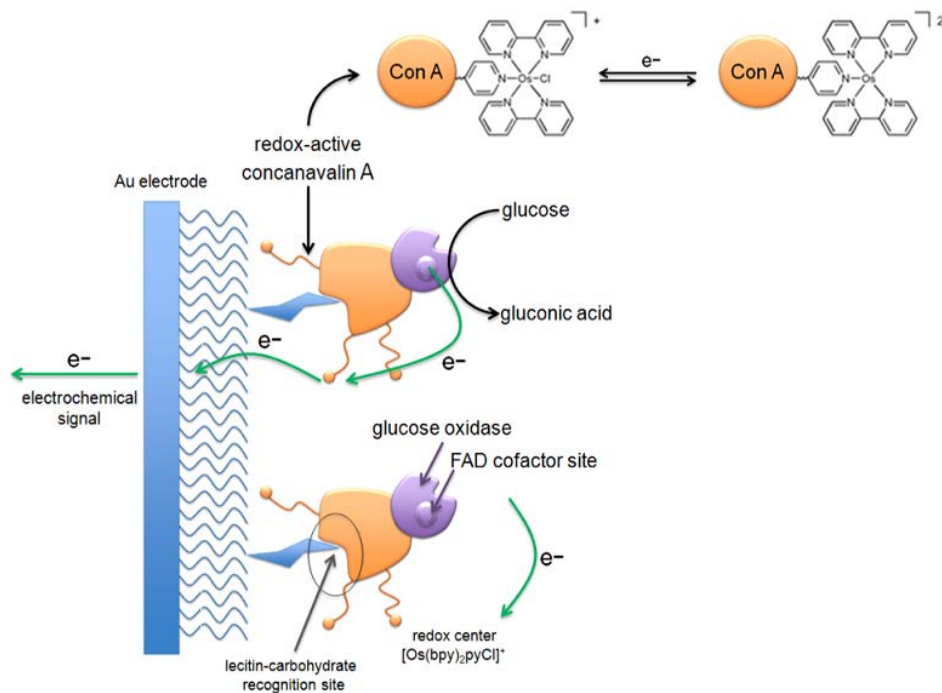


Figure 3. Phases of biosensor implant

3. Dermic Diffusion and Mathematical models: a review

Traditionally, the skin and the diffusion phenomena associated have been studied with pure mathematical models, especially based on the Fick Equation [32-40]. A systematic analysis of these models implies a division based upon the particular approach and use of the Fick Law. However particular views in specific devices have raised new challenges and other

mathematical models were developed. An extensive review of these models was made and the relevant synthesis is presented in Table 1.

Model	Theoretical Approach	Mathematical Model	Validation
Fick's First Law	Stratum corneum lipid matrix is viewed as a homogeneous medium surrounding corneocytes which the chemical product diffuse from high to low concentration according to Fick's First Law.	$Q = \frac{DA\Delta C_s}{h}$ $J_{ss} = \frac{Q}{AT} = \frac{D\Delta C_s}{h}$ $J_{max} = \frac{DS_s}{h}$ $J_{ss} = \frac{KD\Delta C_v}{h}$ $K_p = \frac{J_{ss}}{\Delta C_v}$	Concentration profiles in skin have been examined to separate the effects of the partition coefficient and the diffusion on permeation [47]. Furthermore, mathematical models provide a means to assess the likelihood of systemic exposure upon dermal contact with toxic chemicals [39]. In the United States, the applications of mathematical modeling to dermal risk assessment cite the use of permeability coefficients (K_p) and their model-based estimation.
Fick's First Law Passive diffusion model	Models of Passive Diffusion are based on conservation of the number of the particles and Fick's Laws of diffusion.	$TEWL = \frac{K \cdot D}{H} \cdot \Delta C$ $= K_p \cdot \Delta C$ $TEWL_{(x)} = \frac{K \cdot D}{(H - x)} \cdot \Delta C$ $\frac{1}{TEWL_{(x)}} = \frac{H}{K \cdot D \cdot \Delta C} - \frac{X}{K \cdot D \cdot \Delta C}$	Transepidermal Water Loss (TEWL) increase slowly at first and then more rapidly with the degree of stratum corneum impairment. Secondly, low-frequency skin impedance decreased exponentially as a function of progressive

<p>Fick's Second Law</p>	<p>The system is modelled as a one-dimensional transient diffusion system by using a chemical penetration enhancement (oleic acid, OA).</p>	$\frac{\partial u}{\partial t} = D \frac{\partial^2 u}{\partial x^2}; 0 \leq x \leq L; t \geq 0$ $j = \left(-D \frac{\partial u}{\partial x}\right) \Big _{u(x=L,t)}$ $\frac{\partial C_1}{\partial t} = D_1 \frac{\partial^2 C_1}{\partial x^2} + u_1 \frac{\partial C_1}{\partial u}; a \leq x \leq 0$ $\frac{\partial C_2}{\partial t} = D_2 \frac{\partial^2 C_2}{\partial x^2} + u_2 \frac{\partial C_2}{\partial u}; a \leq x \leq b$	<p>stratum corneum removal [49].</p> <p>In the presence of the penetration enhancer, the diffusion and permeation of model drugs were more rapidly than for the stratum corneum lipid model membrane without OA [34].</p>
<p>Fick's Second Law Passive diffusion model</p>	<p>The systems are represented by a vehicle, a skin membrane and a capillary.</p>	$\frac{\partial C_1}{\partial t} = D_1 \frac{\partial^2 C_1}{\partial x^2}; a < x < 0, 0 < t \leq T$ $\frac{\partial C_2}{\partial t} = D_2 \frac{\partial^2 C_2}{\partial x^2}; a < x < b, 0 < t \leq T$ $C_1[x, 0] = C_{10}, a < x < 0$ $C_2[x, 0] = C_{20}, a < x < b$ $\frac{\partial C_1(a, t)}{\partial x} = 0; 0 < t \leq T$ $\frac{D_1 \partial C_1[0, t]}{\partial x} = \frac{D_2 \partial C_2[0, t]}{\partial x}; 0 < t \leq T$	<p>This technique can be applied to estimate the dose-loading necessary to achieve a specified release rate. A constant plasma drug concentration is obtained increasing the application period and /or reducing the removal period which produce a more continuous drug delivery [37].</p>

		$K_m C_1[0, t]$ $= C_2[0, t], 0 < t \leq T$	
<p>Hybrid Approach</p>	<p>As previously mentioned, current mathematical models use the Fick's law of diffusion to describe dermal absorption through the stratum corneum.</p>	$-\frac{D_2 \partial C_2[b, t]}{\partial x}$ $= K_{cl} C_2[b, t]; 0 < t \leq T$ $\frac{(dN_{iA}/N_A)}{dt}$ $= \frac{(S_{AB}D)}{(S_{Atot}R_A^2)}$ $L_{EA} + H_{EA} = N_A$ $\frac{dN_{AB}}{dt}$ $= (H_{EA}/N_A) dN_{iA}/dt$ $= \frac{H_{EA}S_{AB}D}{(S_{Atot}R_A^2)}$ $\frac{dN_{AB}}{dt} = \frac{dN_{BA}}{dt} - \frac{dN_{AB}}{dt}$ $\frac{dN_{AB}}{dt}$ $= (H_{EA}/N_A) y dN_{iA}/dt$ $= \frac{H_{EA}S_{AB}D}{(S_{Atot}R_A^2)}$ $y(x)$ $= \frac{(1 + \exp(-a(1-x)))}{(1 - \exp(-a))}$ $y(x)$ $= \frac{\exp(-ax) - \exp(-a)}{(1 - \exp(-a))}$	<p>They found that any amount of solute in node A is the same fraction of the solute transferred to node B, which mimics Fickian diffusion. They still found that when the transfer of solute through all nodes is integrated, the fraction of solute transferred remains constant across a range of doses, which also resembles Fickian diffusion. Higher node capacities result in higher solute transfer rates [41].</p>
<p>Laplace Transform</p>	<p>Laplace Transform can be used to describe skin permeation of drug and metabolite, admitting first order metabolism kinetics.</p>	$\hat{C}(x, s) = \mathcal{L} \{ C(x, t) \}$ $= \int_0^\infty C(x, t) e^{-st} dt$ $s\hat{C}(x, s) - C(x, 0)$ $= D \frac{d^2}{dx^2} \hat{C}(x, s)$	<p><i>Hadgraft</i> [59,60] and <i>Guy and Hadgraft</i> [61] were the pioneers in the use of Laplace transform for mathematical modelling of skin transport, and <i>Anissimov and Roberts</i></p>

		$\hat{C}(x, s)$ $= A(s) \sinh\left(\frac{x}{h} \sqrt{st_d}\right)$ $+ B(s) \cosh\left(\frac{x}{h} \sqrt{st_d}\right)$ $\frac{\partial C_u}{\partial t}$ $= D \frac{\partial^2 C_u}{\partial x^2} - K_{on}$ $+ K_{off} C_u$ $\frac{\partial C_b}{\partial t} = K_{on} - K_{off} C_b$ $D \frac{\partial^2 \hat{C}_u}{\partial x^2}$ $= \left(s + \frac{sK_{on}}{s + K_{off}} \right) \hat{C}_u$ $g(s) = s + \frac{sK_{on}}{s + K_{off}}$	<p>[62] used the numerical inversion of Laplace transform solutions to the diffusion equation for simulations and data analysis of skin transport experiments.</p> <p><i>Bando et al.</i> [63, 64] developed a two-layer diffusion model which incorporates both polar and non-polar pathways and Laplace transformed equations were obtained to describe skin permeation of drug and metabolite [39].</p>
<p>Scaled Particle Theory</p>	<p>The partition coefficient between the stratum corneum and the vehicle is estimated from structure-activity algorithms relating experimental measurements.</p>	$K_{SC/v} = aP^b$ $K_{SC/v}$ $= \phi_{lip} K_{lip/v}$ $+ \phi_{cor} K_{cor/v}$	<p>This theory was used for <i>Mitragotri</i> [39] where he developed an equation to describe solute diffusion in lipid bilayers. The theory calculates diffusion coefficient based on the amount to work required creating a free volume to allow for solute diffusion.</p>
<p>Homo geneous Membrane Model</p>	<p>Study of the transient diffusion through model stratum corneum structures including both ordered and disordered</p>	$h_{sc}^* = N(d + t + g)$ $\frac{J_0}{\bar{J}^*}$ $= 1 + \frac{\alpha \phi}{\sigma} + \frac{\alpha^2 \phi^2}{4(1 - \phi)}$	<p>Equations (37) and (39) were been validated for isotropic lipids and impermeable corneocytes [77].</p>

corneocytes phases.	$\frac{t_{lag_*}}{t_{lag_0}}$ $= \frac{\sigma(1+\alpha\varphi)}{\alpha} \left(1 + \frac{\alpha\varphi}{\sigma} + \frac{\omega}{(1+\omega^2)} \frac{\alpha^2\varphi^2}{(1-\varphi)} \right)$
------------------------	--

Table 1. Mathematical Models for Dermic Diffusion

The mathematical models that approach the skin at nano level can be classified according to the methodological assumptions, *i.e.*, they are either based on the Fick's First Law, the Laplace transform, the scaled particle theory, the homogeneous membrane model or hybrid approach (using the First and the Second Law of Fick). Thus, analyzing each model implies an analysis of the particular approach chosen and the reasons for such choice.

3.1. Fick's First Law

When a drug is placed on the skin surface, it migrates to the innermost layers through the *stratum corneum* and viable epidermis [37]. *Stratum corneum*, as depicted in Figure 1, is composed by keratinocytes which becomes a substantial barrier to drug delivery because active and facilitated transport is difficulted in drug delivering [3]. Passive diffusion is a mechanism by which chemicals move through the *stratum corneum*, as can be seen in Figure 4[40].

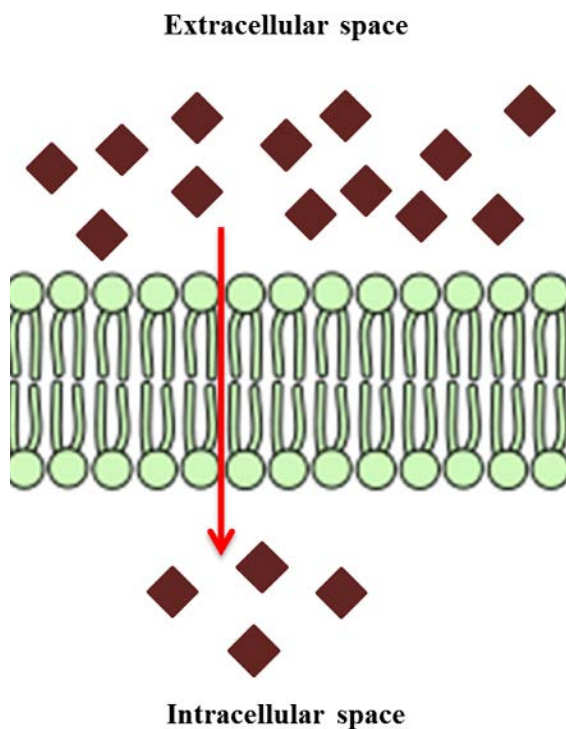


Figure 4. Passive diffusion mechanism

Fick's Laws of diffusion determines that diffusion occurs in favour of the concentration gradient, in others words, it occurs in the direction from higher to lower concentration [40, 41]. This principle is applied in recent mathematical models used to describe the dermal absorption through the *stratum corneum*[40, 42, 43].

The *stratum corneum* lipid matrix is viewed as a homogeneous medium surrounding keratinocytes where a substance diffuses from high to low concentration according to Fick's First Law. The fraction that is absorbed in specific period of time is constant and will remain constant at different concentrations [40, 42]. The equation used to describe skin transport under steady-state conditions is given by Fick's First Law:

$$(1) \quad Q = D \frac{A}{h} t \nabla C_s$$

and relates the amount of solute, Q , crossing the skin membrane of area, A , over a period of time, t , the concentration gradient across the two interior surfaces of the skin, ∇C_s , the diffusion's coefficient in the skin membrane, D , and the path length, h [38]. This approach assumes that dermal absorption is a first order process that can be described according to Fick's First Law of diffusion[40].

Stratum corneum behaves like a pseudo-homogenous membrane and barrier properties do not vary with time or position. The previous equation is expressed in terms of steady-state skin flux, J_{ss} , as follows:

$$(2) \quad J_{ss} = \frac{Q}{At} = \frac{D \nabla C_s}{h}$$

Whereby, the maximum flux, J_{max} , is given when maximum solubility S_s of a solute in the *stratum corneum* is achieved, and equation can be written as[38, 44]:

$$(3) \quad J_{max} = \frac{D S_s}{h}$$

The thermodynamic activity for any given solute is defined by the fractional solubility of the solute in the skin (C_s/S_s). However, nonlinearity can arise as a result of solute-skin and solute-vehicle non-ideal interactions [38, 45]. It is more convenient to express concentrations in terms of the solute concentration in the vehicle (C_v) and a partition coefficient, K , of the solute between the skin and the vehicle as follows:

$$(4) \quad J_{ss} = \frac{K D \nabla C_v}{h}$$

Where $K = C_s/C_v$.

The assessment of permeability coefficient (K_p), has been the main focus of the permeation model. K_p , is defined as the steady-state flux of chemical across the skin (J_{ss}) normalized by the concentration gradient, C_v :

$$(5) \quad K_p = \frac{J_{ss}}{\nabla C_v}$$

The understanding of percutaneous penetration is best exemplified in models that are underpinned by experiment. For example, the concentration profiles in skin have been examined to separate the effects of the partition coefficient and the diffusion on permeation[46]. Furthermore, mathematical models provide means to assess the likelihood of systemic exposure upon dermal contact with toxic chemicals. Mitragotri and collaborators have been applied of mathematical modeling to dermal risk assessment, privileging the use of permeability coefficients (K_p) and their model-based estimation [38].

3.1.1. Fick's First Law and Passive Diffusion Models

Models of passive diffusion are based on particle number conservation and diffusion Fick's Laws. Some mathematical approaches reported by several authors are based on diffusion models that consist in partial differential equations describing drug delivery in space and time according with diffusion Fick's Laws [39]. According diffusion Fick's Laws, penetrants are transported, through the skin, via the transcellular, intercellular and transappendageal routes[14, 36, 47]. These different transports are depicted in Figure 2.

Regarding the studies of Mitragotri and collaborators the transport processes in the skin can be described by Fick's First Law[38]. Furthermore, Higuchi and team derived mathematical models that describe percutaneous absorption as a passive diffusion process in the vehicle and the membrane layers in series[44].

Sekkat and collaborators evaluated the biophysical properties, such as transepidermal water loss (TEWL) of porcine ear skin and compared the results with data from human skin *in vivo*[48]. They used the Fick's First Law of diffusion to describe the TEWL across the skin:

$$(6) \quad TEWL = \frac{K \cdot D}{H} \cdot \Delta C = K_p \cdot \Delta C$$

Where K is the *stratum corneum*/water partition coefficient, D is the diffusivity of water across the *stratum corneum* of thickness H , and ΔC is the water concentration difference across the barrier.

If X of the *stratum corneum* is removed by tape stripping, and TEWL increased to $TEWL_{(x)}$ and if K is known or assumed, then a plot of $1/TEWL_{(x)}$ versus x allows H , D , and K_p to be determined[48, 49].

$$(7) \quad TEWL_{(x)} = \frac{K \cdot D}{(H-x)} \cdot \Delta C$$

$$(8) \quad 1/TEWL_{(x)} = \frac{H}{K \cdot D \cdot \Delta C} - \frac{X}{K \cdot D \cdot \Delta C}$$

TEWL increase slowly at first and then more rapidly with the degree of *stratum corneum* impairment. Secondly, low-frequency skin impedance decreased exponentially as a function of progressive *stratum corneum* removal. The differential sensitivities of TEWL and low-frequency

impedance measurements to the degree of barrier impairment suggest that the techniques used together represent a way to characterize *stratum corneum* functionality [48].

3.2. Fick's Second Law

Other mathematical models describing the delivery of drug through the dermis are based on Fick's Second Law. Fick's Second Law predicts the concentration gradient changes with time. Any dermic diffused drug is placed on the skin surface and travels to the innermost layer through the *stratum corneum* and viable epidermis, as previously seen. One can locate the origin of the delivery process at the interface between these two regions [37], as illustrate by Figure 5.

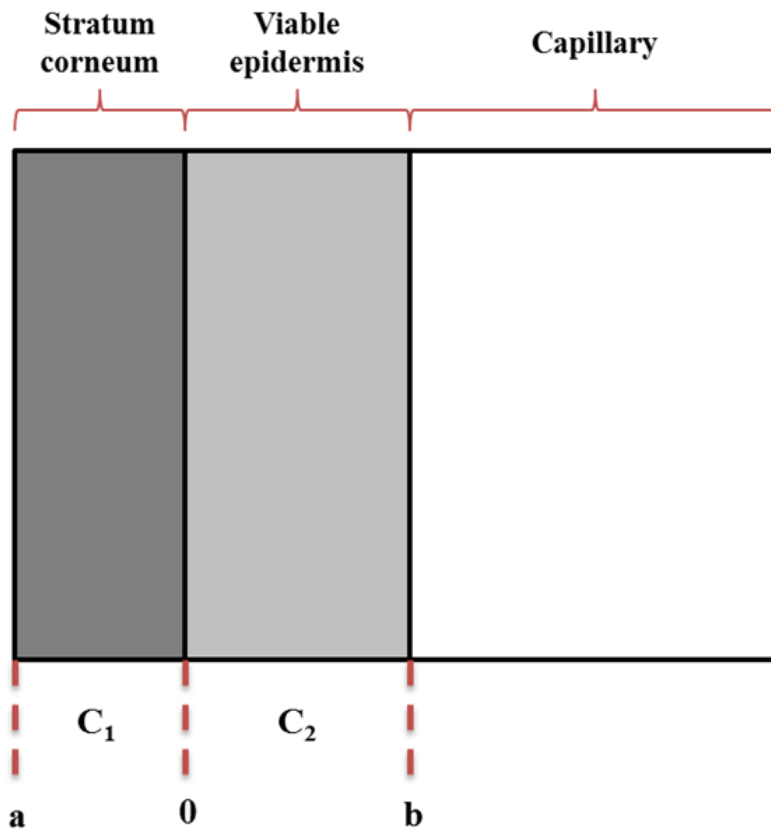


Figure 5. Delivery process at the interface between these two regions, *stratum corneum* and epidermis: C_1 , Drug concentration in the *Stratum corneum*; C_2 , Drug concentration in the viable epidermis; a , Thickness of the stratum corneum; b , Thickness of the viable epidermis.

To estimate the concentration of the drug along a perpendicular axis to the membrane, designed normally by $u(t, x)$, [32, 33, 37] must be found the solution of a linear one-dimensional diffusion equation, according Fick's Second Law of diffusion:

$$(9) \quad \frac{\partial u}{\partial t} = D \frac{\partial^2 u}{\partial x^2}; 0 \leq x \leq L; t \geq 0$$

Where x is the thickness of the membrane and t is the period of time, and the delivery rate or flux is defined by:

$$(10) \quad j = \left(-D \frac{\partial u}{\partial x}\right) \Big|_{u(x=L,t)}$$

Once the origin is located at the interface between the two regions, the equations are defined as:

$$(11) \quad \frac{\partial c_1}{\partial t} = D_1 \frac{\partial^2 c_1}{\partial x^2} + u_1 \frac{\partial c_1}{\partial x}; -a \leq x \leq 0$$

And

$$(12) \quad \frac{\partial c_2}{\partial t} = D_2 \frac{\partial^2 c_2}{\partial x^2} + u_2 \frac{\partial c_2}{\partial x}; 0 \leq x \leq b$$

Where C_1 and C_2 are the drug concentration in the *stratum corneum* and viable epidermis, respectively; D_1 and D_2 are the effective drug diffusion in the vehicle and the skin [36].

In addition to physical methods, drug permeation through the *stratum corneum* can use chemical penetration enhancers [33, 50, 51]. *Cis-9-Octadecenoic acid* (oleic acid, OA) was found to be a good penetration enhancer [33, 52, 53], and research regarding the impact of the penetration enhancer, oleic acid, on the barrier properties of *stratum corneum* lipid model membranes was conducted.

The Second Law was studied using a Two Lipid Model Membranes (membrane I and membrane II) with incorporated oleic acid. The composition of the membranes are summarized in table 2, and were characterized the impact of their composition on the barrier function by conducting diffusion and permeation studies of three model molecules (urea, caffeine and diclofenac sodium).

Model Membrane	Composition
Membrane I	Cer [AP] / Chol / PA / ChS
Membrane II	Cer [AP] / Cer [EOS] / Chol / PA
Membrane Ia	Cer [AP] / Chol / PA / ChS / OA
Membrane IIa	Cer [AP] / Cer [EOS] / Chol / PA / OA

Table 2 - Composition of SC Lipid Model membranes

The study showed that the presence of oleic acid weakened the barrier function of membrane I and demonstrated the opposite effect on membrane II. In presence of the penetration enhancer the diffusion and permeation of model molecules were more rapid than for the *stratum corneum* Lipid Model Membrane without oleic acid.

Previous studies not only showed that: (1) the diffusion of urea was faster than the permeation of caffeine and diclofenac sodium; (2) urea, the most hydrophilic drug, diffused

faster than caffeine, the more lipophilic molecule; and (3) urea is even more fast than the most lipophilic drug, diclofenac sodium [33].

Several authors used a model based on Fick's Second Law of diffusion to calculate the diffusion coefficient of model drugs. Thus, the drug concentration, $u(t, x)$, within the model membrane can be approximated by a solution of linear one-dimensional diffusion equation, as mentioned before [32, 33].

3.2.1. Fick's Second Law and passive diffusion models

The Fickian diffusion model is also applied in studies regarding the use of transdermal patch with multi-layer, planar, drug-in-polymer adhesive patch applied to the skin, where each layer contains a different concentration of drug encapsulated in the polymer matrix. It can also be seen in cases where the systems are represented by a vehicle, a skin membrane and a capillary as reported previously [36]. In this model drug concentrations in the vehicle and skin are different, in order to simulate the previous process.

$$(13) \quad \frac{\partial c_1}{\partial t} = D_1 \frac{\partial^2 c_1}{\partial x^2}; \quad a < x < 0, 0 < t \leq T$$

$$(14) \quad \frac{\partial c_2}{\partial t} = D_2 \frac{\partial^2 c_2}{\partial x^2}; \quad a < x < b, 0 < t \leq T$$

The thicknesses of the vehicle and the skin are $-a$ and b , respectively; and T is the application period. The initial conditions are:

$$(15) \quad C_1(x, 0) = C_{10}, \quad a < x < 0$$

And

$$(16) \quad C_2(x, 0) = C_{20}, \quad a < x < b$$

The boundary conditions are

$$(17) \quad \frac{\partial c_1(a, t)}{\partial x} = 0; \quad 0 < t \leq T$$

$$(18) \quad \frac{D_1 \partial c_1(0, t)}{\partial x} = \frac{D_2 \partial c_2(0, t)}{\partial x}; \quad 0 < t \leq T$$

$$(19) \quad K_m C_1(0, t) = C_2(0, t), \quad 0 < t \leq T$$

$$(20) \quad -\frac{D_2 \partial c_2(b, t)}{\partial x} = K_{cl} C_2(b, t); \quad 0 < t \leq T$$

Where K_m is the patch-skin partition coefficient, K_{cl} is defined as the clearance per unit area of the medicament per unit concentration excess at $x = b$ [36, 54]. Equation (17) states that no exchange of material occurs between the vehicle and the surrounding; equation (18) is the continuity of flux across the vehicle/skin interface; equation (19) corresponds to an equilibrium condition at the vehicle/skin interface; equation (20) states that elimination of drug

by capillary system follows first-order kinetics at $x = b$. The transport is done in the direction perpendicular to the skin surface.

Simon and team have dedicated efforts to study the transport of a medicinal agent through the vehicle and subsequent penetration into the *stratum corneum*[36]. Eigenmodes and eigenvalues were computed and introduced into an inversion formula to estimate the delivery rate and the amount of drug in the vehicle and the skin. The calculations were obtained using Mathematica® (Wolfram Research, Inc.), a computer software.

It was observed that repeated applications of a fixed dose leads to an accumulation of drug in the skin. This accumulation is counterbalanced by an increase in the flux of the drug to the receptor site[36, 54]. A plateau is reached when the rates of absorption and elimination are equal. This technique can be applied to estimate the dose-loading necessary to achieve a specified release rate. A constant plasma drug concentration is obtained by increasing the application period and /or reducing the removal period which produce a more continuous drug delivery[36].

3.3. Hybrid Approach: First and Second Law of Fick

As previously mentioned, current mathematical models use the Fick's Law of diffusion to describe dermal absorption through the *stratum corneum*[40, 42, 43]. Chemicals, in the *stratum corneum* lipid matrix, diffuse from high to low concentration according to Fick's First Law. The fraction of a chemical dose that is absorbed through the skin over a specified period of time is constant, and will remain constant at various concentrations of chemical applied in the skin surface.

Schumm and collaborators [40] propose another approach to the mathematical modelling of the chemical kinetics in the *stratum corneum* lipid matrix. They represented the lipid structure as a network where the lipid regions are represented as nodes and used three models to describe the process by which solute transfers between two adjacent nodes, based on Fick's Law.

The first model is designed to have a linear solute transfer. To node A with N_A molecules, a fraction of its molecule will be at the A-B interface during each time interval as a function of the relative interface sizes and the diffusivity of the solute.

$$(21) \quad \frac{(dN_{iA}/N_A)}{d_t} = \frac{(S_{AB}D)}{(S_{Atot}R_A^2)}$$

Where dN_{iA} is the number of solute molecules within node A migrating to the interface of nodes A and B, during the time interval d_t , S_{AB} is the surface area shared by nodes A and B, S_{Atot} is the total surface area of node A, D is solute diffusivity in node A, and R_A is the radius of the region represented by node A.

The molecules in node A at the interface of node A with B will partition to node B if they have sufficient energy to cross the node boundary. The Maxwell-Boltzmann distribution

(exemplified in Figure 6) characterizes the energy of a group of molecules. The molecules with higher energies will be on the right side of the distributions and the lower energy will be on the left.

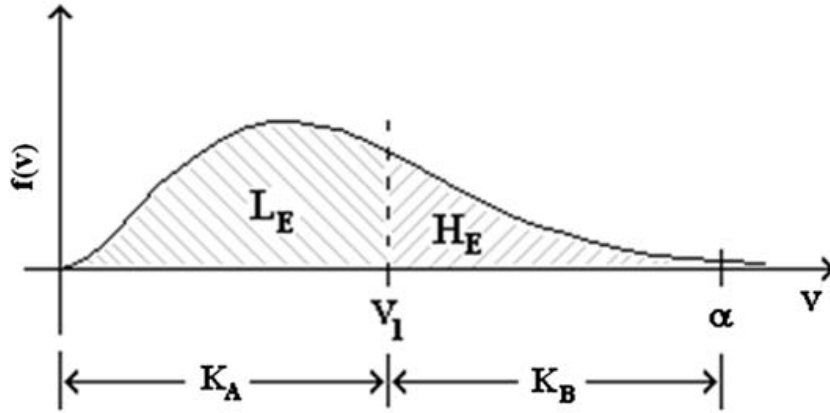


Figure 6. Maxwell-Boltzmann distribution: L_E , Low energy molecules; H_E , High energy molecules; $K_{A(B)}$, Solubility of node A (B); α , Upper limit of integration for N_A ; V_1 , Upper limit integration for L_E .

The total area under the distribution is the number of solute molecules in node A.

$$(22) \quad L_{EA} + H_{EA} = N_A$$

The molecules that partition from node A to node B are the molecules at the A-B interface sufficient energy to cross the node boundary.

$$(23) \quad \frac{dN_{AB}}{dt} = (H_{EA}/N_A)dN_{iA}/dt = \frac{H_{EA}S_{AB}D}{(S_{Atot}R_A^2)}$$

The solute level of node A is then update with the net difference of the transfer between node A and B.

$$(24) \quad \frac{dN_{AB}}{dt} = \frac{dN_{BA}}{dt} - \frac{dN_{AB}}{dt}$$

The second is designed to increase solute transfer from nodes with a high to low solute concentration to low concentrations. Higher solute concentrations cause physical-chemical changes in the lipid matrix that decrease its barrier properties. When the quantify A is greater than B, diffusivity in A will be greater than diffusivity in B. The difference induces a gradient increasing the transfer from node A to node B. And the third model is designed to enforce a node capacity and allow only a finite amount of solute in a node at any given time[40]. This model calculates the fraction y to transfer from node A to node B with the fraction x of N_B over N_{Bmax} .

$$(25) \quad \frac{dN_{AB}}{dt} = (H_{EA}/N_A) y dN_{iA}/dt = \frac{H_{EA}S_{AB}D}{(S_{Atot}R_A^2)}$$

The equation $y(x)$ is given for a rolloff model and an exponential model. In the rolloff the transfer as node B reaches its capacity (when x tends to 1) and in exponential mode exponentially decays the transfer as node B reaches its capacity.

$$(26) \quad y(x) = \frac{(1 + \exp(-a(1-x)))}{(1 - \exp(-a))} \text{ (rolloff model)}$$

And

$$(27) \quad y(x) = \frac{\exp(-ax) - \exp(-a)}{(1 - \exp(-a))} \text{ (exponential model)}$$

Schum and team simulated the basic models over time and differing surface solute concentrations and they found that any amount of solute in node A is the same fraction of the solute transferred to node B, which mimics Fickian diffusion. They also found that when the transference of solute through all nodes is integrated, the fraction of solute transferred remains constant across a range of doses, which also resembles Fickian diffusion. Higher node capacities result in higher solute transfer rates[40].

Furthermore, Siepmann and collaborators mentioned several theories based on diffusion Fick's Law, and conclude that the mathematical treatment can be rather straightforward, if drug release is controlled with constant diffusion coefficients[34]. They distinguished two types of systems: reservoir system and monolithic systems, as illustrated by Figure 7. The reservoir system is surrounded by a release rate controlling barrier membrane. In the monolithic system there is no local separation between a drug reservoir and the release rate controlling barrier [34].

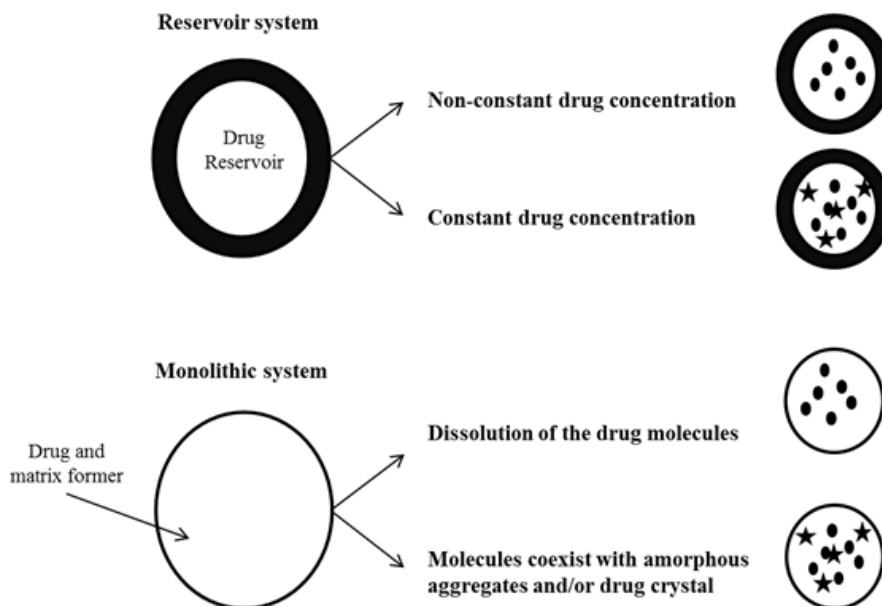


Figure 7.Representation of reservoir and monolithic system

In the reservoir device, if initial drug concentration is below drug solubility, released drug molecules are not replaced and the drug concentration at the inner membrane's surface decrease with time. Still, if the initial drug concentration is higher than the drug solubility, release molecules are replaced by the (partial) dissolution of drug crystal/amorphous aggregates, resulting in constant drug concentrations at the inner membrane's surface. In the monolithic device, the system geometry has influence on the resulting drug release kinetics. If the initial concentration is below drug solubility, the drug molecules are dissolved within the carrier material. If not, dissolved drug molecules coexist with amorphous aggregates and/or drug crystals[34, 55].

3.4. Laplace Transform

The expression of the transport of a solute through skin involves a number of steps in a space and time variant process that it is not easy. It is not straightforward to describe the process in a single equation due to the complexity of the equations [38]. Laplace Transform can be used to describe skin permeation of drug and metabolite, admitting first order kinetics.

Laplace transform is an integral transformation used to resolve ordinary and partial differential equations[33, 38, 39, 56, 57]. Laplace transform is defined by:

$$(28) \quad \hat{C}(x, s) = \mathcal{L} \{ C(x, t) \} = \int_0^{\infty} C(x, t) e^{-st} dt$$

Where \mathcal{L} is the Laplace operator, s is the Laplace variable and the hat over the function denotes the Laplace transform.

Laplace transform reduces the partial differential diffusion equation into an ordinary differential equation which is much easier to solve, and his way, the Laplace transform of the diffusion equation is as following:

$$(29) \quad s\hat{C}(x, s) - C(x, 0) = D \frac{d^2}{dx^2} \hat{C}(x, s)$$

Where $C(x, 0)$ is the initial condition. If the skin starts out without any chemical, $C(x, 0) = 0$ and the above equation becomes:

$$(30) \quad \hat{C}(x, s) = A(s) \sinh\left(\frac{x}{h} \sqrt{st_d}\right) + B(s) \cosh\left(\frac{x}{h} \sqrt{st_d}\right)$$

Where h is the thickness of the SC, $t_d = h^2/D$ is the characteristic time of diffusion, and $A(s)$ and $B(s)$ are functions of only s , which are determined from boundary conditions and h can also be further manipulated to calculate the transdermal flux and cumulative drug transport[38, 58-60].

Simon and collaborators indicated that the equations of drug delivery can be solved using the Laplace transform[37]. The Laplace transform-based solution strategy was chosen due to the direct calculation of an effective *time constant*. This *time constant* is the time it takes to achieve a desired release rate and steady-state concentrations in the skin.

In other hands Roberts and team considered the kinetics associated with the reservoir effect of the *stratum corneum*[45]. As the fraction unbound is less than unity, the link leads to a slower diffusion. If binding/partitioning is not fast compared to diffusion, the single diffusion equation has to be replaced by coupled partial differential equations:

$$(31) \quad \frac{\partial C_u}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C_u}{\partial x^2} - K_{on} + K_{off} C_u$$

$$(32) \quad \frac{\partial C_b}{\partial t} = K_{on} - K_{off} C_b$$

Where C_b and C_u are concentrations of bound and unbound solutes, D is the diffusion coefficient if the unbound solute (bound solute is assumed immobile, or its diffusion is so slow that it can be neglected) and K_{on} and K_{off} are binding and unbinding rate constants.

Taking Laplace transform of these equations and expression of \hat{C}_b using \hat{C}_u yields:

$$(33) \quad D \frac{\partial^2 \hat{C}_u}{\partial x^2} = \left(s + \frac{sK_{on}}{s+K_{off}} \right) \hat{C}_u$$

The only difference between simple diffusion equation in the Laplace domain is that s is replaced by a function $g(s)$, where:

$$(34) \quad g(s) = s + \frac{sK_{on}}{s+K_{off}}$$

Thus equations for the unbound concentration and flux through *stratum corneum* can be obtained by replacing s with $g(s)$ in the above equations [38, 61].

Hallmark studies of Hadgraft and collaborators [58, 59] and Guy and Hadgraft[60]make them the pioneers in the use of Laplace transform for mathematical modelling of skin transport. Recently Anissimov and Roberts [61]following these ideas used the numerical inversion of Laplace transform solutions to the diffusion equation for simulations and data analysis of skin transport experiments. Bando et al.[62, 63] developed a two-layer diffusion model which incorporates both polar and non-polar pathways and Laplace transformed equations were obtained to describe skin permeation of a drug or substance [38].

3.5. Scaled Particle Theory

There are three parameters that are most required to predict skin permeability, that are, partition coefficient, diffusion coefficient and path length. The partition coefficient involves partitioning between multiple phases; the *stratum corneum* lipid matrix and the vehicle, the keratinocytesand the vehicle, the lipids and the keratinocytes, and between the *stratum corneum* and deeper skin layers. The partition coefficient between the *stratum corneum* and the vehicle is estimated from structure-activity algorithms relating experimental measurements:

$$(35) \quad K_{SC/v} = aP^b$$

a has been reported to be close to 1, while b varies from about 0.4 to 0.9 depending on the data set used in the regression.

For estimating $K_{SC/v}$ were derived expressions that consider the individual contributions of the lipid and keratinocytes[38, 64].

$$(36) \quad K_{SC/v} = \phi_{lip}K_{lip/v} + \phi_{cor}K_{cor/v}$$

Where $K_{lip/v}$ is the lipid-vehicle partition coefficient, $K_{cor/v}$ is the keratinocytes-vehicle partition coefficient, and ϕ_{lip} and ϕ_{cor} are the volume fractions of lipid and keratinocytes in the *stratum corneum*, respectively, which together sum to 1.

Scaled Particle Theory has been used to simplify utilization of molecular details of structures in predicting skin permeability[65]. There are two factors solute partitioning into lipid bilayers. They are a chemical and physical factor. In the chemical factor, lipid bilayer is more hydrophobic than the surrounding aqueous conditions. In the physical factor, lipid chains in the bilayer are highly organized, thus reducing the partition coefficient [38, 66, 67].

The theory showed that the partition coefficient of a solute from water into *stratum corneum* lipid matrix is comparable to that into an isotropic solvent. Thus Scaled Particle Theory reasonably mimics the chemical environment in the *stratum corneum* lipid matrix. Several solvents have been used as model for *stratum corneum* lipids (octanol, hexadecane, olive oil, butadiene and dodecadiene). The most convenient seems to be octanol[38, 64, 68-73].

Mitragotri and collaborators also used this theory. They developed an equation to describe solute diffusion in lipid bilayers. The theory calculates diffusion coefficient based on the amount of work required creating a free volume to allow for solute diffusion[38].

3.6. Homogeneous Membrane Model

The geometry of the *stratum corneum* and the detailed arrangement of both keratinocytes and lipids makes a great deal of difference in model calculations, as it affects the path length for diffusion, then the lipid tortuosity factor is important[71, 74, 75]. Since diffusion is primarily transcellular, then the lipid tortuosity factor is of secondary importance. Being the keratinocytes-phase transport reduced the impact of lipid tortuosity increases[38].

Frasch and Barbero studied transient diffusion through model structures of the *stratum corneum* including both ordered and disordered keratinocyte-phases[76]. They found that diffusion was well described by a homogeneous membrane model; however, the effective diffusion coefficient, D^* , and the effective diffusion path length for the ordered structure, h_{SC}^* , were different from the input variables[38, 76]. h_{SC}^* is given by:

$$(37) \quad h_{SC}^* = N(d + t + g)$$

The value of D^* was not expressed so compactly. Expressions of the flux and lag time relative to a homogeneous membrane have the same microscopic lipid diffusivity D_0 and thickness h_0 .

$$(38) \quad \frac{J_0}{J^*} = 1 + \frac{\alpha\phi}{\sigma} + \frac{\alpha^2\phi^2}{4(1-\phi)}$$

And

$$(39) \quad \frac{t_{lag*}}{t_{lag0}} = \frac{\sigma(1+\alpha\phi)}{\alpha} \left(1 + \frac{\alpha\phi}{\sigma} + \frac{\omega}{(1+\omega^2)} \frac{\alpha^2\phi^2}{(1-\phi)} \right)$$

Where $\alpha = d/t$ is the keratinocyte aspect ratio represented by dividing the length (d) by the thickness (t) of the keratinocytes; $\sigma = s/t$, $\phi = t/(t+g)$ and $\omega = d_L/d_s$ is the offset ratio. The flux and lag time relative are estimated by using of the microscopic flux/lag time and by effective flux/lag time [38]. Equations (37) and (39) were been validated for isotropic lipids and impermeable keratinocyte[76]. A diagram for the ordered structure is depicted in Figure 8.

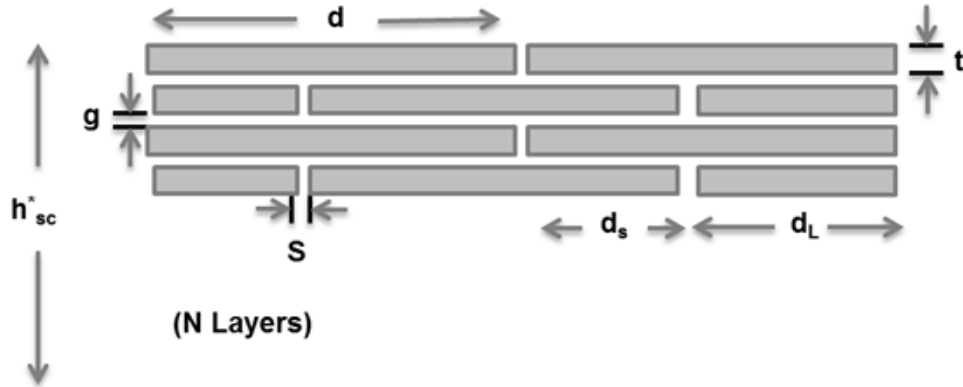


Figure 8. Schematic diagram for the ordered structure: h_{sc}^* , effective diffusion path length for the ordered structure; d, d_s and d_L , length; t , thickness ; g and s , space between keratinocytes.

4. Conclusion

The theoretical models are very important when we are facing nano research and micro research. The mathematical modelling of skin has made notable progress in the last decades. Due to the advances in information technology the accuracy of these models steadily increases and they become easier to apply. It would be more favourable to use a single general theory applicable to any type of drug delivery system; however, there is a broad spectrum of different mathematical models, applicable to specific types of devices differing in geometry, drug and excipient type.

Fick's Law uses the concept of the passive diffusion to describe the drug delivery through the skin. The drug enters to the innermost layers of the skin through passive diffusion and this concept is the main principle used in the mathematical models.

The skin permeability is described by three parameters: partition coefficient, diffusion coefficient and path length. The first involve partitioning between multiple phases: *stratum corneum* and vehicle, lipids, keratinocytes, among others. The partitioning coefficient is also called by permeability coefficient and its estimate through mathematical models can be used to predict the mass of drug that penetrates the skin from a given exposure. Several studies have reported the application of mathematical modelling for estimating permeability coefficient to calculate systemic uptake.

Two major challenges lay ahead in theoretical transdermal research. A first major challenge would be to combine the mathematical theories with models quantifying drug transport in the living organism, including drug distribution in the various organs and even within the different cell compartments. The second major challenge regards achieving a computational skin model that may validate molecular principles in dermic diffusion as a foreground of future devices.

Bibliography

- [1] G. Cevc, U. Vierl, Nanotechnology and the transdermal route: A state of the art review and critical appraisal, *Journal of Controlled Release*, 141 (2010) 277-299.
- [2] K. van der Maaden, W. Jiskoot, J. Bouwstra, Microneedle technologies for (trans)dermal drug and vaccine delivery, *Journal of Controlled Release*, 161 (2012) 645-655.
- [3] P. Elias, Epidermal lipids, barrier function, and desquamation., *J. Invest. Dermatol.*, 80 (1983) 44s-49s.
- [4] A. Arora, M.R. Prausnitz, S. Mitragotri, Micro-scale devices for transdermal drug delivery, *International Journal of Pharmaceutics*, 364 (2008) 227-236.
- [5] J.A. Mikszta, J.B. Alarcon, Improved genetic immunization via micromechanical disruption of skin-barrier function and targeted epidermal delivery., *Nat. Med.*, 8 (2002) 415-419.
- [6] J. Gupta, E.I. Felner, M.R. Prausnitz, Minimally Invasive Insulin Delivery in Subjects with Type 1 Diabetes Using Hollow Microneedles, *Diabetes technology & therapeutics*, 11 (2009).
- [7] R. Potts, V. Mak, R. Guy, M. Franconer, Strategies to enhance permeability via stratum corneum lipid pathways, *Adv. Lipid Res.*, 24 (1991) 173-210.
- [8] J. Kanitakis, Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin, *Eur. J. Dermatol.*, 12 (4) (2002) 390-399.
- [9] S. M. Bal, Z. Ding, E. v. Riet, W. Jiskoot, J. Boustra, Advances in transcutaneous delivery: do all ways lead to rome?, *J. Control. Release*, 148 (3) (2010) 266-282.
- [10] T. Tanner, R. Marks, Delivering drugs by the transdermal route: review and comment, *Skin. Res. Technol.*, 14 (3) (2008) 249-260.
- [11] G. Chopda, Transdermal Drug Delivery Systems: A Review, in, available from <http://www.pharmainfo.net/reviews/transdermal-drug-delivery-systems-review>, 2006.
- [12] R.K.Subedi, Sy Oh, M.-K. Chun, h.-k Choi, Recent advances in transdermal drug delivery, *Arch. Pharm. Res.*, 33 (3) (2010) 339-351.
- [13] M.A. Teo, C. Shearwood, L.J. Ng KC, M. S., In vitro and in vivo characterization of MEMS microneedles., *Biomed Microdevices*, 7(1) (2005) 47-52.
- [14] P. Valenzuela, J.A. Simon, Nanoparticle delivery for transdermal HRT, *Maturitas*, 73 (2012) 74-80.
- [15] D. Pinaki, RR Patlolla, M. Singh, Interaction of nanoparticles and cellpenetrating peptides with skin for transdermal drug delivery., *Mol Membr Biol*, 27(7) (2010) 247-259.
- [16] P. Connolly, C. Cotton, F. Morin, Opportunities at the skin interface for continuous patient monitoring: a reverse iontophoresis model tested on lactate and glucose., 1 (1) (2002) 37-41.
- [17] T.S. Ching, P. Connolly, Simultaneous transdermal extraction of glucose and lactate from human subjects by reverse iontophoresis, *International journal of Nanomedicine*, 3 (2) (2008) 211-223.
- [18] R.L. Thangapazham, S. Sharad, R.K. Maheshwari, Skin regenerative potentials of curcumin, *BioFactors*, 39 (2013) 141-149.
- [19] M.C.Y. Heng, Wound healing in adult skin: aiming for perfect regeneration, *International Journal of Dermatology*, 50 (2011) 1058-1066.

- [20] D.R. Th'évenot, K. Toth, R.A. Durst, G.S. Wilson, Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification., *Biosens. Bioelectron.*, 16 (2001) 121-131.
- [21] D. Grieshaber, R. MacKenzie, J. Voros, E. Reimhult, Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures, *Sensors*, 8 (2008) 1400-1458.
- [22] G.S. Wilson, R. Gifford, Biosensors for real-time in vivo measurements, *Biosensors and Bioelectronics*, 20 (2005) 2388-2403.
- [23] K. E., Toghil, R.G. Compton, Electrochemical Non-enzymatic Glucose Sensors: A Perspective and an Evaluation, *Int. J. Electrochem. Sci*, 5 (2010) 1246 - 1301.
- [24] F. Lisdat, F.W. Scheller, Principles of sensorial radical detection—a minireview., *Anal. Lett.*, 33 (2000) 1-16.
- [25] S. Kahlert, G. Reiser, Glial perspectives of metabolic states during cerebral hypoxia-calcium regulation and metabolic energy., *Cell Calcium*, 36 (2004) 295–302.
- [26] O. Niwa, R. Kurita, T. Horiuchi, K. Torimitsu, *Anal. Chem.*, 70 (1998) 89–93.
- [27] N. Gajovic, Binyamin, G., Warsinke, A., Scheller, F.W., Heller, A., Operation of a miniature redox hydrogel-based pyruvate sensor in undiluted deoxygenated calf serum., *Anal. Chem.*, 72 (2000) 2963–2968.
- [28] D.G. Georganopoulou, R. Carley, D.A. Jones, M.G. Boutelle, Development and comparison of biosensors for in vivo applications., *Faraday Discuss.*, 116 (2000) 291–303.
- [29] N.V. Kulagina, L. Shankar, A.C. Michael, Monitoring glutamate and ascorbate in the extracellular space of brain tissue with electrochemical microsensors., *Anal. Chem.*, 71 (1999) 5093–5100.
- [30] B.J. Venton, K.P. Troyer, R.M. Wightman, Response times of carbon fiber microelectrodes to dynamic changes in catecholamine concentration., *Anal. Chem.*, 74 (2002) 539–546.
- [31] D.F. Williams, A model for biocompatibility and its evaluation, *Journal of Biomedical Engineering*, 11 (1989) 185-191.
- [32] M. Ochalek, H. Podhaisky, H.H. Ruettinger, J. Wohlrab, R.H.H. Neubert, SC lipid model membranes designed for studying impact of ceramide species on drug diffusion and permeation – Part II: Diffusion and permeation of model drugs, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 82 (2012) 360-366.
- [33] M. Ochalek, H. Podhaisky, H.H. Ruettinger, R.H.H. Neubert, J. Wohlrab, SC lipid model membranes designed for studying impact of ceramide species on drug diffusion and permeation, Part III: Influence of penetration enhancer on diffusion and permeation of model drugs, *International Journal of Pharmaceutics*, 436 (2012) 206-213.
- [34] J. Siepmann, F. Siepmann, Mathematical modeling of drug delivery, *International Journal of Pharmaceutics*, 364 (2008) 328-343.
- [35] E.B. Nauman, K. Patel, P. Karande, Design of optimized diffusion-controlled transdermal drug delivery systems, *Drug Development & Industrial Pharmacy*, 37 (2011) 93-102.
- [36] L. Simon, Repeated applications of a transdermal patch: Analytical solution and optimal control of the delivery rate, *Mathematical Biosciences*, 209 (2007) 593-607.
- [37] L. Simon, K.S. Kim, K. Kanneganti, Effects of epidermal turnover on the dynamics of percutaneous drug absorption, *Mathematical Biosciences*, 229 (2011) 16-21.
- [38] S. Mitragotri, Y.G. Anissimov, A.L. Bunge, H.F. Frasch, R.H. Guy, J. Hadgraft, G.B. Kasting, M.E. Lane, M.S. Roberts, Mathematical models of skin permeability: An overview, *International Journal of Pharmaceutics*, 418 (2011) 115-129.
- [39] R. Manitz, W. Lucht, K. Strehmel, R. Weiner, R. Neubert, On mathematical modeling of dermal and transdermal drug delivery, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 87 (1998) 873-879.
- [40] P. Schumm, C.M. Scoglio, D. van der Merwe, A network model of successive partitioning-limited solute diffusion through the stratum corneum, *Journal of Theoretical Biology*, 262 (2010) 471-477.

- [41] B.P. Van Milligen, On the applicability of Fick's law to diffusion in inhomogeneous systems, *Eur.J.Phys.*, 26 (2005) 913.
- [42] D. Van der Merwe, J.D. Brooks, R. Gehring, R.E. Baynes, N.A. Monteiro-Riviere, J.E. Riviere, A physiologically based pharmacokinetic model of organophosphate dermal absorption., *Toxicol.Sci.*, 89 (2006) 188–204.
- [43] D. Fitzpatrick, J. Corish, B. Hayes, Modelling skin permeability in risk assessment — the future., *Chemosphere*, 55 (2004) 1309–1314.
- [44] T. Higuchi, Physical chemical analysis of percutaneous absorption process from creams and ointments., *J. Soc. Cosmet. Chem.*, 11 (1960) 85-97.
- [45] M.S. Roberts, Cross, S.E., Pellett, M.A., Skin transport. In: Walters, K.A. (Ed.), *Dermatological and Transdermal Formulations*, Marcel Dekker, New York, (2002) 89-195.
- [46] C. Herkenne, A. Naik, Y. Kalia, J. Hadgraft, R. Guy, Dermatopharmacokinetic prediction of topical drug bioavailability in vivo., *J. Invest. Dermatol.*, 127 (2007) 887-894.
- [47] H. Jaganathan, B. Godin, Biocompatibility assessment of Si-based nano- and micro-particles, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64 (2012) 1800-1819.
- [48] N. Sekkat, Y.N. Kalia, R.H. Guy, Biophysical study of porcine ear skin in vitro and its comparison to human skin in vivo, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 91 (2002) 2376-2381.
- [49] Y.N. Kalia, F. Pirot, R.H. Guy, Homogeneous transport in a heterogeneous membrane: Water diffusion across stratum corneum in vivo., *Biophys J*, 71 (1996) 2692-2700.
- [50] R.B. Walker, E.W. Smith, The role of percutaneous penetration enhancers., *Adv. Drug Deliver.*, 18 (1996) 295–301.
- [51] A.C. Williams, B.W. Barry, Penetration enhancers., *Adv. Drug Deliver.*, 56 (2004) 603–618.
- [52] M.L. Francoeur, G.M. Golden, R.O. Potts, Oleic acid: its effects on stratum corneum in relation to (trans)dermal drug delivery., *Pharm. Res.*, 7 (1990) 621–627.
- [53] M. Walker, J. Hadgraft, Oleic-acid—a membrane fluidizer or fluid within the membrane., *Int. J. Pharm.*, 71 (1991) R1-R4.
- [54] K. Kubota, F. Dey, S.A. Matar, E.H. Twizell, A repeated-dose model of percutaneous drug absorption, *Appl. Math. Model.*, 26 (2002) 529.
- [55] R. Baker, *Controlled Release of Biologically Active Agents.*, in, John Wiley & Sons, New York, 1987.
- [56] J. Crank, *The Mathematics of Diffusion.*, in, Clarendon Press, Oxford, 1975.
- [57] H. Carslaw, J. Jaeger, *Conduction of Heat in Solids.*, in, Oxford University Press, Oxford, Great Britain, 1959.
- [58] J. Hadgraft, The epidermal reservoir: a theoretical approach., *Int. J. Pharm.*, 2 (1979) 265–274.
- [59] J. Hadgraft, Theoretical aspects of metabolism in the epidermis., *Int. J. Pharm.*, 4 (1980) 229–239.
- [60] R.H. Guy, J. Hadgraft, A theoretical description relating skin penetration to the thickness of the applied medicament., *Int. J. Pharm.*, 6 (1980) 321-332.
- [61] Y.G. Anissimov, M.S. Roberts, Diffusion modeling of percutaneous absorption kinetics: 4. Effects of a slow equilibration process within stratum corneum on absorption and desorption kinetics., *J. Pharm. Sci.*, 98 (2009) 772–781.
- [62] H.S.M. Bando, F. Yamashita, Y. Takakura, M. Hashida, In vivo evaluation of acyclovir prodrug penetration and metabolism through rat skin using a diffusion/ bioconversion model., *Pharm. Res.*, 14 (1997) 56-62.
- [63] H.S.M. Bando, T. Takagi, F. Yamashita, Y. Takakura, M. Hashida, Analysis of in vitro skin penetration of acyclovir prodrugs based on a diffusion model with a metabolic process., *Int. J. Pharm.*, 135 (1996) 91-102.

- [64] J.M. Nitsche, T.-F. Wang, G.B. Kasting, A two-phase analysis of solute partitioning into the stratum corneum., *J. Pharma. Sci.*, 95 (2006) 649-666.
- [65] S. Mitragotri, A theoretical analysis of permeation of small hydrophobic solutes across the stratum corneum based on Scaled Particle Theory., *J. Pharm. Sci.*, 91 (2002) 744-752.
- [66] E. Egberts, S. Marrink, H. Berendsen, Molecular dynamics simulation of a phospholipid membrane., *Eur. Biophys. J.*, 22 (1974) 423-436.
- [67] D. Tieleman, S. Marrink, H. Berendsen, A computer perspective of membranes: molecular dynamics studies of lipid bilayer systems., *Biochim. Biophys.*, (1997) 235-270.
- [68] P. Raykar, M. Fung, B. Anderson, The role of protein and lipid domains in the uptake of solutes by human stratum corneum., *Pharm. Res.*, 5 (1998) 140-150.
- [69] B. Anderson, P. Raykar, Solute structure–permeability relationships in human stratum corneum., *J. Invest. Dermatol.*, 93 (1989) 280-286.
- [70] T. Xiang, B. Anderson, The relationship between permeant size and permeability in lipid bilayer membranes., *J. Membr. Biol.*, 140 (1994) 111-122.
- [71] M.E. Johnson, D. Blankschtein, R. Langer, Evaluation of solute permeation through the stratum corneum: lateral bilayer diffusion as the primary transport mechanism., *J. Pharm. Sci.*, 86 (1997) 1162-1172.
- [72] H. Yamamoto, H. Liljestrand, Partitioning of selected estrogenic compounds between synthetic membrane vesicles and water: effects of lipid components., *Environ. Sci. Technol.*, 38 (2004) 1139-1147.
- [73] J. Kwon, H. Liljestrand, L. Katz, Partitioning of moderately hydrophobic endocrine disruptors between water and synthetic membrane vesicles., *Environ. Toxicol. Chem.*, 25 (2006) 1984-1992.
- [74] A.S. Michaels, S.K. Chandrasekaran, J.E. Shaw, Drug permeation through human skin: theory and in vitro experimental measurement., *Am. Inst. Chem. Eng. J.*, 21 (1975) 985-996.
- [75] T.-F. Wang, G.B. Kasting, J.M. Nitsche, A multiphase microscopic model for stratum corneum permeability. II. Estimation of physicochemical parameters and application to a large permeability database., *J. Pharm. Sci.*, 96 (2007) 3024-3051.
- [76] H.F. Frasch, A.M. Barbero, Steady-state flux and lag time in the stratum corneum lipid pathway: results from finite element models., *J. Pharm. Sci.*, 92 (2003) 2196-2207.