

# Ultrassom contínuo versus pulsado na liberação da hidrocortisona *in vitro*

*Continuous versus pulsed ultrasound in the release of hydrocortisone in vitro*

Claudia Regina Pretto<sup>a</sup>, Bárbara Schmidt<sup>b</sup>, Giovana Sinigaglia<sup>c</sup>, Paula Bianchetti<sup>d</sup>, João Alberto Fioravante Tassinary<sup>e</sup>, Maurício Hillgemann<sup>f</sup>, Simone Stülp<sup>g</sup>

<sup>a</sup>Fisioterapeuta graduada pela Universidade do Vale do Taquari (UNIVATES), Lajeado, RS, Brasil.

<sup>b</sup>Biomédica. Mestranda em Biotecnologia, UNIVATES.

<sup>c</sup>Fisioterapeuta. Mestre em Ciências Ambientais. Professora do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (UNIVATES).

<sup>d</sup>Fisioterapeuta. Mestre em Biotecnologia. Doutoranda em Ciências Farmacêuticas (UFSM). Professora do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (UNIVATES).

<sup>e</sup>Fisioterapeuta. Doutor em Ciências Médicas. Professor do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (UNIVATES).

<sup>f</sup>Químico. Doutor em Química Analítica. Professor da UNIVATES.

<sup>g</sup>Química Industrial. Doutora em Ciência dos Materiais. Professora da UNIVATES.

## RESUMO

**Introdução:** A fonoforese baseia-se na utilização do ultrassom para provocar perturbação dos tecidos, gerando assim, um movimento rápido das partículas, facilitando a absorção do fármaco.

**Objetivo:** Estudar a liberação *in vitro* da hidrocortisona frente à aplicação de fonoforese, nos modos contínuo e pulsado, a fim de avaliar a real eficácia do seu emprego terapêutico.

**Materiais e Métodos:** Para a realização do estudo foi utilizada hidrocortisona em gel, manipulada em farmácia magistral. Foram feitas análises com a membrana de acetato de celulose associado a hidrocortisona com e sem a aplicação da fonoforese, utilizando ultrassom no modo contínuo e pulsado nos tempos de 0, 5, 10, 15 e 20 minutos de aplicação. As análises foram realizadas em triplicata.

**Resultados:** Os resultados sugerem uma maior liberação da hidrocortisona quando associada à onda sônica terapêutica. Foi constatado, também, que o ultrassom no modo contínuo é mais efetivo quando comparado com o modo pulsado a partir de 5 minutos de aplicação. Nos tempos de 10, 15 e 20 minutos o ultrassom ajustado no modo contínuo se mostrou mais efetivo no que diz respeito à liberação do fármaco quando comparado com o modo pulsado, com aumento de 585, 302 e 260% respectivamente.

**Conclusão:** O ultrassom no modo contínuo é mais efetivo quando comparado com o modo pulsado a 5%, a partir de 5 minutos de aplicação, para liberação e permeação da hidrocortisona 1% em sistema de difusão vertical.

**Palavras-chave:** ultrassom; fonoforese; técnicas *in vitro*.

## ABSTRACT

**Introduction:** Phonophoresis is based on the disruption of tissue that generates fast moving particles, facilitating drug absorption.

**Objective:** The aim of this study is to measure the release of hydrocortisone by the application of *in vitro* phonophoresis in continuous and pulsed mode.

**Materials and Methods:** In order to perform the evaluations, hydrocortisone in gel, manipulated in compounding pharmacy, was used. Analysis were made in cellulose acetate membrane associated with hydrocortisone with and without the application of phonophoresis, applying continuous and pulsed ultrasound at the 0, 5, 10, 15 and 20 minute application times. The analyzes were performed in triplicate.

**Results:** The results suggest a greater release of hydrocortisone when associated to the therapeutic sonic wave. It was also found that the ultrasound in the continuous mode is more effective when compared to the pulsed mode after 5 minutes of application. At 10, 15 and 20 minutes the ultrasound adjusted in the continuous mode was more effective. Drug release has increased, when compared to the pulsed mode, in 585, 302 and 260%, respectively.

**Conclusion:** Continuous-mode ultrasound is more effective when compared to pulsed mode at 5%, from 5 minutes of application, for release and permeation of 1% hydrocortisone in a vertical diffusion system.

**Keywords:** ultrasound; phonophoresis; *in vitro* technique.

## Correspondência:

JOÃO ALBERTO TASSINARY  
Universidade do Vale do Taquari (Univates)  
Rua Avelino Tallini 171 – Bairro Universitário  
95914-014 Lajeado, RS, Brasil  
E-mail: [tassinary@gmail.com](mailto:tassinary@gmail.com)

Recebido em 15/03/2018, aceito em 17/08/2018



Exceto onde especificado diferentemente, a matéria publicada neste periódico é licenciada sob forma de uma licença Creative Commons BY-NC 4.0 Internacional. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>

## INTRODUÇÃO

O sistema tegumentar é composto pela derme e epiderme, formando assim o maior órgão do corpo humano. Esse sistema era reconhecido como um obstáculo impermeável, com o objetivo de proteger o corpo. No entanto, atualmente, reconhece-se que a pele intacta pode ser usada como uma porta de administração local ou sistêmica de substâncias<sup>1</sup>. A administração transdérmica de fármacos oferece muitas vantagens sobre outras vias de administração, tais como: obter efetividade no tratamento associada à facilidade de aplicação, transferência competente do princípio ativo e inibição de potenciais efeitos sistêmicos colaterais<sup>2</sup>.

Na prática clínica são inúmeros os recursos eletrofototerapêuticos que vêm sendo estudados, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, para potencializar a permeação transdérmica de fármacos e facilitar o tratamento das lesões nos tecidos moles e alívio da dor. Dentre eles destaca-se a fonoforese. Segundo Lee et al.<sup>3</sup>, ela aumenta a liberação transdérmica de várias drogas de baixo peso molecular e proteínas de alto peso molecular na pele humana<sup>3</sup>. Além disso, o efeito mecânico da onda sonora proporciona tratamento de distúrbios musculoesqueléticos, uma vez que tem efeito benéfico no reparo tecidual.

O ultrassom (US) foi descoberto em 1917, produzido por um cristal de quartzo vibrante e submetido a uma corrente de alta frequência. Hoje utilizam-se cristais cerâmicos sintéticos para a fabricação. A liga Pb-Zr-Ti é um dos materiais aplicados que garante a passagem de corrente elétrica, e é excelente para conversão em vibrações mecânicas que têm extrema importância para o bom funcionamento do equipamento, visto que as vibrações acionam partículas que geram ondas por efeito de compressão e decompressão<sup>4</sup>.

Há décadas profissionais da área da saúde utilizam o ultrassom para a aplicação de medicamentos tópicos com o objetivo de aumentar o nível de penetração do fármaco e diminuir efeitos adversos do medicamento no organismo. A técnica se baseia na utilização das forças da corrente acústica gerada pelo ultrassom. Elas influenciarão na migração das moléculas de fármacos através da pele<sup>5</sup>.

Diversos ativos esteroides podem ser aplicados por fonoforese, assim como muitos outros fármacos anti-inflamatórios não esteroides<sup>6</sup>. O uso da hidrocortisona é clinicamente muito difundido em função do seu efeito anti-inflamatório, sendo utilizado em diversas patologias, como bursite, tendinite e ponto gatilho. A fonoforese associada à hidrocortisona<sup>7</sup> também tem sido citada como positiva no tratamento de muitas afecções cutâneas, como, por exemplo, psoríase, esclerodermia e prurido<sup>8,9</sup>.

A onda sonora pode ser utilizada como promotora transdérmica de fármacos, tanto na ciclagem do equipamento no modo contínuo (efeito térmico) quanto pulsado (efeito mecânico)<sup>10</sup>. Os efeitos térmicos e o não térmico são importantes, e ambos podem aumentar a difusão de princípios ativos aplicados topicamente<sup>11</sup>.

Não existe, no entanto, um consenso quanto a qual parâmetro da onda sonora atua de forma mais efetiva na fonoforese (pulsada ou contínua), e também são raras as investigações *in vitro* que discutem o efeito da onda ultrassônica na liberação da hidrocortisona. Levando em consideração a ampla utilização da técnica associada ao fármaco na prática clínica e ao déficit de estudos acerca do assunto, o objetivo da pesquisa foi avaliar o efeito do ultrassom contínuo e pulsado associado à hidrocortisona 1% na liberação do fármaco em sistema de difusão vertical *in vitro*.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Neste estudo foi realizada a avaliação *in vitro* da permeação da hidrocortisona com e sem a aplicação do ultrassom contínuo e pulsado. Por se tratar de um estudo *in vitro*, há a dispensabilidade de aprovação em um Comitê de Ética em Pesquisa (CEP).

### Reagentes e preparo das amostras

Foram utilizadas pele de muda de cobra *Boa Constrictor*. Após a coleta da pele, esta foi dissecada por dois dias em temperatura ambiente. Para a utilização da pele da cobra foram descartadas partes septadas e com furos.

Para análise da liberação, utilizou-se Acetato de hidrocortisona comercial (1%) contendo gel de carbopol em meio hidroalcoólico. Essa concentração de hidrocortisona foi utilizada por ser comumente administrada na prática clínica fisioterapêutica.

Nos ensaios de liberação utilizou-se um sistema de difusão vertical com membrana de acetato de celulose para analisar a liberação do ativo quando em contato com a pele humana, de acordo com as normas da *Food and Drug Administration* (FDA)<sup>12</sup>, com solução receptora contendo água/álcool etílico.

### Aplicação *in vitro* do ultrassom terapêutico

O aparelho de ultrassom utilizado no experimento foi da marca *Tone Derm*, com cabeçote de 1 MHz, ocorrendo seu uso na área da fisioterapia nas frequências de 1 e 3 MHz. O equipamento foi fornecido pelo Núcleo de Eletrofototóquímica e Materiais Poliméricos da UNIVATES. Os parâmetros utilizados foram: modo contínuo com dose de 1,0W/cm<sup>2</sup> e modo pulsado 5%, com frequência de pulso de 32 Hz e dose de 1,0W/cm<sup>2</sup>.

## Análise de liberação da hidrocortisona em sistema de difusão vertical

As amostras foram analisadas com e sem a aplicação da fonoforese, sendo analisado o grupo controle e o grupo tratado. O grupo controle é composto por permeação e liberação do princípio ativo sem a utilização de ativadores, e o grupo tratado é composto por permeação e liberação do fármaco com a utilização do ultrassom terapêutico. As amostras foram analisadas nos tempos de 0, 5, 10, 15 e 20 minutos, todas realizadas em triplicata. As análises de liberação da hidrocortisona foram realizadas em uma célula de difusão vertical tipo Franz, com solução receptora de água deionizada e álcool etílico 99,5% com proporção de 1:1, contendo uma membrana de acetato de celulose (*Sartorius Stedim Biotech*) com porosidade de  $0,45\mu\text{m}$  e área de  $7,06\text{cm}^2$ . Essa foi utilizada com a finalidade de separar os compartimentos doador e receptor, formando uma barreira não interferente a um fluido denominado doador à solução receptora<sup>11</sup>.

A célula de difusão foi introduzida em banho termostático (MARCONI) a  $37^\circ\text{C}$ , simulando a temperatura corporal. Em contato com a membrana foi adicionado o agente acoplador, hidrocortisona em gel. Foram comparados os grupos tratados e controle, no qual o tratado é o grupo que apresenta os benefícios da fonoforese e o grupo controle é o fármaco sem a associação do US. A avaliação da quantidade de hidrocortisona permeada foi realizada de acordo com estudo prévio do grupo de pesquisa<sup>7</sup>.

### Análise estatística

Os resultados foram expressos em termos da média e erro padrão da média (EPM). Foi utilizado o teste de *Shapiro-Wilk* para averiguar a normalidade dos dados. Para a comparação de parâmetros envolvendo dois grupos, foi utilizado o teste *t* de *Student*. Em todos os casos, os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando  $p < 0,05$ . Todas as análises foram realizadas utilizando o *software* SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) versão 18.0.

## RESULTADOS

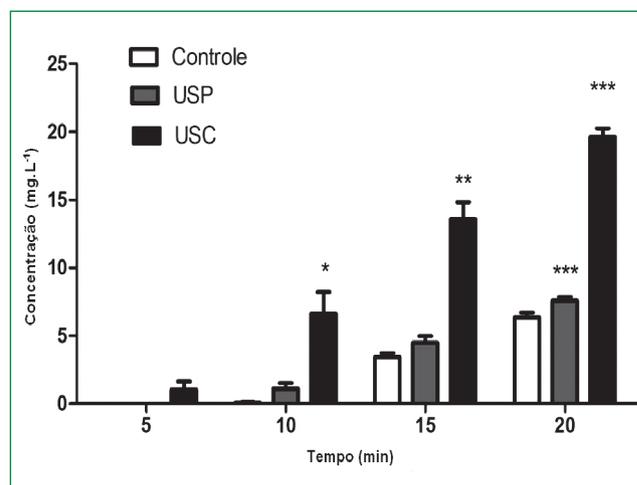
### Análise de liberação da hidrocortisona

A partir de um sistema de difusão vertical com membrana de acetato de celulose avaliou-se a liberação de hidrocortisona com e sem aplicação de onda ultrassônica. Para a realização da análise, efetuou-se varredura de toda a faixa espectral (190-900 nm), apresentando a hidrocortisona pico com absorvância máxima em 254 nm. Os dados obtidos são apresentados na **Figura 1**, que mostra os resultados de

liberação de hidrocortisona 1%, com e sem aplicação de ultrassom contínuo e pulsado, nos tempos de 5, 10, 15 e 20 minutos.

Conforme representado na **Figura 1**, a aplicação do ultrassom pulsado (USP) apresentou diferença estatística em termos de liberação do ativo para o meio receptor quando comparado com o controle apenas no tempo de 20 minutos. Já o ultrassom ajustado no modo contínuo (USC) apresentou um incremento significativo de liberação do ativo nos tempos 10, 15 e 20 minutos, quando comparado com o grupo controle.

Em termos de valores encontrados neste estudo, com variação estatística, visualizados no gráfico da **Figura 1**, para o tempo de 10 minutos de avaliação de permeação, para o grupo controle, o valor médio foi de  $0,071433\text{mgL}^{-1}$ , enquanto que para o ultrassom contínuo o valor é igual a  $6,629067\text{mgL}^{-1}$  ( $p=0,0496$ ). Já para o tempo de 15 minutos, na comparação do controle com o modo contínuo, os valores médios encontrados são, respectivamente,  $3,4486\text{mgL}^{-1}$  e  $13,55567\text{mgL}^{-1}$  ( $p=0,0178$ ). Ainda, no tempo de 20 minutos, a quantidade permeada para o grupo controle foi de  $6,35\text{mgL}^{-1}$ , com incremento para o modo pulsado, apresentando este valor de permeação de  $7,57\text{mgL}^{-1}$  ( $p=0,0493$ ); e para o modo controle, o valor permeado médio foi de  $19,62$  ( $p < 0,0001$ ).



**Figura 1.** Comparação da liberação da hidrocortisona sem e com aplicação do ultrassom contínuo (USC) e pulsado (USP) nos tempos de 5, 10, 15 e 20 minutos. \*  $p < 0,05$  vs. Controle 10 minutos; \*\*  $p < 0,05$  vs. Controle 15 minutos; \*\*\*  $p < 0,05$  vs. Controle 20 minutos.

## DISCUSSÃO

Os resultados obtidos evidenciam que não existe diferença em termos de liberação da hidrocortisona quando há a comparação do ultrassom contínuo e pulsado no tempo

de 5 minutos. No entanto, nos tempos de 10, 15 e 20 minutos, o ultrassom ajustado no modo contínuo se mostrou mais efetivo no que diz respeito à liberação do fármaco quando comparado com o modo pulsado, com aumento de 585, 302 e 260%, respectivamente.

Dentre os mecanismos físicos envolvidos na fonoforese, acredita-se que a temperatura e a agitação podem provocar melhorias no que diz respeito ao aumento do fluxo de fármacos. No entanto, esses fatores não são suficientes para explicar tal fenômeno<sup>13</sup>. Estudos previamente realizados relatam que o ultrassom provavelmente aumenta o transporte de fármacos por cavitação, corrente acústica e aquecimento<sup>14</sup>.

Ainda, a corrente acústica tem sido indicada como mecanismo responsável pela ação da fonoforese *in vitro* através de membranas<sup>15</sup>, e a cavitação acústica, a partir da formação de cavidades gasosas colapsadas, teria a capacidade de atuar sobre o meio de acoplamento alterando características do composto, e/ou facilitando a liberação da forma farmacêutica utilizada<sup>16</sup>. É possível que o incremento da liberação da hidrocortisona esteja associado a esses fenômenos físicos, ou seja, a radiação sonora exerce pressão sobre as moléculas dos fármacos<sup>17</sup>, ampliando assim sua liberação para a solução receptora.

Os efeitos térmicos e mecânicos do ultrassom levam a alterações físicas e químicas dos tecidos biológicos, favorecendo, assim, a penetração dos princípios ativos presentes nas substâncias de uso tópico. O aumento de temperatura da pele resultante da absorção de energia da onda sonora pode incrementar ainda mais o coeficiente de permeabilidade de um fármaco<sup>13</sup>, ou seja, o aquecimento da área a ser tratada aumenta a absorção da medicação nos tecidos por gerar um aumento do fluxo sanguíneo, dilatando os folículos pilosos, reduzindo a resistência da pele e aumentando a transferência cinética do ativo<sup>18</sup>. Cabe também destacar que este aquecimento, com aplicação da fonoforese, promove um incremento de temperatura médio de 12°C no princípio ativo presente no sistema *in vitro* e de 17°C no sistema receptor<sup>19</sup>. É importante salientar que esse nível de aquecimento não promove a modificação estrutural do composto ativo estudado, informação esta confirmada pelos espectros obtidos antes e após o processo de permeação, que não evidenciam degradação da hidrocortisona, com manutenção do pico de absorção.

Em estudos previamente realizados, a difusão de fármacos como a hidrocortisona, manitol e estradiol foi analisada em experimentos com modelos animais, e foi observado um aumento de difusão para os três medicamentos com a aplicação de fonoforese em comparação com os controles, tendo os autores apontado o efeito térmico do ultrassom

como o principal fator para aumentar a permeação percutânea<sup>16</sup>. Em outro estudo, os efeitos positivos do ultrassom associados à hidrocortisona, quando comparado com a aplicação tópica, no processo de tenotomia do tendão de aquiles de ratos foram comprovados. Foi constatado que a fonoforese é o método mais eficiente, demonstrando que o US estimulou a aceleração do processo de reparo tecidual e induziu a permeação transcutânea de hidrocortisona<sup>20</sup>.

Dessa forma, o presente estudo amplia a compreensão dos fenômenos e transportes ocorridos, já que os resultados obtidos demonstraram que o modo contínuo é mais efetivo na entrega da hidrocortisona em comparação ao modo pulsado. Comparando os resultados do presente estudo com valores de trabalhos já publicados na literatura<sup>9</sup>, as soluções de isoniazida e rifampicina foram administradas transdermicamente com ou sem fonoforese em porcos-da-índia durante 0,5 h. Houve um aumento significativo de presença do medicamento no local aplicado e também na corrente sanguínea quando comparado à utilização da aplicação transdérmica sem o auxílio do ultrassom. Sabe-se, também, que o aumento de temperatura causada pela liberação de energia incrementa a difusividade e a cinética do fármaco, conforme estudos realizados<sup>14</sup>. É possível, também, que o efeito térmico do ultrassom contínuo tenha atuado de forma efetiva sobre a estrutura química do fármaco, facilitando a liberação da forma farmacêutica. Estudos mostram que a velocidade de liberação de uma substância é determinada pela característica do próprio polímero e também por condições ambientais, tais como pH e temperatura<sup>21</sup>. Investigações já realizadas corroboram este fato, descrevendo que, além da temperatura de transição vítrea, a quantidade de liberação de um ativo também está associada à superfície, como hidrofiliabilidade, lubrificação, lisura, energia de superfície, adesão e solubilidade<sup>22</sup>.

Em termos de limitações do presente estudo, cabe salientar que o mesmo é realizado *in vitro*, podendo ter, portanto, efeitos térmicos e mecânicos ligeiramente alterados, considerando, por exemplo, questões reológicas quando da aplicação *in vivo*, além de passagens preferenciais quando a estrutura da pele é atingida pelo efeito do US.

A administração transdérmica de fármacos oferece muitas vantagens sobre outras vias de administração, e um fator relevante na prática clínica é a potencialização desse processo. Como fase inicial para tal análise identificou-se a capacidade de liberação das substâncias. Os resultados sugerem maior liberação da hidrocortisona quando associada à onda sônica terapêutica, ou seja, o ultrassom se apresentou como facilitador no processo de liberação da hidrocortisona para o meio. Outro fator relevante são os parâmetros utilizados no equipamento para acentuar a liberação do

fármaco, tendo os resultados deste estudo demonstrado que o ultrassom no modo contínuo é mais efetivo quando comparado com o modo pulsado a 5%, a partir de 5 minutos de aplicação, para liberação e permeação da hidrocortisona 1% em sistema de difusão vertical.

## REFERÊNCIAS

1. Soares M, Vitorino M, Sousa J, Pais A. Permeação cutânea: desafios e oportunidades. *Rev Ciênc Farm Básica Apl.* 2015;36(3):337-48.
2. Kitchen S, Bazin, S. Eletroterapia: pratica baseada em evidências. 2ª ed. Barueri. SP: Manole; 2003.
3. Lee SE, Seo J, Lee SH. The mechanism of sonophoresis and the penetration pathways. In: *Percutaneous penetration enhancers physical methods in penetration enhancement.* Berlin: Springer; 2017. p. 15-30. [https://doi.org/10.1007/978-3-662-53273-7\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-662-53273-7_2)
4. Low J, Reed A. Eletroterapia explicada princípios e prática. 3ª ed. São Paulo: Manole; 2001. 472 p.
5. Rao, R.; Nanda, S. Sonophoresis: recent advancements and future trends. *J Pharm Pharmacol.* 2009;61(6):689-705. <https://doi.org/10.1211/jpp.61.06.0001>
6. Prentice, WE. Modalidades terapêuticas para fisioterapeutas. 2ª ed. Porto Alegre: Artmed; 2004. 612 p.
7. Dutra C, Bianchetti P, Stülpe S. Avaliação da difusão e permeação cutânea in vitro de acetato de hidrocortisona tópica comercial. *Sci Plena.* 2013;9(10):1-7.
8. Cagnie B, Vinck E, Rimbaut S, Vanderstraeten G. Phonophoresis versus topical application of ketoprofen: comparison between tissue and plasma levels. *Phys Ther.* 2003;83(8):707-12. <https://doi.org/10.1093/ptj/83.8.707>
9. Chen S, Han Y, Yu D, Huo F, Wang F, Li Y, Dong L, Liu Z, Huang H. Transdermal delivery of isoniazid and rifampin in guinea pigs by electro-phonophoresis. *Drug Deliv.* 2017;24(1):467-470. <https://doi.org/10.1080/10717544.2016.1267275>
10. Simonin JP. On the mechanisms of in vitro and in vivo phonophoresis. *J Control Release.* 1995;33:125-41. [https://doi.org/10.1016/0168-3659\(94\)00075-6](https://doi.org/10.1016/0168-3659(94)00075-6)
11. Pahade A, Jadhav VM, Kadam VJ. Sonophoresis: an overview. *Int. J Pharm Sci Rev Res.* 2010;3(2):24-32.
12. Food and Drug Administration. Guidance for industry: nonsterile semisolid dosage forms. Rockville: FDA; 1997.
13. Mitragotri S, Kost J. Low-frequency sonophoresis: a review. *Adv Drug Deliv Rev.* 2004;56(5):589-601. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2003.10.024>
14. Yang JH, Kirn DK, Yun M, Kim T, Shin S. Transdermal delivery system of triamcinolone acetonide from a gel using phonophoresis. *Arch Pharm Res.* 2006;29(5):412-7. <https://doi.org/10.1007/BF02968592>
15. Rosim GC. Análise da influência do ultra-som terapêutico na penetração transcutânea de diclofenaco sódico em humanos sadios [dissertação]. São Carlos (SP): Universidade de São Paulo; 2003.
16. Machet L, Cochelin N, Patat F, Arbeille B, Machet MC, Lorette G, Vaillant L. In vitro phonophoresis of mannitol, estradiol and hydrocortisone across human and hairless mouse skin. *Int J Pharm.* 1998;165:169-74. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(97\)00377-3](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(97)00377-3)
17. Rojas O, Moya M, Sibaja M, Ruedert C, Vega-Baudrit J. Estudio de la liberación controlada de plaguicidas incorporados en hidrogeles de ácido itacónico, *Rev Iberoam Polim.* 2004;5(3):133-43.
18. Martins M, Maia ALMF, Costa CLS, Coelho NPMF, Costa MS, Carvalho RA. Ação anti-inflamatória da fração lipídica do ovis aries associado ao ultrassom terapêutico em modelo experimental de tendinite em ratos (*rattus norvegicus*). *Rev Bras Fisioter.* 2011;15(4):297-302. <https://doi.org/10.1590/S1413-35552011000400007>
19. Oliveira G, Tassinari JAF, Bianchetti P, Stülpe S. Avaliação de frequência, temperatura e atenuação da dose de ultrassom terapêutico em modelo de biomembrana de pele suína. *Acúst Vibrações.* 2015;47:17-22.
20. Oliveira RB, Lima EM. Polímeros na obtenção de sistemas de liberação de fármaco. *Rev Eletrônica Farm.* 2006;3(1):29-35.
21. Hofman D, Moll F. The effect of ultrasound on in vitro liberation and in vivo penetration of benzyl nicotinate. *J Control Release.* 1993;27:187-92. [https://doi.org/10.1016/0168-3659\(93\)90150-4](https://doi.org/10.1016/0168-3659(93)90150-4)
22. Park D, Park H, Seo J, Lee S. Sonophoresis in transdermal drug deliveries. *Ultrasonics.* 2014;54(1):56-65. <https://doi.org/10.1016/j.ultras.2013.07.007>