

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ELTON LUIZ SILVA

**DESENVOLVIMENTO DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS CONTENDO  
ÁCIDO RETINÓICO E ÁCIDO LÁURICO PARA O TRATAMENTO TÓPICO DA  
ACNE VULGARIS**

Belo Horizonte – MG

2011

ELTON LUIZ SILVA

**DESENVOLVIMENTO DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS CONTENDO  
ÁCIDO RETINÓICO E ÁCIDO LÁURICO PARA O TRATAMENTO TÓPICO DA  
ACNE VULGARIS**

Dissertação, como requisito parcial,  
para obter o grau de mestre em  
Ciências Farmacêuticas, submetida  
ao Programa de Pós-Graduação  
em Ciências Farmacêuticas da  
Faculdade de Farmácia da  
Universidade Federal de Minas Gerais.  
Orientador: Prof. Dr. Lucas Antônio  
Miranda Ferreira – UFMG

Belo Horizonte – MG

2011

Este trabalho contou com a colaboração de:

Prof. Dr. Ricardo José Alves  
Laboratório de Química Farmacêutica, UFMG.

Profª Drª Gisele Assis Castro Goulart  
Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, UFMG.

Profª Drª Maria Irene Yoshida  
Laboratório de Análise Térmica, UFMG.

Prof. Dr. Rodrigo Lambert Oréfice  
Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais, UFMG.

Prof. Dr. Luis de Macêdo Farias  
Profª Drª Maria Auxiliadora Roque de Carvalho  
Profª Drª Simone Gonçalves dos Santos  
Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios, UFMG.

Dedico este trabalho a Deus, que guiou-me em todos os momentos, especialmente quando eu achei que não tinha mais jeito.

Dedico a todos que estiveram presentes durante este trabalho e que, de uma maneira ou de outra, dividiram comigo este período tão importante.

Dedico, de maneira muito especial, aos jovens e a todos que tem sua autoestima prejudicada pelas complicações da acne.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, na pessoa de Jesus, a quem consagrei este mestrado. E à Nossa Senhora de Lourdes, que sempre se manteve perto de mim.

Ao professor Lucas, não somente pela receptividade, confiança e ensinamentos, mas principalmente por me mostrar o significado da palavra “orientador”.

Aos meus pais e meu irmão, por me mostrarem que “cada ser carrega em si o dom de ser capaz e ser feliz”. Também às minhas queridas Miúda e Bombom, doçuras que alegam minha vida.

À Míriam, não apenas pelos nossos doze anos de amizade, mas por manter-se firme e sempre acreditando. Ao Arthur pelo carinho e abraços oportunos e ao José Roberto pela confiança e preocupação.

Ao Gu, um dos primeiros a acreditar e quem me deu a feliz notícia quando passei na prova.

À Gisele, cujo trabalho serviu de inspiração e cujas preciosas participação e contribuição foram decisivas neste projeto.

Ao professor Ricardo José Alves pelo apoio fundamental no desenvolvimento da reação de derivatização do ácido láurico e pelas ricas conversas e aos amigos do Laboratório de Química Farmacêutica, especialmente à Stefânia.

À professora Maria Irene Yoshida por todo o auxílio nas análises por DSC e pela simpatia de sempre.

Ao professor Rodrigo Lambert Oréfice pela prestatividade e cuidado nas análises de Difração de raios-X.

Aos professores Luis de Macêdo Farias, Maria Auxiliadora Roque de Carvalho e Simone Gonçalves dos Santos pela recepção carinhosa e por todo o apoio na avaliação da atividade antibacteriana da formulação e a todos os novos amigos do ICB. Um agradecimento especial para Mariana, Jaqueline, João e Renata por tanta disponibilidade e pelas risadas nos cafés de sexta-feira.

À professora Mônica pela delicadeza em cada momento, ao professor Gilson pelo bom humor e confiança e ao professor Armando pelo apoio.

Aos professores Miguel e Natasha pela rica experiência e convivência na Escola de Veterinária à professora Adriane pela simpatia e por me mostrar a importância do respeito aos animais.

Aos amigos da Drogaria Castro Marques Ltda, especialmente ao Márcio, por todo o apoio e à Maria da Penha pelas palavras carinhosas.

Aos amigos do Coral da Medicina da UFMG e da Escola de Teatro PUC Minas por trazerem mais brilho para minha vida.

À Lili, por toda a ajuda nas análises por DSC e por me mostrar que a vida pode e deve ser modificada para melhor visualização.

Ao Diego por todo o auxílio e pelo cuidado de sempre.

À Leilinha por compartilhar inúmeros momentos e dificuldades e ser tão doce e meiga.

À Juçara pelas palavras de alento e fé nos momentos difíceis, sendo sinal da presença de Deus em minha vida.

À Tati, que compartilhou comigo tantos cafés com conversas abençoadas e sempre enriquecedoras.

Ao Samuel, pelas palavras às vezes difíceis, mas necessárias e de grande auxílio.

À Luciene, por toda a doçura, simpatia e por dividir momentos muito importantes.

À Sávia pela leveza e por nossos momentos de Antena 1 FM, Talita e Cris Giuberti pela simpatia e por todas as gargalhadas, Lorena pela cumplicidade.

Ao Eduardo, pelo carinho, apoio técnico e por não achar que sou viciado em acetonitrila.

Ao meu caríssimo senhor Guilherme Carneiro, por todas as parcerias, risadas, conselhos e a preciosa amizade presentes *IN MY LIFE*. Também à Betânia pela confiança no meu trabalho.

Aos amigos Elaine, Daniel's, Matheus, Ana Paula, Danielle, Livia, Ju, Luísa e todos os demais amigos do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica por todos os momentos.

Ao Eduardo e à Ludimila, da secretaria de Pós-Graduação por toda a compreensão e auxílio.

Ao querido amigo Thiego pela confiança e convivência tão queridas e aos amigos de Ouro Branco.

Ao grande amigo Wilder pela amizade e carinho constantes e aos amigos Gra e Renan, presenças confortadoras em tantos momentos.

À amiga Dri, pessoa violentamente maravilhosa que enche de poesia tantos momentos.

À amiga Andrina, próxima e fantástica mesmo apesar da distância e à minha família de Barbacena.

À Cláudia, ícone da busca por um caminho melhor.

Ao meus tios Ivamar, Cleuza e Ane, pelas orações, cartas e conselhos.

Deixo por último, embora não seja menos importante o agradecimento à minha indispensável Lidiane, pelo papel fundamental em todas as partes do trabalho e pela doçura de todos os dias.

“Tu vois, là-bas, les champs de blé? Je ne mange pas de pain. Le blé pour moi est inutile. Les champs de blé ne me rappellent rien. Et ça, c’est triste! Mais tu as des cheveux couleur d’or. Alors ce sera merveilleux quand tu m’auras apprivoisé! Le blé, qui est doré, me fera souvenir de toi. Et j’aimerai le bruit du vent dans le blé...”



Antoine de Saint-Exupéry (Le Petit Prince)

## RESUMO

A terapia tópica é a primeira escolha no tratamento da acne leve a moderada e o ácido retinóico todo *trans* (AR) é um dos fármacos mais usados. Contudo, sua aplicação tópica é acompanhada por uma alta incidência de reações adversas, incluindo eritema e irritação. As nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) são uma alternativa interessante para reduzir as reações adversas sem comprometer a eficácia. Por outro lado, a combinação de retinóides e antimicrobianos representa uma inovação na terapia tópica da acne e, recentemente, o ácido láurico (AL), um ácido graxo presente no sebo, mostrou atividade elevada contra o *Propionibacterium acnes*. Este trabalho tem por objetivo desenvolver NLS carregadas com AR e AL. A influência da STE, uma amina lipofílica, sobre as características das NLS foi investigada. As NLS foram preparadas pelo método de homogeneização a quente, utilizando sonda de ultrassom. O diâmetro médio das partículas foi similar para os três níveis de STE avaliados (0, 0,2 e 0,4%) e o potencial zeta aumentou em função do teor de STE. O teor de encapsulação (TE) dos ácidos foi avaliado 0 e 15 dias após a preparação. O TE do AR e do AL foi elevado no tempo inicial para os três níveis de STE. No entanto, uma diminuição significativa do TE para o AR foi observada após 15 dias na NLS com 0% de STE. As NLS carregadas com AR e AL foram caracterizadas por Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e Difração de raios-X (DRX). Os termogramas de DSC e os difratogramas de DRX revelaram integração do AR e do AL à matriz lipídica das NLS, sugerindo que o AL foi capaz de desestruturar a matriz lipídica, permitindo o elevado TE do AR. A atividade inibitória do crescimento *in vitro* foi avaliada para *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*. As NLS carregadas com AR e AL inibiram o crescimento dos microrganismos avaliados, com papel importante da carga positiva da STE. Em suma, foi demonstrado que as NLS carregadas com AL facilitam a incorporação do AR e que a presença da STE assegura boa estabilidade da encapsulação. Além disso, NLS carregadas com AR e AL apresentam potencial atividade antimicrobiana, representando uma alternativa interessante para o tratamento tópico da acne vulgaris.

**Palavras-chave:** Acne vulgaris, tratamento tópico, nanopartículas lipídicas sólidas, ácido retinóico, ácido láurico.

## ABSTRACT

Topical therapy is the first choice in the treatment of mild to moderate acne and all-trans retinoic acid (tretinoin, RA) is one of the most used drugs. However, its topical application is followed by high incidence of side-effects, including erythema and irritation. Solid lipid nanoparticles (SLN) are an interesting alternative to reduce side-effects without compromising efficacy. On the other hand, combination of retinoids and antimicrobials represents an innovative approach in topical therapy of acne, and, recently, lauric acid (LA), a fatty acid present in sebum, has shown strong activity against *Propionibacterium acnes*. This work aims to develop SLN loaded with RA and LA. The influence of stearylamine (SA), a lipophilic amine, over the characteristics of SLN was investigated. SLN were prepared by the hot melt homogenization method using an emulsification-ultrasound. The mean particle diameter was similar for the three levels of SA evaluated (0, 0.2 and 0.4%) and zeta potential increased according to the level of SA. Encapsulation Efficiency (EE) of the acids was evaluated 0 and 15 days after preparation. EE of RA and LA was high at initial time for the three levels of SA. However, a significant decrease for EE of RA was observed 15 days later in SLN with 0% of SA. SLN loaded with RA and LA were characterized by Differential Scanning Calorimetry (DSC) and X-ray Diffraction (XRD). The DSC thermograms and XRD diffractograms showed integration of RA and LA to the lipid matrix of SLN, suggesting that LA was able to disrupt the lipid matrix, allowing the increased EE of RA. The *in vitro* growth inhibitory activity was evaluated for *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. SLN loaded with RA and LA inhibited the growth of the evaluated microorganisms, with important role of the positive charge of SA. In summary, it was demonstrated that SLN loaded with LA facilitate the incorporation of RA and the presence of SA is important to ensure good stability of encapsulation. Moreover, SLN loaded with RA and LA show potential antimicrobial activity, representing an interesting alternative for topical treatment of acne vulgaris.

**Keywords:** Acne vulgaris, topical therapy, solid lipid nanoparticles, retinoic acid, lauric acid.

## LISTA DE FIGURAS

<b>1 Patogênese da acne. Adaptado de Billow (1996).....</b>	<b>23</b>
<b>2 <i>Propionibacterium acnes</i>. Adaptado de Webster (2002).....</b>	<b>27</b>
<b>3 Aumento na resistência do <i>P.acnes</i> a antibióticos de 1976 à 1996. Adaptado de Cooper (1998).....</b>	<b>31</b>
<b>4 Efeito do tratamento com isotretinoína oral em acne grave. Adaptado de Gollnick <i>et al.</i> (2003).....</b>	<b>32</b>
<b>5 Mecanismo de ação dos retinóides. Adaptado de Zaenglein (2008).....</b>	<b>34</b>
<b>6 Visão geral do mecanismo de ação dos medicamentos usados no tratamento da acne. Adaptado de Gollnick <i>et al.</i> (2003).....</b>	<b>40</b>
<b>7 Estrutura química do ácido láurico (ácido dodecanóico).....</b>	<b>42</b>
<b>8 Representação esquemática de lipossomas, microesferas poliméricas e nanopartículas lipídicas sólidas (NLS). Adaptado de Castro; Ferreira (2008).....</b>	<b>43</b>
<b>9 Nanopartículas lipídicas sólidas de triestearina vistas em microscopia eletrônica de transmissão. Adaptado de Bunjes <i>et al.</i> (2007).....</b>	<b>44</b>
<b>10 Interações fármaco-NLS. A - Fármaco homogeneamente distribuído na matriz lipídica; B – Fármaco concentrado em camadas; C – Fármaco concentrado no núcleo; D - Fármaco aderido à superfície da partícula; E - Agrupamentos do fármaco aderidos à superfície da partícula. Adaptado de Schäfer-Korting <i>et al.</i> (2007).....</b>	<b>46</b>
<b>11 Representação esquemática da distribuição de íons ao redor de um partícula carregada para geração do potencial zeta. Adaptado de Zeta-Meter Inc. (2010).....</b>	<b>47</b>
<b>12 Irritação cutânea induzida por AR em camundongos rhino durante tratamento com gel placebo, formulação comercial contendo AR e NLS-AR e aparência da pele no 2º e 4º dias após o início do tratamento. Adaptado de Castro <i>et al.</i> (2009).....</b>	<b>49</b>
<b>13 Representação esquemática da reação de derivatização do ácido láurico com o brometo de fenacila, utilizando trietilamina como catalisador.....</b>	<b>54</b>
<b>14 Representação esquemática da preparação das nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) pelo método de homogeneização a quente utilizando ultrassom com sonda de alta potência.....</b>	<b>59</b>
<b>15 Estrutura química da estearilamina (octadecilamina).....</b>	<b>60</b>

<b>16</b>	<b>Representação esquemática da metodologia para determinação da concentração total do ácido retinóico (AR) nas nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....</b>	<b>63</b>
<b>17</b>	<b>Representação esquemática da metodologia para determinação da concentração do ácido retinóico (AR) encapsulado nas nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....</b>	<b>64</b>
<b>18</b>	<b>Representação esquemática da metodologia para determinação da concentração total e encapsulado do ácido láurico (AL) nas nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....</b>	<b>65</b>
<b>19</b>	<b>Representação esquemática da preparação das placas para avaliação da atividade antibacteriana <i>in vitro</i> das nanopartículas lipídicas sólidas (NLS).....</b>	<b>69</b>
<b>20</b>	<b>Curva analítica para avaliação da linearidade do método analítico de quantificação do ácido láurico (AL) por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....</b>	<b>70</b>
<b>21</b>	<b>Cromatogramas obtidos a partir da injeção das NLS Branco (A) e solução de AL (B).....</b>	<b>71</b>
<b>22</b>	<b>Representação da estrutura cristalina das NLS de composição lipídica homogênea (A) e NLS na qual foi usada uma mistura complexa de lípidos (B), fornecendo mais espaços para acomodar o fármaco. Adaptado de Müller <i>et al.</i> (2002).....</b>	<b>77</b>
<b>23</b>	<b>Representação gráfica dos teores de encapsulação do AR e do AL nas NLS AR+AL contendo 0, 0,2 e 0,4% de STE avaliados após a preparação e 15 dias depois.....</b>	<b>78</b>
<b>24</b>	<b>Curvas de DSC dos principais componentes das nanopartículas lipídicas sólidas [(Compritol ATO 888, Ácido retinóico (AR) e Ácido láurico (AL)] (Curva A) e das NLS AL e NLS AR+AL (Curva B).....</b>	<b>80</b>
<b>25</b>	<b>Difratogramas dos principais componentes das nanopartículas lipídicas sólidas [(Compritol ATO 888, Ácido retinóico (AR) e Ácido láurico (AL)] (Difratograma A) e das NLS AL e NLS AR+AL (Difratograma B).....</b>	<b>82</b>
<b>26</b>	<b>Formas <math>\alpha</math> e <math>\beta</math> dos lípidos presentes na matriz das NLS vistas em microscopia eletrônica de transmissão. Adaptado de Bunjes <i>et al.</i> (2007).....</b>	<b>84</b>
<b>27</b>	<b>Placas de Petri mostrando os halos de inibição apresentados pelas NLS Branco (0,2% STE) e NLS AR+AL (0,2% STE) na avaliação do crescimento de <i>P. acnes</i> ATCC 14157, <i>S. aureus</i> ATCC 29313 e <i>S. epidermidis</i> ATCC 12228.....</b>	<b>89</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>1 Classificação e características clínicas dos principais tipos de acne.....</b>	<b>24</b>
<b>2 Agentes utilizados no tratamento da acne e suas ações terapêuticas associadas. Adaptado de Gollnick (2003).....</b>	<b>29</b>
<b>3 Mecanismo de ação das terapias hormonais utilizadas no tratamento da acne. Adaptado de Katsambas (2010).....</b>	<b>33</b>
<b>4 Classificação e estrutura dos retinóides. Adaptado de Mukherjee (2006).....</b>	<b>36</b>
<b>5 Composição das nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) contendo ácido retinóico (AR) (%p/p).....</b>	<b>59</b>
<b>6 Composição das nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) contendo ácido láurico (AL) (%p/p).....</b>	<b>60</b>
<b>7 Composição das nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) contendo ácido retinóico (AR) e ácido láurico (AL) (%p/p).....</b>	<b>61</b>
<b>8 Bactérias utilizadas na avaliação das nanopartículas lipídicas sólidas (NLS).....</b>	<b>68</b>
<b>9 Resultados obtidos para a avaliação da repetibilidade do método de quantificação do ácido láurico (AL) por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....</b>	<b>72</b>
<b>10 Resultados obtidos para a avaliação da precisão intermediária do método de quantificação do ácido láurico (AL) por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....</b>	<b>72</b>
<b>11 Resultados obtidos para a avaliação da exatidão do método de quantificação do ácido láurico (AL) por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....</b>	<b>73</b>
<b>12 Caracterização das NLS contendo AR quanto ao diâmetro das partículas, potencial zeta e teor de encapsulação.....</b>	<b>74</b>
<b>13 Caracterização das NLS contendo AL quanto ao diâmetro das partículas, potencial zeta e teor de encapsulação.....</b>	<b>75</b>
<b>14 Caracterização das NLS contendo AR e AL quanto ao diâmetro das partículas e ao potencial zeta.....</b>	<b>76</b>
<b>15 Avaliação da atividade antibacteriana da solução de AL, NLS Branco (0 e 0,2% STE) e NLS AR+AL (0,2% STE) sobre o crescimento de <i>P.acnes</i> ATCC 14157 <i>in vitro</i>.....</b>	<b>85</b>

<b>16</b> Avaliação da atividade antibacteriana da solução de AL, NLS Branco (0 e 0,2% STE) e NLS AR+AL (0,2% STE) sobre o crescimento de <i>P.acnes</i> isolado de espécime clínico <i>in vitro</i> .....	85
<b>17</b> Avaliação da atividade antibacteriana da solução de AL, NLS Branco (0 e 0,2% STE) e NLS AR+AL (0,2% STE) sobre o crescimento de <i>S.aureus</i> ATCC 29313 <i>in vitro</i> .....	86
<b>18</b> Avaliação da atividade antibacteriana da solução de AL, NLS Branco (0 e 0,2% STE) e NLS AR+AL (0,2% STE) sobre o crescimento de <i>S.aureus</i> isolado de espécime clínico <i>in vitro</i> .....	86
<b>19</b> Avaliação da atividade antibacteriana da solução de AL, NLS Branco (0 e 0,2% STE) e NLS AR+AL (0,2% STE) sobre o crescimento de <i>S.epidermidis</i> ATCC 12228 <i>in vitro</i> .....	87
<b>20</b> Avaliação da atividade antibacteriana da solução de AL, NLS Branco (0 e 0,2% STE) e NLS AR+AL (0,2% STE) sobre o crescimento de <i>S.epidermidis</i> isolado de espécime clínico <i>in vitro</i> .....	87

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AL	Ácido láurico
AR	Ácido retinóico
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BF	Brometo de fenacila
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CRABP	Proteínas citoplasmáticas de ligação ao ácido retinóico
CV	Coeficiente de variação
DRX	Difração de raios-X
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
d	Distância
ERAR	Elementos responsivos ao ácido retinóico
EUA	Estados Unidos da América
g	Grama
GLHS	Globulina de Ligação à Hormônios Sexuais
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofina
IL-1 $\alpha$	Interleucina 1- $\alpha$
IP	Índice de polidispersividade
Kcps	1000 contagens por segundo
Kg	Kilograma
M	Concentração molar
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MFA	Microscopia de força atômica
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Concentração milimolar
mV	Milivolt
NLS	Nanopartículas lipídicas sólidas
NLS AL	Nanopartículas lipídicas sólidas contendo ácido láurico
NLS AR	Nanopartículas lipídicas sólidas contendo ácido retinóico
NLS AR+AL	Nanopartículas lipídicas sólidas contendo ácido retinóico e ácido láurico

NLS Branco	Nanopartículas lipídicas sólidas sem princípio ativo
nm	Nanômetro
<i>P.acnes</i>	<i>Propionibacterium acnes</i>
<i>P.avidum</i>	<i>Propionibacterium avidum</i>
<i>P.granulosum</i>	<i>Propionibacterium granulosum</i>
p	Peso
PB	Peróxido de benzoíla
PBS	Solução Tampão Fosfato Salina
PCS	Espectroscopia por correlação de fótons
pH	Potencial hidrogeniônico
PVDF	Fluoreto de polivinilideno
r	Coeficiente de correlação
RAR	Receptor de ácido retinóico
RPM	Rotações por minuto
RXR	Receptor de retinóide X
<i>S.aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S.epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
STE	Estearilamina
TE	Teor de encapsulação
TEA	Trietilamina
THF	Tetraidrofurano
TLR	Receptores toll-like
TLR2	Receptores <i>toll-like</i> tipo 2
UPS	Unidade pilossebácea
UV-Vis	Região do espectro eletromagnético que vai do Ultravioleta ao visível
v	Volume
µL	Microlitro
µm	Micrômetro

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\alpha$	Forma polimórfica tipo $\alpha$ da rede lipídica
Å	Ângstrom
$\beta$	Forma polimórfica tipo $\beta$ da rede lipídica
$\beta'$	Forma polimórfica tipo $\beta'$ da rede lipídica
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
$\lambda$	Comprimento de onda do feixe de raios-X
$\theta$	Ângulo teta (metade do ângulo de espalhamento dos raios-X)

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	20
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	22
2.1 Etiopatogenia da acne vulgaris.....	22
<u>2.1.1 Glândulas sebáceas e seborréia.....</u>	<u>25</u>
<u>2.1.2 Crescimento e diferenciação foliculares.....</u>	<u>26</u>
<u>2.1.3 <i>Propionibacterium acnes</i> e resposta inflamatória.....</u>	<u>26</u>
2.2 Tratamento da acne vulgaris.....	28
<u>2.2.1 Tratamento sistêmico.....</u>	<u>30</u>
<u>2.2.2 Tratamento tópico.....</u>	<u>34</u>
<u>2.2.3 Terapia combinada.....</u>	<u>39</u>
2.3 Ácido láurico.....	41
2.4 Nanopartículas Lipídicas Sólidas.....	42
<u>2.4.1 Preparação e caracterização das NLS.....</u>	<u>45</u>
<u>2.4.3 Aplicação tópica das NLS.....</u>	<u>48</u>
3 OBJETIVOS.....	50
2.1 Objetivo geral.....	50
3.2 Objetivos específicos.....	50
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	51
4.1 Material.....	51
4.2 Métodos.....	51

<b><u>4.2.1 Metodologia de determinação da concentração do AR por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)</u></b> .....	51
<b><u>4.2.2 Desenvolvimento e validação da metodologia de determinação da concentração do AL por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)</u></b> .....	52
<b><u>4.2.3 Preparação das NLS</u></b> .....	58
<b><u>4.2.4 Caracterização das NLS</u></b> .....	61
<b><u>4.2.5 Avaliação da atividade antibacteriana das NLS <i>in vitro</i></u></b> .....	67
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	70
<b>5.1 Desenvolvimento e validação da metodologia de determinação da concentração do AL por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)</b> .....	70
<b><u>5.1.1 Linearidade do método analítico</u></b> .....	70
<b><u>5.1.2 Seletividade do método analítico</u></b> .....	71
<b><u>5.1.3 Precisão do método analítico</u></b> .....	72
<b><u>5.1.4 Exatidão do método analítico</u></b> .....	73
<b><u>5.1.5 Robustez do método analítico</u></b> .....	73
<b>5.2 Caracterização das NLS</b> .....	73
<b><u>5.2.1 Calorimetria Exploratória Diferencial</u></b> .....	79
<b><u>5.2.2 Difração de raios-X</u></b> .....	81
<b><u>5.2.3 Avaliação da atividade antibacteriana das NLS <i>in vitro</i></u></b> .....	84
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	90
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	92

## 1 INTRODUÇÃO

A acne vulgaris é uma doença comum, afetando, aproximadamente, 40 a 50 milhões de pessoas somente nos EUA (White, 1998). Entre os adolescentes sua prevalência pode alcançar 80%, podendo os sintomas clínicos persistir ao longo da vida adulta, impactando negativamente a qualidade de vida desses indivíduos (Koo 1995). A acne é uma dermatose inflamatória crônica da unidade pilossebácea (UPS) e é caracterizada por anormalidades na produção de sebo, descamação do epitélio folicular, proliferação bacteriana, inflamação e reações imunológicas do paciente (Gollnick, 2003).

De acordo com sua evolução, a acne é normalmente classificada como leve, moderada e grave. A terapia tópica é a primeira escolha no tratamento de pacientes com acne leve à moderada e o ácido retinóico todo *trans* (tretinoína, AR) é um dos fármacos mais usados. No entanto, a aplicação tópica do AR é acompanhada por uma alta incidência de reações adversas locais, tais como eritema local leve à grave, ressecamento e descamação, comprometendo a adesão do paciente e a eficácia da terapia (Gollnick *et al.*, 2003).

Para reduzir essas reações adversas, a utilização de baixas concentrações dos fármacos antiacne, assim como dos novos sistemas de liberação de fármacos, têm sido propostos (Castro;Ferreira 2008). Os sistemas de liberação de fármacos vesiculares e particulados, como lipossomas, microesferas e nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) apresentam potencial para liberação controlada. A aplicação desses sistemas na pele permite a distribuição gradual dos agentes tópicos e, em alguns casos, têm demonstrado habilidade para reduzir a irritação cutânea de fármacos antiacne, enquanto mantem eficácia similar quando comparados com as formulações convencionais (Castro, 2007).

Dentre esses sistemas, as NLS representam uma alternativa interessante para a encapsulação do AR. As NLS são de fácil transposição para escala industrial, não requerem uso de solventes orgânicos (Müller *et al.*, 2000) e têm mostrado potencial para direcionamento folicular (Jenning *et al.*, 2000b). No entanto, o teor de encapsulação do AR nas NLS é usualmente baixa, a menos que uma relação tensoativo/lípide alta seja utilizada (Lim; Kim, 2002). Contudo, recentemente, Castro *et al.* (2009), mostraram que a formação de um par iônico entre o AR e a estearilamina, uma amina lipofílica, proporcionou alto teor de encapsulação do AR,

com estabilidade a longo prazo e menor irritação comparada à formulação comercial.

Dada a natureza multifatorial da patogenia da acne, o uso de terapias combinadas tem sido desenvolvido. Dentre as combinações utilizadas, o uso associado de retinóides e antimicrobianos tem sido uma das opções mais efetivas, mostrando melhores resultados do que cada tratamento isoladamente (Gollnick, 2003). Recentemente, foi mostrado que o ácido láurico (AL), um ácido graxo presente no sebo, apresentou elevada atividade contra o *Propionibacterium acnes* (*P.acnes*), bactéria envolvida na patogenia da acne, tanto *in vitro* como em modelo animal de acne inflamatória (Nakatsuji *et al* 2009). Além disso, esta ação também foi observada com uma formulação de lipossomas contendo AL, que mostrou inibição do crescimento do *P. acnes in vitro* (Yang *et al* 2009).

Neste sentido, o objetivo do presente projeto é o desenvolvimento e caracterização de uma nova formulação de NLS contendo AR e AL como alternativa inovadora para o tratamento tópico da acne vulgaris. A influência da estearilamina no teor de encapsulação do AR e do AL será avaliada e também é proposta a avaliação da atividade inibidora do crescimento *in vitro* das NLS contra o *P. acnes*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Etiopatogenia da acne vulgaris

A acne vulgaris, popularmente conhecida como acne, é uma doença comum, que afeta, aproximadamente, 40 a 50 milhões de pessoas somente nos EUA (White, 1998). Sua prevalência entre os adolescentes é de cerca de 80%, para ambos os sexos. Normalmente a acne regride na idade adulta, mas muitos pacientes podem apresentar acne persistente ou voltar a desenvolvê-la mesmo após a adolescência (Collier, 2008).

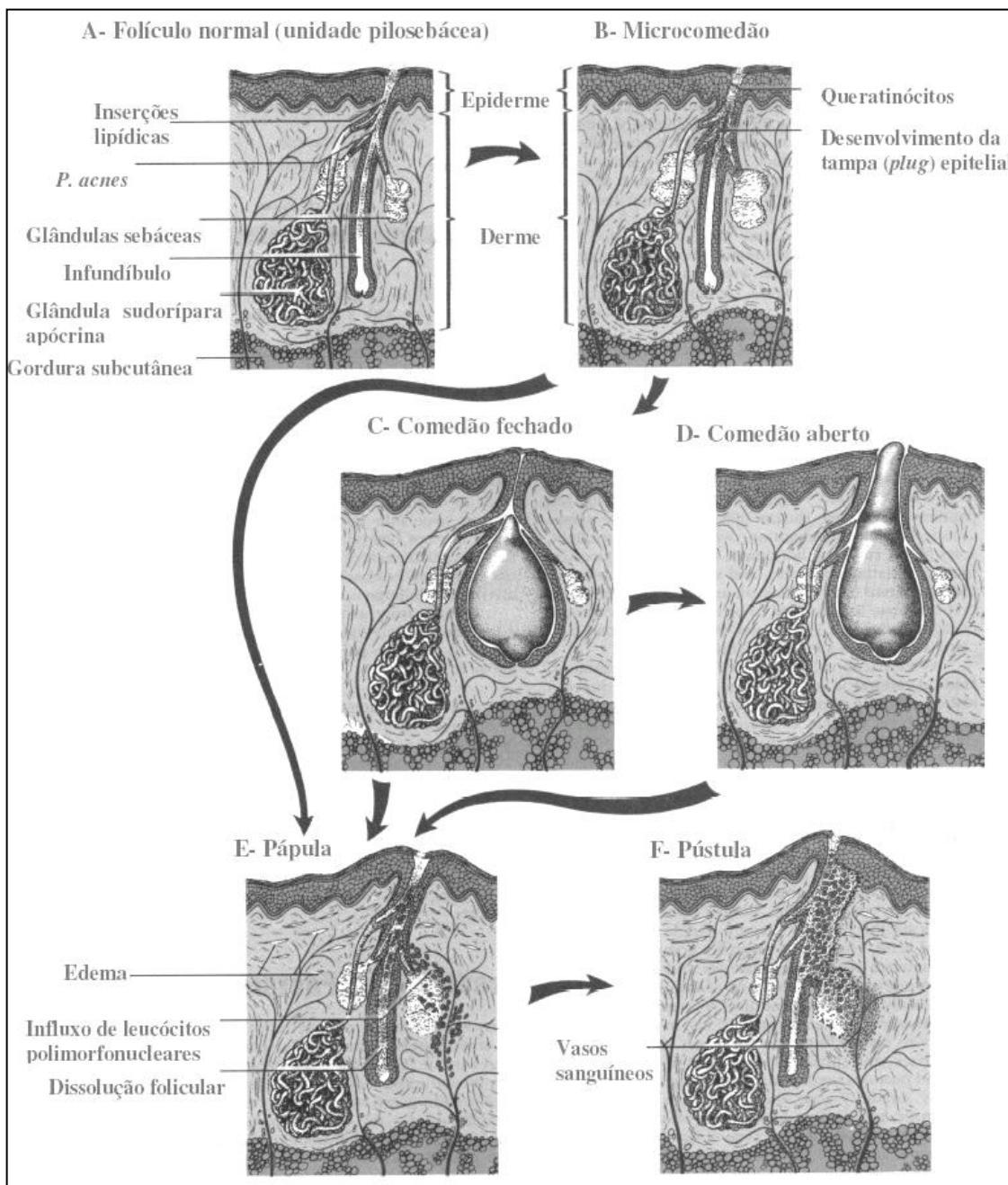
Embora a acne não seja uma doença que ameace a vida do paciente, ela pode ter um impacto psicossocial negativo e significativo, especialmente entre os adolescentes (Billow, 1996). Este impacto pode comprometer a vida social e profissional do indivíduo, com consequências como baixa autoestima, depressão e idéias suicidas (Koo, 1995).

A acne tem etiopatogenia complexa, envolvendo queratinização anormal, função hormonal, crescimento bacteriano (*Propionibacterium acnes* – *P. acnes*) e hipersensibilidade imunológica (Webster, 2002). Seu sítio é a unidade pilossebácea (UPS), composta de glândulas sebáceas multilobulares, um fio de cabelo rudimentar e um canal folicular revestido de epitélio escamoso estratificado (**Figura 1A**). Durante o ciclo regular de desenvolvimento da pele, as células descamadas são carregadas do folículo em direção à superfície da pele pelo sebo secretado a partir das glândulas sebáceas através de um canal chamado infundíbulo. O desenvolvimento, crescimento e diferenciação normais da UPS requer a interação de andrógenos com diversos outros fatores biológicos, como fatores de crescimento e hormônio da tireóide (Gollnick, 2003).

A primeira alteração morfológica na UPS na acne é a diferenciação anormal do epitélio folicular, causando bloqueio mecânico progressivo ao fluxo de sebo e células descamadas e levando à formação do microcomedão (**Figura 1B**). Este, embora clinicamente não visível, é a lesão precursora de todas as demais lesões presentes na acne (Billow, 1996; Gollnick, 2003).

À medida que o sebo e as células se acumulam na UPS, o microcomedão aumenta de tamanho e se torna visível, sendo denominado de comedão fechado, pelo fato de seu conteúdo não alcançar a superfície da pele (**Figura 1C**). Dois processos podem ocorrer a seguir, um levando à acne não inflamatória e o outro à

acne inflamatória. A maioria dos pacientes apresenta uma combinação de ambas as formas. Se a tampa formada por sebo e células aumenta e é projetada do orifício do canal folicular, forma-se o comedão aberto, visto que seu conteúdo se abre para a superfície e pode apresentar uma coloração escura, decorrente da melanina produzida pelas células epiteliais que revestem o infundíbulo (**Figura 1D**). Os comedões, tanto abertos como fechados, são popularmente conhecidos como “cravos”.



**Figura 1 - Patogênese da acne. Adaptado de Billow (1996).**

A ruptura da parede do folículo piloso produz uma reação inflamatória ao redor do comedão, formando a pápula (**Figura 1E**). As pápulas são lesões inflamatórias que se apresentam com áreas vermelhas e com edema na pele. Essas lesões podem progredir para formarem as pústulas, nas quais a área, além de se apresentar vermelha e com edema, apresenta pus. São popularmente conhecidas como “espinhas” (**Figura 1F**). As pústulas podem se romper espontaneamente. Uma penetração mais extensiva nos tecidos que circundam a área ocasiona lesões nodulares purulentas e necróticas (Billow, 1996).

Clinicamente, a acne é classificada em leve, moderada e grave, dependendo do tipo, número e gravidade das lesões predominantes (**Tabela 1**) (Gollnick, 2003).

**Tabela 1 – Classificação e características clínicas dos principais tipos de acne.**

Classificação	Característica clínica
Leve	Predominância de comedões fechados e abertos, com poucas pápulas e/ou pústulas e nenhum nódulo
Moderada	Maior número de pápulas e pústulas e presença de poucos nódulos
Grave	Numerosas pápulas e pústulas e muitos nódulos, podendo ocasionar cicatrizes extensas

Os fatores fisiopatológicos mais notáveis que influenciam o desenvolvimento da acne são: hiperplasia das glândulas sebáceas e seborréia, alteração do crescimento e diferenciação dos queratinócitos foliculares, colonização do folículo piloso por *P. acnes*, inflamação e resposta imune associadas. Merecem destaque a alteração do crescimento e diferenciação foliculares e a hiperplasia das glândulas sebáceas, pois são os fatores que, combinados, levam à formação do microcomedão, primeira lesão da acne. Contudo, o papel do *P. acnes* e da resposta imune no surgimento e evolução das lesões inflamatórias não podem ser desconsiderados (Gollnick *et al.*, 2003).

### **2.1.1 Glândulas sebáceas e seborréia**

As glândulas sebáceas sob a ação de andrógenos, principalmente a testosterona, produzem o sebo, uma mistura complexa e variável de lípidos. O sebo atinge a superfície da pele passando pelo infundíbulo. Sua função é retardar a perda de água e manter a hidratação da pele e do pelo. A acne tende a ocorrer com maior frequência na face, no tronco e no peito devido ao maior número de glândulas sebáceas presente nestas regiões (Billow, 1996).

A acne se inicia na puberdade quando a produção de sebo começa a aumentar pela estimulação dos andrógenos, alcançando seu pico na adolescência e diminuindo ao longo dos anos. A testosterona exerce o papel mais importante, sendo convertida localmente pela enzima 5 $\alpha$ -redutase tipo I em sua forma mais ativa, a 5 $\alpha$ -diidrotestosterona. Esta, por sua vez, estimula um aumento na produção de sebo. A 5 $\alpha$ -redutase tipo I é mais abundantemente expressa em sebócitos da face, o que se correlaciona com a maior prevalência de acne facial. Além disso, acredita-se que o aumento na produção de sebo esteja relacionado com uma sensibilidade aumentada das glândulas sebáceas ao estímulo androgênico, bem como maior atividade da 5 $\alpha$ -redutase tipo I em pacientes com acne (Gollnick, 2003; Pawin *et al.*, 2004).

A produção exacerbada de sebo está intimamente relacionada à patogênese da acne, uma vez que fornece um ambiente anaeróbico e rico em lípidos, favorecendo o crescimento do *P. acnes* (Gollnick, 2003). Mas, recentemente, outros fatores que não apenas o aumento na produção de sebo foram identificados. Dentre eles, pode-se destacar:

- a produção da citocina inflamatória interleucina IL-1 $\alpha$  e de ácidos graxos livres pelos sebócitos (Gollnick, 2003);
- a presença de receptores nos sebócitos para a substância P, um neuromediador, sugerindo uma possível explicação para a exacerbação da acne induzida pelo estresse em alguns pacientes (Pawin *et al.*, 2004; Dreno, 2010);
- a importância da composição do sebo, notadamente quanto aos níveis de ácido linoléico, cuja diminuição estaria ligada ao aumento na produção de sebo e hiperqueratinização (Pawin *et al.*, 2004; Gollnick, 2003).

### **2.1.2 Crescimento e diferenciação foliculares**

A hiperproliferação e a descamação anormal do epitélio folicular são as primeiras alterações morfológicas que ocorrem na UPS e levam à formação do microcomedão (Dreno, 2010). O processo de eliminação e descamação das células do epitélio folicular, embora ainda não bem estabelecido, envolve diminuição da coesão entre as células. O desenvolvimento e descamação epiteliais anormais, seja devido ao aumento de proliferação ou separação inadequada das células ou mesmo à uma combinação de ambos os fatores, estão envolvidos na patogênese da acne (Gollnick, 2003).

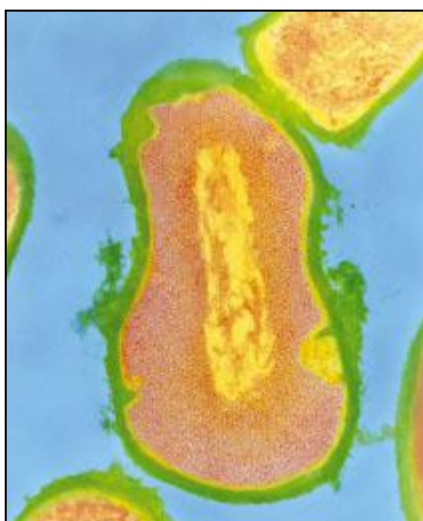
Vários fatores estão relacionados a estas alterações dos queratinócitos. Os lípides presentes no sebo são específicos para cada espécie e, no ser humano, os principais são o esqualeno, ceras, triglicerídeos e ácidos graxos livres. Alterações na composição do sebo correlacionam-se com indução de hiperproliferação folicular, destacando-se a diminuição dos níveis de ácido linoléico, aumento dos níveis de esqualeno e ácidos graxos livres (Cunliffe *et al.*, 2004; Dreno 2010). Os queratinócitos, assim como os sebócitos, apresentam receptores para andrógenos e também expressam a enzima 5 $\alpha$ -redutase tipo I, sugerindo uma relação entre atividade androgênica e proliferação folicular (Pawin *et al.*, 2004). A secreção de interleucina IL-1 $\alpha$  pelos queratinócitos foliculares em resposta à irritação local também causa estimulação da comedogênese (Cunliffe *et al.*, 2004; Dreno, 2010; Gollnick, 2003).

Recentemente foi sugerido por Burkhart; Burkhart (2007) que polissacarídeos excretados no meio extracelular pelo *P. acnes* contribuiriam para o aumento na adesão entre os corneócitos, favorecendo a formação do microcomedão. Além disso, mudanças na expressão de integrinas, moléculas que garantem adesão entre os queratinócitos, podem exercer um papel importante na comedogênese, alterando a proliferação dos queratinócitos (Pawin *et al.*, 2004).

### **2.1.3 *Propionibacterium acnes* e resposta inflamatória**

A microbiologia da UPS envolve três grupos de microrganismos mais importantes: aeróbicos dos gêneros *Staphylococcus* e *Micrococcus*; semianaeróbicos do gênero *Propionibacterium*, como *P. acnes*, *P. granulosum* e *P.*

*avidum*; e fungos lipofílicos. O *P. acnes* (**Figura 2**) é a espécie mais comumente encontrada e está presente em cerca de 100 % dos adultos (Leyden *et al.*, 1998). A pele normal apresenta distribuições diferentes quanto à colonização por *P. acnes*, sendo estas relacionadas à idade e ao local do corpo. Os níveis de *P. acnes* alcançam valores máximos ao final da adolescência e início da idade adulta e estão presentes, principalmente, em regiões do corpo ricas em glândulas sebáceas, como a face e o couro cabeludo (Leyden *et al.*, 1998; Gollnick, 2003).



**Figura 2 - *Propionibacterium acnes*. Adaptado de Webster (2002).**

O *P. acnes* não é considerado um patógeno, porém é o principal contribuinte para o desenvolvimento das lesões inflamatórias da acne (Billow, 1996). Ao se desenvolver no folículo rico em sebo, o *P. acnes* secreta lipases que degradam os triglicerídeos, formando glicerol, usado como substrato, e ácidos graxos livres que tem ação próinflamatória e comedogênica (Gollnick, 2003). Os ácidos graxos livres e fragmentos de *P. acnes* se difundem através da parede folicular, levando a um afluxo de neutrófilos polimorfonucleares por quimiotaxia. A liberação de enzimas hidrolíticas pelos neutrófilos causam ruptura da parede do folículo e a liberação de seu conteúdo para a derme circundante, produzindo resposta inflamatória (Webster, 2002; Pawin *et al.*, 2004).

O *P. acnes* pode contribuir para a acne inflamatória por meio de seus efeitos na resposta imune humoral e celular, assim como ativação do complemento e produção de citocinas (Burkhart *et al.*, 1999). Um fator importante a ser considerado

é o papel dos receptores *toll-like* na patogenia da acne. Os receptores *toll-like* (TLR) são receptores transmembrana do sistema imune inato presentes em monócitos, neutrófilos polimorfonucleares e também em queratinócitos. São ativados por componentes bacterianos, particularmente bactérias Gram-positivas, como o *P. acnes* (Tenaud *et al.*, 2007). Pesquisas atuais mostram que a ativação dos TLR pelo *P. acnes* causa liberação de diversas citocinas próinflamatórias (Thiboutout *et al.*, 2009).

A hipótese de que o *P. acnes* esteja envolvido na patogenia da acne já está bem estabelecida, sendo reforçada pelo tratamento bem sucedido da acne com antibióticos e sua reduzida eficácia quando espécies resistentes de *P. acnes* estão presentes (Bojar; Holland, 2004). Diferenças na sensibilidade individual ao *P. acnes* poderiam explicar as variações na gravidade da acne inflamatória entre os pacientes (Gollnick, 2003). Contudo, somente a colonização por *P. acnes* não está correlacionada com o desenvolvimento da acne, sendo necessária sua interação com os demais fatores etiopatogênicos (Friedlander *et al.*, 2010). Interação esta, que recentemente, é considerada muito mais complexa do que se acreditava.

## **2.2 Tratamento da acne vulgaris**

O tratamento precoce e efetivo é extremamente importante para prevenir as sequelas físicas e psicológicas que a acne pode trazer ao paciente. Os objetivos patofisiológicos do tratamento da acne incluem a redução da produção de sebo, a normalização da queratinização, a redução interfolicular do *P. acnes* e da inflamação, a resolução das lesões inflamatórias e não inflamatórias presentes e a prevenção do desenvolvimento de novas lesões (Gollnick, 2003). A Tabela 2 mostra os agentes mais comumente utilizados para o tratamento da acne e suas ações terapêuticas associadas.

O tipo de tratamento escolhido é determinado pela gravidade da acne, independentemente da idade do paciente. Fatores a serem considerados na avaliação da gravidade da doença incluem a extensão das áreas afetadas, o tipo de lesão predominante e a presença ou ausência de cicatrizes. O tratamento tópico é a primeira escolha nos casos de acne leve à moderada, enquanto a terapia sistêmica é utilizada para tratar os casos de acne moderada à grave (Gollnick, 2003; Eichenfield, 2010).

**Tabela 2 - Agentes utilizados no tratamento da acne e suas ações terapêuticas associadas.**

Adaptado de Gollnick (2003).

<b>Tratamento</b>	<b>Ação queratolítica/comedolítica</b>	<b>Ação anti-microbiana</b>	<b>Ação anti-inflamatória</b>	<b>Ação sebos-supressiva</b>
<b>Tópico</b>				
Tretinoína	Forte	Fraca	Nenhuma	Nenhuma
Adapaleno	Forte	Fraca	Moderada	Nenhuma
Tazaroteno	Forte	Fraca	Nenhuma	Nenhuma
Ácido azelaico	Moderada	Moderada	Fraca	Nenhuma
Peróxido de benzoíla	Fraca*	Forte	Nenhuma	Nenhuma
Agentes antibacterianos tópicos	Fraca*	Forte	Fraca	Nenhuma
<b>Sistêmico</b>				
Agentes antibacterianos orais	Fraca*	Forte	Moderada	Nenhuma
Isotretinoína oral	Forte	Moderada*	Moderada	Forte
Contra-ceptivos orais	Moderada	Nenhuma	Nenhuma	Forte
*Indiretamente.				

### **2.2.1 Tratamento sistêmico**

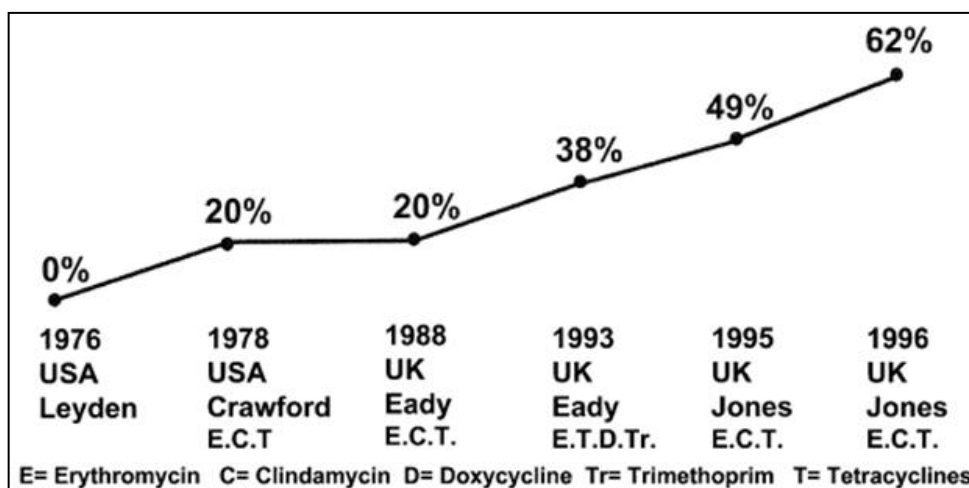
O tratamento sistêmico é reservado para casos de acne moderada à grave, incluindo a acne resistente ao tratamento tópico, a acne na qual o risco de formação de cicatrizes é maior e a acne que atinge grandes áreas da superfície corporal (Thiboutout, 2000; Webster, 2002). As opções incluem os antibióticos orais, a isotretinoína e o tratamento hormonal (Eichenfield, 2010).

#### **2.2.1.1 Antibióticos orais**

Os antibióticos orais são amplamente usados no tratamento da acne inflamatória moderada à grave (Gollnick, 2003). Os antibióticos orais reduzem o número de *P. acnes*, interferindo em seu crescimento e/ou metabolismo, além de terem ação antiinflamatória, como inibição de quimiotaxia. Apresentam efeito indireto na comedogênese, pois esta é intensificada com a ativação do sistema imune pelo *P. acnes* (Webster, 2008).

Os antibióticos orais mais utilizados no tratamento da acne na atualidade são a minociclina e a doxiciclina, mas co-trimoxazol e trimetropim também são alternativas (Eichenfield, 2010). Um aspecto muito importante a ser considerado quanto ao uso de antibióticos é o desenvolvimento de resistência bacteriana, que é um problema de saúde pública mundial, não apenas com relação à acne (Thiboutout *et al.*, 2009).

Em estudo realizado por Cooper (1998) (**Figura 3**), é mostrada a evolução da resistência do *P. acnes* a diversos antibióticos utilizados no tratamento da acne ao longo de vinte anos. Diante dessa realidade, recomenda-se que tanto os antibióticos orais quanto os tópicos não sejam utilizados como monoterapia, não sejam utilizados concomitantemente e que a resposta seja avaliada de 6 a 12 semanas após o início do tratamento, limitando o uso sempre que possível (Thiboutout *et al.*, 2009).



**Figura 3** - Aumento na resistência do *P. acnes* a antibióticos de 1976 à 1996.

Adaptado de Cooper (1998).

### 2.2.1.2 Isotretinoína

Os retinóides sistêmicos, particularmente a isotretinoína, constituem o tratamento mais eficaz para a acne, sendo o único capaz de afetar seus quatro principais fatores etiopatogênicos (Thiboutout, 2000; Gollnick *et al.*, 2003). Seu mecanismo de ação não é completamente entendido, mas ela atua diminuindo a proliferação, diferenciação e atividade dos sebócitos. Além disso, normaliza a queratinização folicular, inibe a comedogênese e apresenta ações antiinflamatórias diretas e indiretas. Embora não tenha efeito antimicrobiano direto, as alterações causadas pela isotretinoína no microambiente folicular determinam redução no número de *P. acnes* (Rigopoulos, 2010).

Seu uso é indicado em casos de acne inflamatória grave, para pacientes que não respondem à terapia convencional, acne moderada à grave recorrente e acne com graves efeitos psicológicos (**Figura 4**) (Gollnick *et al.*, 2003). O tratamento com isotretinoína oral é conhecido por seus efeitos adversos característicos, que incluem ressecamento profundo de mucosas, descamação facial, mialgia, artralgia, anormalidades nas enzimas hepáticas e elevação nos níveis de triglicerídeos e colesterol, dentre outros (Gollnick, 2003). São efeitos reversíveis, relacionados à dose e passíveis de tratamento sintomático.



**Figura 4 - Efeito do tratamento com isotretinoína oral em acne grave.**

**Adaptado de Gollnick *et al.* (2003).**

Seu uso é contraindicado para gestantes dado seu claro efeito teratogênico, além de ser contraindicado durante a lactação e em casos de doença renal ou hepática graves. O uso de contraceptivos orais é recomendado, sem interrupções, de um mês antes do início do tratamento até um mês após seu término (Rigopoulos, 2010).

### **2.2.1.3 Tratamento hormonal**

Os tratamentos hormonais são efetivos na acne porque diminuem os níveis circulantes e locais de andrógenos e, assim seus efeitos nas glândulas sebáceas e nos queratinócitos. As terapias hormonais usadas na acne incluem antiandrógenos (acetato de ciproterona, drospirenona, espironolactona e flutamida) e agentes que diminuem a produção ovariana ou adrenal de andrógenos, como estrógenos, contraceptivos orais combinados, glicocorticóides de baixa dose ou agonistas do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH). Há também pesquisa atual por inibidores específicos de enzimas metabolizadoras de andrógenos como a 5 $\alpha$ -redutase (Katsambas, 2010). A Tabela 3 mostra os mecanismos de ação dos principais agentes terapêuticos utilizados no tratamento hormonal da acne.

**Tabela 3 - Mecanismo de ação das terapias hormonais utilizadas no tratamento da acne.**

Adaptado de Katsambas (2010).

<b>Terapia hormonal</b>	<b>Mecanismo de ação</b>
Acetato de ciproterona	Inibição da ovulação Bloqueio dos receptores de andrógenos
Flutamida	Bloqueio dos receptores de andrógenos
Espironolactona	Bloqueio dos receptores de andrógenos Inibição da 5 $\alpha$ -redutase
Estrógenos	Supressão da produção ovariana de andrógenos por suprimir a liberação hipofisária de gonadotrofina Estimulação da síntese hepática de GLHS*
Contraceptivos orais combinados	Inibição da produção ovariana de andrógenos Estimulação da síntese hepática de GLHS
Glicocorticóides orais	Bloqueio adrenal da produção de andrógenos
Agonistas GnRH	Inibição da produção ovariana de andrógenos

\*GLHS = Globulina de Ligação à Hormônios Sexuais

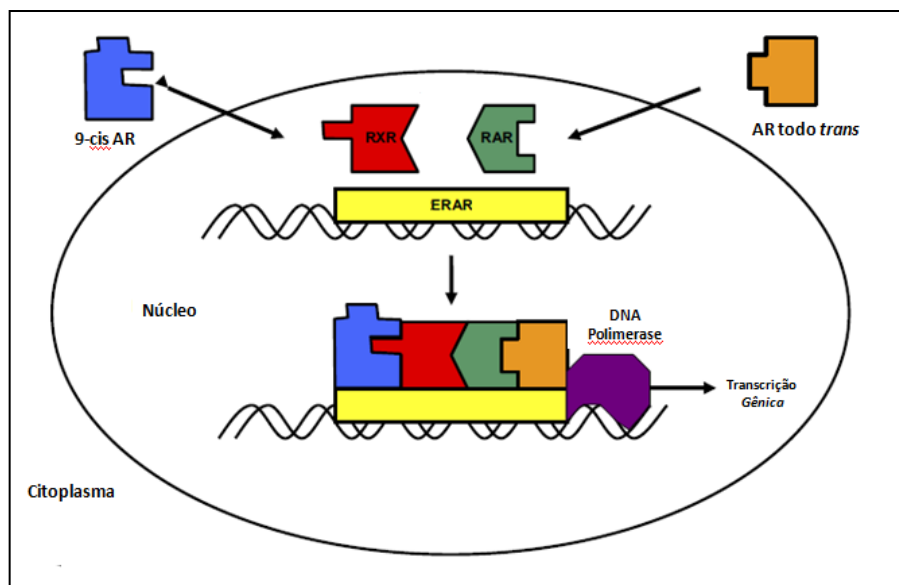
A terapia hormonal é indicada em pacientes do sexo feminino nas seguintes situações: exacerbação da acne após a menstruação, acne resistente ao tratamento com isotretinoína oral, acne de surgimento tardio, síndrome do ovário policístico ou presença de sinais clínicos de hiperandrogenismo, tais como alopecia, seborréia e/ou hirsutismo (Gollnick 2003; Katsambas, 2010).

## 2.2.2 Tratamento tópico

As opções mais recomendadas para o tratamento tópico da acne compreendem os retinóides e antibacterianos. Os retinóides apresentam ação queratolítica primária e efeitos anticomedogênicos, efeitos antiinflamatórios moderados e atividade antibacteriana fraca e indireta, provavelmente por normalizar o ambiente folicular. Os agentes antibacterianos tem ação mais ou menos intensa contra o *P. acnes*, além de ação comedolítica fraca e ações antiinflamatórias (Gollnick; Schramm, 1998).

### 2.2.2.1 Retinóides tópicos

Os retinóides tópicos e fármacos similares, nos quais se incluem o ácido retinóico todo *trans* (tretinoína, AR), o adapaleno e o tazaroteno, são os agentes tópicos mais comumente utilizados. Os retinóides são compostos quimicamente relacionados à vitamina A, também conhecida como retinol. O mecanismo de ação dos retinóides nos queratinócitos é mediado pela ligação a receptores nucleares que fazem parte da família esteróide/tireóide (**Figura 5**) (Zaenglein, 2008).



**Figura 5 - Mecanismo de ação dos retinóides.**

Adaptado de Zaenglein (2008).

O retinol é convertido a ácido retinóico que se liga às proteínas citoplasmáticas de ligação ao ácido retinóico (CRABP). Essas proteínas transportam o AR ao núcleo, onde ele interage com os receptores de AR (RAR's). O complexo AR-RAR forma um dímero com outro complexo formado pelo ácido 9-cis-retinóico e o receptor de retinóide X (RXR). O dímero age como fator de transcrição, alterando a expressão de genes específicos, chamados elementos responsivos ao AR (ERAR), e influenciando a proliferação e diferenciação epiteliais. O uso de retinóides tópicos leva à diminuição do número de comedões e lesões inflamatórias existentes e reduz a formação de novos comedões, uma vez que afetam diretamente a formação do microcomedão (Gollnick; Schramm, 1998; Gollnick *et al.*, 2003).

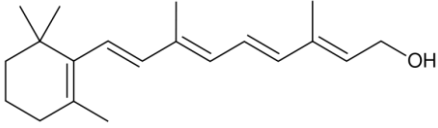
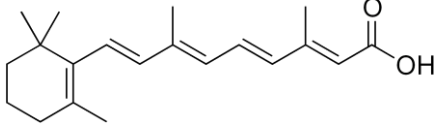
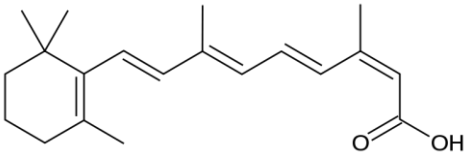
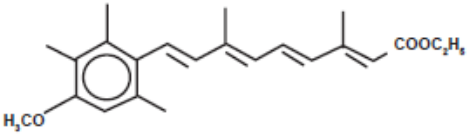
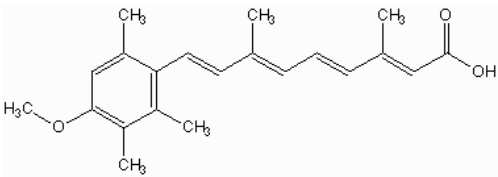
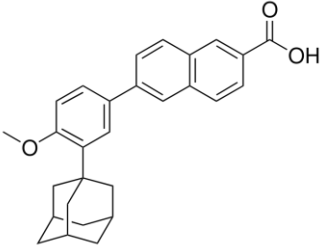
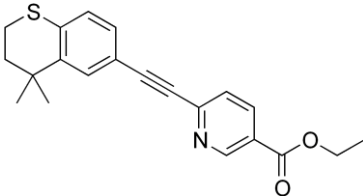
De acordo com sua estrutura química, os retinóides são classificados em retinóides de 1ª, 2ª e 3ª geração (**Tabela 4**) (Mukherjee, 2006). Os retinóides de 1ª geração, representados principalmente pela tretinoína e isotretinoína, foram os primeiros retinóides disponibilizados para o tratamento da acne, destacando-se o uso da tretinoína no tratamento tópico e da isotretinoína no tratamento sistêmico. Os de 2ª geração, representados pelo etretinato e acitretina, são utilizados por via oral no tratamento da psoríase. Já os de 3ª geração, representados pelo adapaleno e tazaroteno, foram introduzidos mais recentemente no mercado e são retinóides produzidos sinteticamente (Zaenglein, 2008).

### **2.2.2.2 Ácido retinóico**

O ácido retinóico todo *trans* (tretinoína, AR) (**Tabela 4**) é um fármaco efetivo no tratamento tópico da acne (Manconi, 2002). Foi o primeiro retinóide usado no tratamento da acne, sendo introduzido no mercado por volta dos anos 70. Também foi o primeiro a ser disponibilizado em formulações genéricas, além de ser, de longe, o retinóide mais estudado em ensaios clínicos de diversos tipos, o que tornou seu uso clínico consagrado até os dias atuais (Leyden, 1998).

O AR tem alta afinidade pelos três subtipos de RAR e pelas CRABP. Encontra-se disponível no mercado em concentrações que vão de 0,01 a 0,1% em veículos diversos, como creme, gel ou solução, entre outros. São muito utilizadas as formulações a 0,025% em creme e gel (Gollnick; Schramm, 1998; Krautheim; Gollnick, 2004).

**Tabela 4 - Classificação e estrutura dos retinóides. Adaptado de Mukherjee (2006).**

Classificação	Estrutura química
<b>1ª geração (Não aromáticos)</b>	
Retinol (Vitamina A)	
Ácido retinóico (Tretinoína)	
Ácido 13-cis-retinóico (Isotretinoína)	
<b>2ª geração (Monoaromáticos)</b>	
Etretinato	
Acitretina	
<b>3ª geração (Poliaromáticos ou arotinóides)</b>	
Adapaleno	
Tazaroteno	

O AR tópico é um agente comedolítico altamente efetivo, promovendo normalização da queratinização, diminuição das lesões inflamatórias e não inflamatórias existentes, além de inibir a formação do microcomedão. A melhora clínica ocorre normalmente no 3º ou 4º mês de tratamento. O AR é efetivo como monoterapia ou terapia combinada nos casos de acne leve à moderada (Thiboutout, 2000).

Embora seu uso sempre esteve associado às suas ações queratolítica e comedolítica, atualmente seus efeitos antiinflamatórios já são conhecidos e possivelmente são causados por sua habilidade de regular a expressão e ativação dos receptores *toll-like* tipo 2 (TLR2), diminuindo a produção de citocinas inflamatórias (Liu *et al.*, 2005; Wang; Zane, 2008). Em estudo realizado por Lucky *et al.* (1998), a aplicação diária de AR, em gel e creme a 0,025%, foi estatisticamente mais efetiva em comparação ao veículo na redução de todos os tipos de lesões.

No entanto, sua aplicação tópica propicia usualmente uma alta incidência de reações adversas, tais como irritação, eritema, ressecamento, descamação e sensibilidade aumentada à luz solar (Thiboutout, 2000). Estas reações adversas locais comprometem a adesão do paciente e a eficácia da terapia. Para minimizar tais efeitos, a terapia deve ser iniciada com baixa concentração, sendo aumentada gradualmente e também é recomendado o uso de hidratantes (Webster, 2002; Thiboutout, 2000). Além disso, novas formulações de AR, bem como novos retinóides vêm sendo desenvolvidos e avaliados (Gollnick *et al.*, 2003).

O medicamento Retin-A Micro®, gel com microesferas, foi a primeira formulação modificada desenvolvida para diminuir a irritação causada pelo AR. As microesferas inertes são carregadas com AR, permanecendo na superfície cutânea e liberando o AR lentamente. Já no medicamento Avita®, o uso de um polímero, o prepoliálprepolímero-2, permite uma liberação lenta do AR, diminuindo a irritação (Zaenglein, 2008). Nas duas formulações, o objetivo é evitar que o AR atinja as camadas mais profundas da epiderme e, desta maneira, reduzir a irritação (Leyden, 1998). Cabe ressaltar que o AR é uma molécula instável, sendo degradada de maneira relativamente fácil pela presença de agentes oxidantes e pela luz (Martin *et al.*, 1998). A fotossensibilidade associada ao seu uso é atribuída aos produtos de fotodegradação (Tashtoush, 2008).

O potencial teratogênico dos retinóides de uso oral, como a isotretinoína, já é bem conhecido, mas os efeitos adversos do AR tópico se limitam à pele. O risco de

efeitos adversos sistêmicos é considerado mínimo, uma vez que cerca de 1 % da droga aplicada na pele alcança a circulação e não altera os níveis de vitamina A. Contudo, o AR é classificado na categoria C de risco à gravidez e a opção pelo tratamento deve ser feita sob a supervisão de um médico (Webster, 1998).

### **2.2.2.3 Antibacterianos tópicos**

Os agentes antibacterianos tópicos atuam principalmente causando redução na colonização por *P. acnes*, além de apresentarem ações comedolíticas e antiinflamatórias. Os mais utilizados são a eritromicina, a clindamicina, o peróxido de benzoíla e o ácido azeláico (Gollnick *et al.*, 2003).

Os antibióticos tópicos são indicados no tratamento da acne inflamatória leve à moderada, sendo a eritromicina e a clindamicina os mais comumente usados, com eficácia equivalente (Krauteim; Gollnick, 2004). Reduzem a população de *P. acnes* e demonstram atividade antiinflamatória por suprimir a quimiotaxia e diminuir a quantidade de ácidos graxos livres proinflamatórios no folículo pilosebáceo (Thiboutout, 2000), além de ter atividade comedolítica indireta (Gollnick, 2003).

Todos os antibióticos tópicos causam irritação local em alguma extensão, que pode ser influenciada pelo veículo usado na formulação (Gollnick, 2003). A eficácia da clindamicina e da eritromicina já está bem estabelecida, mas um dos maiores problemas associados ao seu uso é o desenvolvimento de resistência bacteriana, que tem sido relatado nos últimos anos, particularmente com a eritromicina (Thiboutout, 2000; Webster, 2002).

Como consequência, atualmente o uso da eritromicina e da clindamicina, assim como dos demais antibióticos tópicos, só é recomendado por curto período de tempo e em associação com outro agente tópico, como peróxido de benzoíla ou um retinóide (Krauteim; Gollnick, 2004; Thiboutou *et al.*, 2009).

O peróxido de benzoíla (PB) é um agente bactericida potente que atua por meio da geração de espécies reativas de oxigênio, reduzindo a população de *P. acnes* e levando à uma redução subsequente nos níveis de ácidos graxos livres na pele (Gollnick; Schramm, 1998). O PB causa melhora rápida em lesões inflamatórias e não inflamatórias e é um dos agentes tópicos mais utilizados na atualidade (Thiboutout, 2000).

O PB está disponível em uma grande variedade de concentrações e preparações, sendo muito efetivo e muito usado em combinação com tretinoína ou antibióticos tópicos (Thiboutou *et al.*, 2009). Seus principais efeitos adversos são irritação local, eritema e ressecamento, que são mais pronunciados no início do tratamento e podem ser minimizados com concentrações menores e utilizando creme como veículo (Webster, 2002). O fármaco pode manchar roupas e lençóis, fato que se constitui um inconveniente quando ele deve ser aplicado em regiões como tórax e costas (Thiboutout, 2000).

Cabe destacar que uma maior concentração não está necessariamente relacionada com maior eficácia, uma vez que a comparação de géis contendo PB a 2,5, 5 e a 10% não mostraram diferença significativa quanto à eficácia, mas o gel a 2,5% apresentou menores efeitos adversos (Webster; Graber, 2008). Uma vantagem associada ao uso do PB é o não desenvolvimento de resistência bacteriana (Pawin *et al.*, 2004; Gollnick *et al.*, 2003).

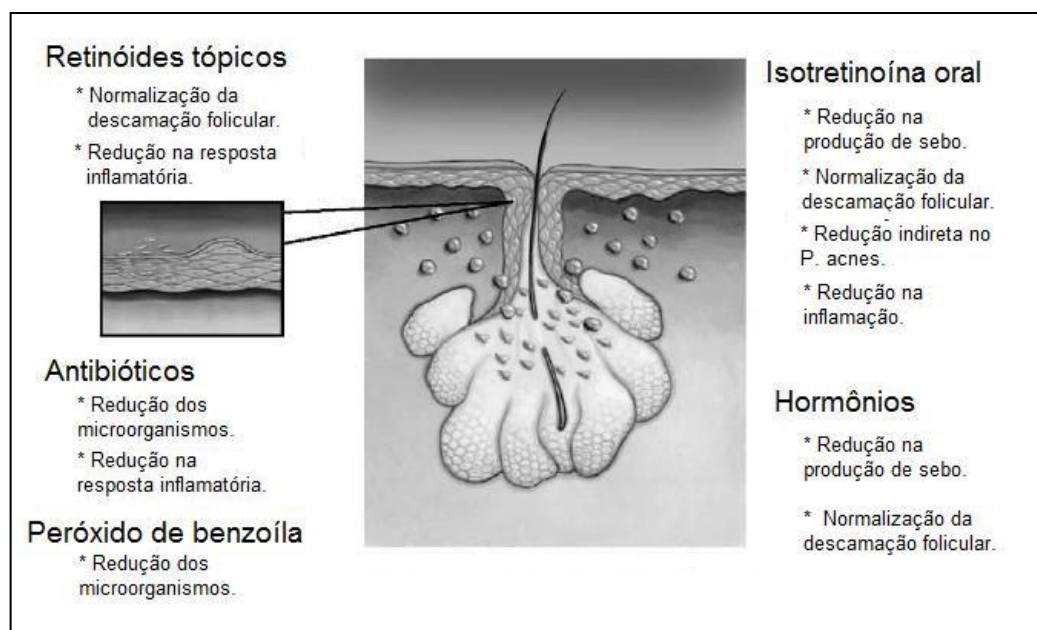
O ácido azeláico, um ácido dicarboxílico de ocorrência natural, apresenta propriedades bacteriostática e comedolítica moderadas, além de fraca atividade antiinflamatória (Thiboutout, 2000). Estudos clínicos mostram que o ácido azeláico é eficaz no tratamento da acne leve à moderada, apresentando eritema e queimação como efeitos adversos mais comuns. Este fármaco é considerado uma opção de associação aos antibióticos tópicos (Krautheim; Gollnick, 2004; Gollnick *et al.*, 2003).

### **2.2.3 Terapia combinada**

Devido à natureza multifatorial da etiopatogenia da acne, a monoterapia é considerada insuficiente para o seu tratamento. A combinação de agentes terapêuticos permite tratar mais de um dos fatores envolvidos na patogênese (**Figura 6**), sendo que a combinação de retinóides com antibióticos orais ou tópicos e a combinação de retinóides tópicos com peróxido de benzoíla são consideradas extremamente efetivas para o tratamento da acne vulgaris (Gollnick, 2003; Thiboutout *et al.*, 2009).

A resolução de lesões inflamatórias e comedões é alcançada de maneira mais rápida e efetiva com a terapia combinada em comparação à terapia isolada. Os antibacterianos tratam as lesões rapidamente por agirem na redução da colonização bacteriana e, em certo grau, na inflamação. Já os retinóides agem de maneira mais

lenta, prevenindo a formação de novas lesões e exercendo efeitos imunomodulatórios na inflamação e na comedogênese. Esse conjunto de ações tem um impacto positivo na adesão do paciente ao tratamento, na autoestima e no bem estar psicológico (Gollnick *et al.*, 2003).



**Figura 6 - Visão geral do mecanismo de ação dos medicamentos usados no tratamento da acne. Adaptado de Gollnick *et al.* (2003).**

Em estudo realizado por Leyden *et al.* (2006) utilizando 2219 pacientes, foram avaliadas a eficácia e a segurança de um gel contendo clindamicina e tretinoína em comparação com cada agente isolado e o veículo. A combinação de clindamicina e tretinoína causou redução significativamente maior em lesões inflamatórias e não inflamatórias em comparação aos demais tratamentos. Com relação à tolerabilidade, a combinação mostrou-se semelhante a cada agente usado isoladamente.

Os retinóides tópicos podem afetar a permeabilidade cutânea por diminuírem a espessura do estrato córneo da epiderme, aumentando, desta forma, a penetração dos antibióticos tópicos. Além disso, o aumento do *turnover* celular no epitélio folicular permitiria que o antibiótico oral alcançasse uma maior concentração na UPS, potencializando seu efeito. Esta estratégia minimizaria o potencial de geração de resistência bacteriana por permitir uma ação mais rápida do antibiótico, limitando a duração da exposição ao mesmo (Gollnick *et al.*, 2003). A possibilidade de

diminuição da resistência bacteriana é considerada outra vantagem no uso da terapia combinada (Tanghetti, 2005)

Atualmente é consenso entre os especialistas que a terapia combinada deve ser o tratamento de primeira escolha para quase todos os pacientes com acne e seus principais benefícios só são alcançados quando os dois tratamentos são aplicados desde o início da terapia (Thiboutou *et al.*, 2009). A interrupção do tratamento antibacteriano após 3 a 4 meses de terapia combinada e o uso de retinóides tópicos para a terapia de manutenção é uma estratégia altamente efetiva, especialmente quando se considera o risco do desenvolvimento de resistência bacteriana com o uso de antibióticos por longo período de tempo (Gollnick, 2003).

Ainda com relação ao risco de resistência bacteriana, tem-se preferido utilizar o PB como agente antibacteriano na terapia combinada, devido ao fato de seu uso não estar associado ao desenvolvimento de resistência (Tanghetti, 2005). Por este aspecto, a combinação retinóide/PB é considerada a mais desejável (Thiboutou *et al.*, 2009).

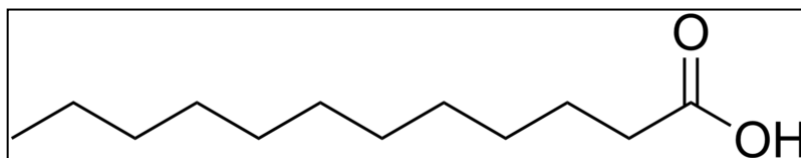
### 2.3 Ácido láurico

Lípides diversos e peptídeos são responsáveis pelo menos por parte da atividade antimicrobiana apresentada pela pele (Nakatsuji *et al.*, 2009). Diversos estudos demonstram a atividade antibacteriana de ácidos graxos presentes no sebo (Drake *et al.*, 2008).

O ácido láurico (AL) (**Figura 7**), ácido graxo saturado com cadeia de 12 átomos de carbono presente no sebo, foi considerado um potente ácido graxo de ação antimicrobiana. Ele é comumente encontrado em produtos naturais como o óleo de coco e o leite (Nakatsuji *et al.*, 2009). O AL mostrou-se efetivo contra bactérias Gram-positivas e seu possível mecanismo de ação é a desintegração da membrana celular, embora não seja o único relatado (Bergsson *et al.*, 2002, Drake *et al.*, 2008).

Estudos prévios realizados por Puhvel; Reisner (1970) mostraram a ação antibacteriana de ácidos graxos livres saturados contra *Corynebacterium acnes*, bactéria Gram-positiva presente na flora cutânea. O ácido láurico foi o que mostrou maior atividade. Foi sugerido que a adição de monoglicerídeos de ácidos graxos de

cadeia média, incluindo o AL, à suplementos nutricionais infantis fornece proteção contra infecções virais e bacterianas (Isaacs *et al.*, 1995).



**Figura 7 – Estrutura química do ácido láurico (ácido dodecanóico).**

Em estudo realizado por Kabara *et al.* (1972) no qual foi investigada a atividade ácidos graxos livres contra vários tipos bactérias, o AL foi o ácido graxo saturado que apresentou maior atividade contra bactérias Gram-positivas. O *P. acnes* é uma bactéria Gram-positiva e seu papel na etiopatogenia da acne vulgaris já é bem conhecido. Apesar de se saber que o AL tem forte ação contra muitas bactérias Gram-positivas, não se sabia ao certo seu efeito especificamente contra o *P. acnes*.

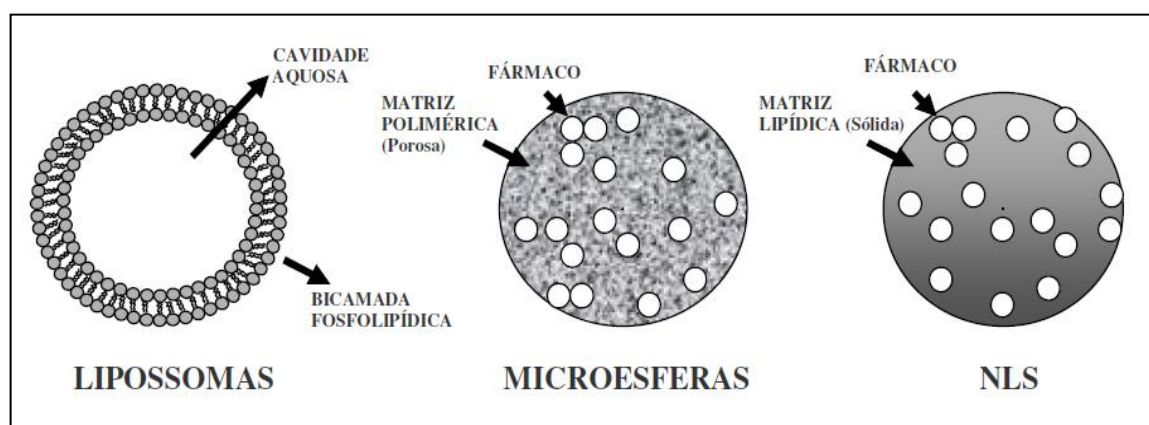
Recentemente, foi mostrado que o AL apresentou elevada atividade contra o *P. acnes*, tanto *in vitro* como em modelo animal de acne inflamatória. Além disso, o AL não induziu toxicidade em sebócitos humanos. Esses resultados indicam o potencial do AL como alternativa para o tratamento da acne vulgaris. (Nakatsuji *et al.*, 2009). Em estudo realizado por Yang *et al.* (2009), uma formulação de lipossomas contendo AL mostrou atividade bactericida contra o *P. acnes in vitro*, sendo superior àquela encontrada para uma solução de AL livre.

## 2.4 Nanopartículas Lipídicas Sólidas

Nos dias atuais, tornou-se evidente que apenas o desenvolvimento de novos fármacos não é suficiente para garantir sucesso na terapia medicamentosa. Promissores resultados de testes *in vitro* são muitas vezes acompanhados por resultados desapontadores *in vivo*, devido à várias razões, incluindo baixa absorção, rápida metabolização, alta toxicidade e baixa solubilidade, entre outras (Mehnert; Mäder, 2001).

No contexto do tratamento tópico da acne vulgaris, o ácido retinóico todo *trans* (tretinoína, AR) é um dos fármacos mais usados. No entanto, sua aplicação tópica propicia usualmente uma alta incidência de reações adversas, tais como

ressecamento, eritema, descamação e irritação. Estas reações adversas locais comprometem a adesão do paciente e a eficácia da terapia (Gollnick *et al.*, 2003). Uma estratégia promissora para contornar tais obstáculos é o desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos. Destes, os sistemas vesiculares e particulados, como nanoemulsões, lipossomas, micro e nanopartículas poliméricas, assim como as nanopartículas lipídicas sólidas, constituem exemplo (**Figura 8**) (Mehnert; Mäder, 2001).



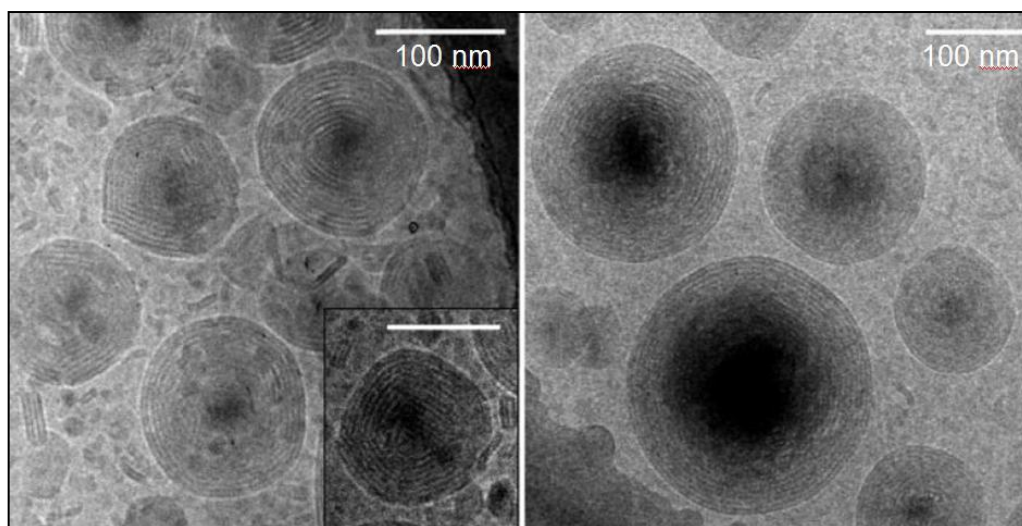
**Figura 8 - Representação esquemática de lipossomas, microesferas poliméricas e nanopartículas lipídicas sólidas (NLS). Adaptado de Castro; Ferreira (2008).**

Esses sistemas permitem a distribuição gradual dos agentes tópicos na pele e, em alguns casos, têm demonstrado habilidade para reduzir a irritação de fármacos antiacne, enquanto mantem uma eficácia similar quando comparados às formulações convencionais (Leyden, 1998). Adicionalmente à liberação controlada de fármacos na epiderme, os sistemas particulados também podem promover o direcionamento folicular, proporcionando uma alta concentração local do agente ativo na UPS (Wosicka; Cal, 2010).

É importante considerar que esses novos sistemas de liberação de fármacos para o tratamento da acne ainda se encontram em constante processo de evolução, não somente quanto ao aprimoramento da penetração tópica, mas também quanto ao direcionamento para camadas específicas da pele, ou mesmo para UPS. Neste sentido, diversos sistemas particulados contendo fármacos para o tratamento da acne, como antibióticos, retinóides e antiandrógenos, tem sido desenvolvidos atualmente. Dentre estes, as Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS), tem sido

descritas como potencial sistema de liberação de fármacos antiacne (Castro; Ferreira, 2008).

As NLS representam um sistema particulado de liberação de fármacos que combina as vantagens dos sistemas tradicionais, como os lipossomas, as partículas poliméricas e as emulsões, mas ao mesmo tempo minimiza alguns dos inconvenientes associados a eles (Joshi; Müller, 2009). As NLS, originalmente desenvolvidas para aplicação parenteral, são partículas feitas de lípides sólidos com um diâmetro médio variando de aproximadamente 50 a 1000 nm (**Figura 9**) (Müller *et al.*, 2000).



**Figura 9 - Nanopartículas lipídicas sólidas de triestearina vistas em microscopia eletrônica de transmissão. Adaptado de Bunjes *et al.* (2007).**

As NLS podem ser derivadas das emulsões para nutrição parenteral pela simples substituição do lípido líquido (óleo) por um lípido sólido. Entretanto, diferentemente das emulsões para nutrição parenteral, as quais normalmente são estabilizadas com lecitina, as NLS podem ser estabilizadas com outros tensoativos ou polímeros, e suas misturas (Müller *et al.*, 2000).

As NLS são indicadas para o carreamento de fármacos lipofílicos e hidrofílicos. Comparadas aos outros sistemas particulados, apresentam algumas vantagens, como boa tolerabilidade e biodegradação, alta biodisponibilidade, liberação sustentada devido à sua matriz sólida e habilidade de prevenir degradação química, fotoquímica ou oxidativa do fármaco. Adicionalmente, a produção das NLS

é facilmente transponível para a escala industrial com baixo custo e sem a utilização de solventes orgânicos (Müller *et al.*, 2000; Joshi; Müller, 2009). Entretanto, alguns problemas devem ser ressaltados, como a limitada eficiência de encapsulação e a expulsão do fármaco da matriz lipídica devido às transformações polimórficas do lípide (Mehnert; Mäder, 2001).

#### **2.4.1 Preparação e caracterização das NLS**

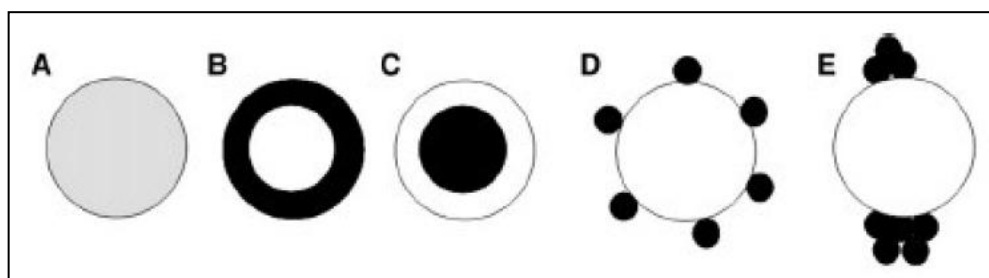
A composição básica das NLS inclui o lípide sólido (de 0,1% a 30% p/p), o tensoativo (de 0,5% a 5% p/p) e o meio aquoso. O principal método de obtenção é através da homogeneização sob alta pressão, técnica já utilizada desde os anos 50 na produção de emulsões para nutrição parenteral. Por esse método pode-se obter as NLS pela técnica de homogeneização a quente ou a frio (Müller *et al.*, 2000; Pardeike *et al.*, 2009).

Na homogeneização a quente, técnica mais freqüentemente utilizada, a mistura fármaco/lípide é aquecida e dispersada numa solução aquosa do tensoativo aquecida à mesma temperatura. Em seguida, a pré-emulsão obtida é homogeneizada sob alta pressão ou submetida ao ultrassom utilizando uma sonda de alta potência. A nanoemulsão obtida é então resfriada à temperatura ambiente, com a recristalização do lípide e a formação das NLS (Mehnert; Mader, 2001; Müller *et al.*, 2000). As NLS podem ser obtidas também através dos métodos de microemulsões e da difusão de solvente, este último apresentando a desvantagem da utilização de solventes orgânicos (Wissing *et al.*, 2004).

A localização do fármaco na matriz lipídica e as interações com a superfície lipídica influenciam sua liberação e terão relevância na penetração tópica (**Figura 10**) (Schäfer-Korting *et al.*, 2007). Se o fármaco está localizado apenas na camada externa, uma liberação imediata será observada e, provavelmente, nenhuma liberação controlada será alcançada. Por outro lado, se o fármaco está homogeneamente distribuído dentro da matriz lipídica, uma liberação controlada pode ser obtida (Mehnert; Mader, 2001; Müller *et al.*, 2000).

Os fatores que determinam o teor de encapsulação (TE) do fármaco nas NLS são a solubilidade do fármaco no lípide, a miscibilidade do fármaco fundido no lípide fundido, a estrutura química e física da matriz lipídica sólida e o estado polimórfico do lípide. Um pré-requisito para obter um alto TE é uma solubilidade elevada do

fármaco no lípide, uma vez que com o resfriamento da mistura fármaco-lípide para formar as NLS, a solubilidade tende a diminuir e pode levar à expulsão do fármaco da partícula lipídica. A adição de mono e diglicerídeos no lípide usado como matriz, assim como a utilização de misturas de lípidos líquidos e sólidos, podem auxiliar a solubilização do fármaco (Müller *et al.*, 2000; Joshi; Müller, 2009).



**Figura 10 - Interações fármaco-NLS. A - Fármaco homogeneamente distribuído na matriz lipídica; B - Fármaco concentrado em camadas; C - Fármaco concentrado no núcleo; D - Fármaco aderido à superfície da partícula; E - Agrupamentos do fármaco aderidos à superfície da partícula. Adaptado de Schäfer-Korting *et al.* (2007).**

Assim como para os demais sistemas de liberação de fármacos, a caracterização adequada é uma das partes mais importantes na pesquisa e desenvolvimento das NLS. Para tal, várias técnicas podem ser usadas, como a medida do potencial zeta e distribuição de tamanho pela espectroscopia por correlação de fótons (PCS), análises de calorimetria exploratória diferencial (DSC) e difração de raios-X (DRX), além de diversos outros métodos físicos, como as microscopias eletrônicas de transmissão (MET) e de força atômica (MFA) e a Ressonância Magnética Nuclear.

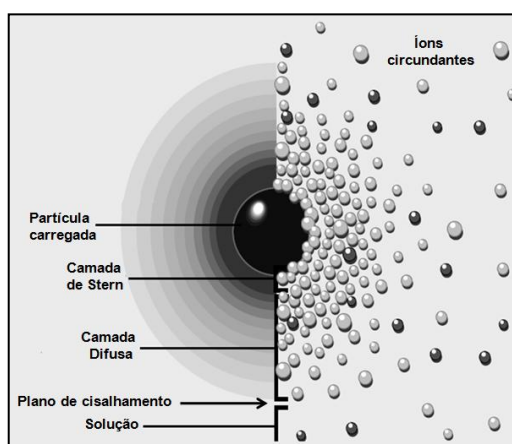
A espectroscopia por correlação de fótons (PCS) mede a intensidade da flutuação da dispersão da luz, que é causada pelo movimento das partículas quando um feixe de laser atravessa a amostra. Este método cobre uma faixa de diâmetro de poucos nanômetros a aproximadamente 3 micrômetros (Mehnert; Mäder, 2001; Müller *et al.*, 2000). A PCS considera as partículas esféricas para conferir um diâmetro.

A medida do potencial zeta permite prever a estabilidade da dispersão durante a estocagem. A interação de partículas em líquidos polares não é governada pelo potencial elétrico na superfície da partícula, mas pelo potencial efetivo da

partícula e seus íons associados. Partículas carregadas atraem íons de carga oposta presentes no meio dispersante. Os íons mais próximos à superfície da partícula ficam fortemente ligados a esta, formando uma camada conhecida como Camada de Stern.

À medida que se distanciam da superfície os íons ficam menos fortemente ligados e formam uma camada conhecida como Camada Difusa. A Camada Difusa apresenta uma região limítrofe, conhecida como plano de cisalhamento, que a separa do seio da solução. O potencial zeta pode ser definido como a carga existente no plano de cisalhamento (**Figura 11**) (Connah; Kasuba, 2000).

A DSC (Differential Scanning Calorimetry) é uma técnica de análise térmica amplamente utilizada para investigar o comportamento de fusão e recristalização de materiais cristalinos das NLS. Alterações estruturais como fusão e recristalização são acompanhadas por trocas de calor. A DSC é usada para medir essas trocas durante um programa de temperatura controlada e permite obter informações sobre as propriedades estruturais de uma amostra.



**Figura 11** - Representação esquemática da distribuição de íons ao redor de uma partícula carregada para geração do potencial zeta. Adaptado de Zeta-Meter Inc. (2010).

Nas análises por DSC, a amostra é aquecida ou resfriada numa taxa controlada e o fluxo de calor absorvido ou liberado por ela é monitorado de maneira quantitativa. O sinal obtido nas medidas por DSC é o fluxo de calor como função do tempo ou da temperatura (Bunjés; Unruh, 2007).

Através da difração de raios-X é possível obter informações sobre o comprimento dos espaçamentos curtos e longos da treliça lipídica, os quais estão fortemente correlacionados com a incorporação do fármaco na matriz lipídica. Com o aumento na formação de modificações mais estáveis na rede cristalina, diminuindo o número de imperfeições, ocorre expulsão do fármaco (Müller *et al.*, 2000).

Os cristais tem a capacidade de difratar um feixe incidente de raios-X pelo fato de estes raios apresentarem comprimentos de onda muito próximos às distâncias entre os átomos ou moléculas que formam a rede cristalina. O padrão de difração de raios-X gerado por uma amostra é mostrado numa placa fotográfica disposta atrás do cristal e sua análise permite a investigação da estrutura cristalina. A estrutura de vários compostos pode ser determinada desta maneira (Heurtault *et al.*, 2003).

As propriedades das formulações de NLS são determinadas, principalmente, através das múltiplas estruturas formadas pelos diferentes componentes da dispersão (lípidos, fármaco, tensoativos, meio de dispersão) e suas interações (Bunjjes; Unruh, 2007).

#### **2.4.2 Aplicação tópica das NLS**

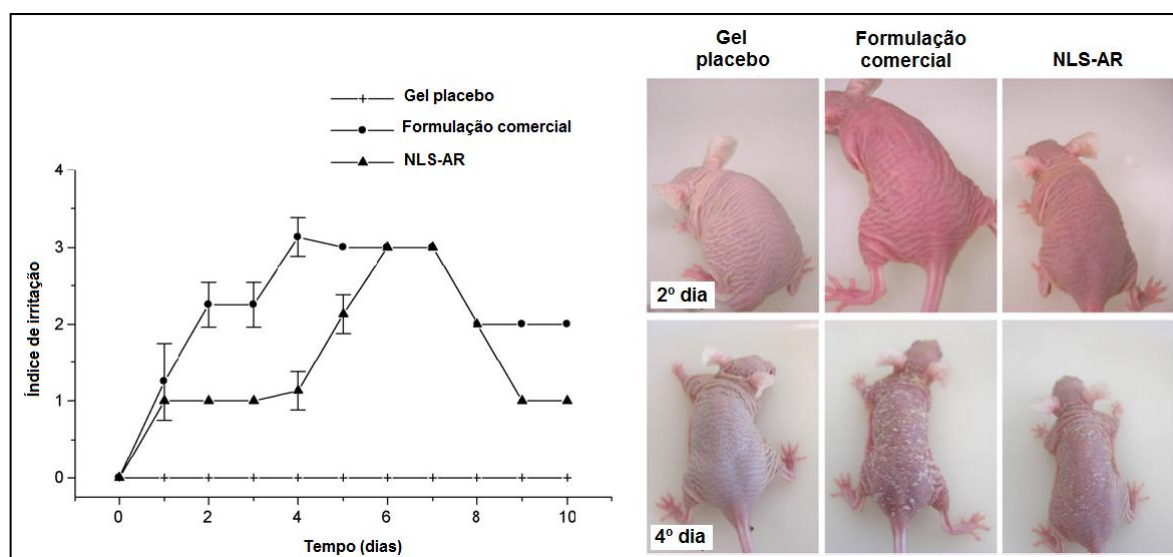
O potencial das NLS como alternativa no tratamento tópico foi primeiramente descrito por Jennings *et al.* (2000b). Foi avaliada a permeação através da pele de porco para formulações de NLS contendo vitamina A (retinol) ou acetato de retinila e ambas mostraram distribuição concentrada nas camadas superiores da epiderme.

A preparação e caracterização das NLS carreando AR (NLS-AR) têm sido relatadas na literatura. Contudo, estes estudos tem se concentrado na administração parenteral ou oral do AR para o tratamento do câncer. Poucos trabalhos têm se dedicado ao desenvolvimento de NLS-AR para a aplicação tópica e, menos ainda, para o tratamento tópico da acne (Castro *et al.*, 2008).

Em estudo realizado por Shah *et al.* (2007), verificou-se que a encapsulação do AR em NLS aumentou sua fotoestabilidade em comparação com uma solução metanólica sob condições de exposição à luz natural. Além disso, o teste de irritação cutânea conduzido em coelhos (teste de Draize) mostrou que a NLS-AR foi significativamente menos irritante quando comparada ao creme comercial de AR (Retinol-A®).

A menor irritação cutânea em comparação à formulação comercial também foi observada para um gel contendo NLS-AR avaliado por Mandawgade; Patravale (2008) para aplicação tópica. Embora as NLS apresentem potencial para direcionamento epidérmico e folicular, poucos estudos foram conduzidos para investigar o potencial das NLS no tratamento da acne (Castro; Ferreira, 2008).

Recentemente, Castro *et al.* (2007) desenvolveram uma formulação de NLS contendo AR com alta taxa de encapsulação (94%) por meio da formação de par iônico com a estearilamina, uma amina lipofílica. Esta alta taxa de encapsulação permaneceu constante mesmo após 360 dias.



**Figura 12 - Irritação cutânea induzida por AR em camundongos rhino durante tratamento com gel placebo, formulação comercial contendo AR e NLS-AR e aparência da pele no 2º e 4º dias após o início do tratamento. Adaptado de Castro *et al.* (2009).**

Além disso, os estudos de irritação cutânea utilizando camundongos rhino (Figura 12) realizados por Castro *et al.* (2009), mostraram que as NLS-AR foram significativamente menos irritantes quando comparadas à formulação comercial de AR, constituindo uma alternativa para o tratamento tópico da acne.

As NLS apresentam potencial como sistema de liberação na aplicação tópica de fármacos. Cabe lembrar que a eficácia e as vantagens da combinação de retinóides e antibacterianos no tratamento tópico da acne vulgaris já é reconhecida. Considerando esta informação e a recente atividade contra o *P.acnes* mostrada pelo

AL, o desenvolvimento e a avaliação de uma formulação de NLS carregada com AR e AL constituem uma alternativa inovadora para o tratamento da acne.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Desenvolver, caracterizar e avaliar a atividade antibacteriana *in vitro* de nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) contendo ácido retinóico (AR) e ácido láurico (AL) para o tratamento tópico da acne vulgaris.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Avaliar as características das NLS preparadas após incorporação do AR e do AL;
- Desenvolver um método para determinação do AL nas NLS através da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE);
- Determinar o teor de encapsulação do AR e do AL nas NLS;
- Avaliar a influência da estearilamina no teor de encapsulação do AL;
- Determinar o diâmetro (nm) e o potencial zeta (mV) das formulações desenvolvidas;
- Caracterizar as formulações desenvolvidas por Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e difração de raios-X (DRX);
- Avaliar a atividade inibidora das NLS contendo AR e AL sobre o crescimento *in vitro* de *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Material

O Compritol 888 ATO<sup>®</sup> [behenato de glicerila; mistura de mono, di e triglicerídeos do ácido behênico, um ácido graxo de cadeia longa (C22)] foi fornecido pela Gattefossé (França). O álcool cetílico etoxilado com 20 moles de óxido de etileno (Brij 58<sup>®</sup>), foi fornecido pela Sigma-Aldrich, Canadá. O colesterol foi fornecido pela Sigma-Aldrich, Japão. A estearilamina (Octadecilamina) foi fornecida pela Aldrich, Suíça. O ácido retinóico (AR, tretinoína) foi fornecido pela Basf, Alemanha. O ácido láurico (Ácido dodecanóico) foi fornecido pela Sigma, Malásia. O brometo de fenacila (2-Bromoacetofenona) foi fornecido pela Sigma-Aldrich, Suíça. A trietilamina foi fornecida pela Sigma-Aldrich, Bélgica. Todos os outros reagentes utilizados foram de grau analítico.

A solução Tampão Fosfato Salina (PBS) pH 7,4 foi preparada dissolvendo-se 0,795 g de fosfato dibásico de sódio heptaidratado ( $\text{NaHPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), 0,144 g de fosfato monobásico de potássio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) e 9,0 g de cloreto de sódio em 500 mL de água destilada. Esta solução foi transferida para um balão volumétrico de 1000 mL e o volume completado com água destilada. Ajustou-se o pH para 7,4 com ácido clorídrico (HCl) 0,1 M ou hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 M conforme a necessidade.

### 4.2 Métodos

#### **4.2.1 Metodologia de determinação da concentração do AR por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)**

A metodologia de determinação da concentração do AR por CLAE foi previamente desenvolvida e validada por Goulart (2008). As condições cromatográficas são descritas abaixo.

#### **4.2.1.1 Condições cromatográficas**

Fase móvel	Acetonitrila : Água : Ácido fosfórico 85% (80 : 19,9 : 0,1)
Fluxo	1,0 mL/min
Volume de injeção	20 µL
Detecção	340 nm
Temperatura	25 °C
Equipamento	Módulo de bomba isocrática Waters 515 (Milford, EUA); injetor automático Waters 717 Plus (Milford, EUA) e detector UV-Vis Waters TM 486 (Milford, EUA).
Coluna	Fase reversa C18 (LichroCart 125-4, Merck, Alemanha)

#### **4.2.1.2 Preparo da fase móvel**

A fase móvel foi preparada misturando-se acetonitrila grau CLAE e água recentemente destilada na proporção indicada de 80 partes para 19,9 partes, respectivamente. Em seguida, adicionou-se 0,1% v/v de ácido fosfórico 85% e homogeneizou-se. A fase móvel preparada foi filtrada em membrana de PTFE de 0,45 µm (HVLPO4700, Millipore, EUA) e degaseificada durante 20 minutos em banho de ultrassom (USC 1400, Unique, Brasil).

#### **4.2.2 Desenvolvimento e validação da metodologia de determinação da concentração do AL por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)**

O método de análise para a determinação da concentração do AL por CLAE foi extraído dos trabalhos de Borch (1975) e Mehta (1998). As condições cromatográficas são descritas abaixo:

#### **4.2.2.1 Condições cromatográficas**

Fase móvel	Acetonitrila : Água (90 : 10)
Fluxo	1,5 mL/min
Volume de injeção	20 µL
Detecção	254 nm
Temperatura	25 °C
Equipamento	Módulo de bomba isocrática Waters 515 (Milford, EUA); injetor automático Waters 717 Plus (Milford, EUA) e detector UV-Vis Waters TM 486 (Milford, EUA).
Coluna	Fase reversa C18 (LichroCart 125-4, Merck, Alemanha)

#### **4.2.2.2 Preparo da fase móvel**

A fase móvel foi preparada misturando-se acetonitrila grau CLAE e água recentemente destilada na proporção indicada de 90 partes para 10 partes, respectivamente. Após homogeneização, a fase móvel preparada foi filtrada em membrana de PTFE de 0,45 µm (HVLPO4700, Millipore, EUA) e degaseificada durante 20 minutos em banho de ultrassom (USC 1400, Unique, Brasil).

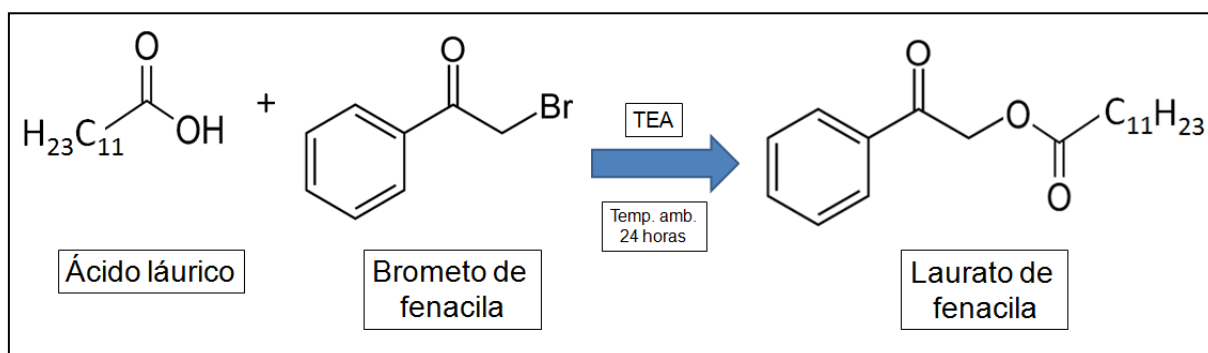
#### **4.2.2.3 Linearidade da curva analítica**

A linearidade da curva analítica corresponde à capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (Brasil, 2003).

Devido ao fato de o AL não apresentar nenhum grupo cromóforo que facilite sua detecção na faixa do ultravioleta-visível, uma alternativa é realizar sua derivatização, permitindo a inserção de um grupo cromóforo e sua análise por

técnicas como a CLAE. Uma das reações mais utilizadas na derivatização de ácidos graxos como o AL é a reação com o composto brometo de fenacila (Mehta, 1998).

Para a obtenção da curva analítica por meio da reação de derivatização do AL, foram transferidos 1,0 mL de solução de AL (0,5 mg/mL) em acetona, 1,0 mL de solução de brometo de fenacila (BF; 3,0 mg/mL) em acetona e 1,0 mL de solução de trietilamina (TEA; 2,5 mg/mL) em acetona para um balão de fundo redondo de 10 mL. A mistura reacional foi deixada em agitação durante 24 horas à temperatura ambiente. De acordo com Antunes *et al.* (2009), nesta reação a TEA atua como catalizador, facilitando a desprotonação do AL e a retirada do bromo da molécula de BF (Figura 13).



**Figura 13 - Representação esquemática da reação de derivatização do ácido láurico com o brometo de fenacila, utilizando trietilamina como catalisador.**

Após o final do tempo de reação, foi realizada a evaporação da acetona em rotavapor (modelo R-215, Büchi, Suíça) utilizando bomba de vácuo (modelo V-700, Büchi, Suíça) e banho de aquecimento (modelo B-491, Büchi, Suíça) a 45 °C. O resíduo foi quantitativamente transferido para um balão volumétrico de 25 mL, usando 12 mL de acetonitrila e o volume do balão completado com fase móvel. A solução foi homogeneizada, obtendo-se uma concentração final de 20 µg/mL de AL derivatizado. A partir da solução de 20 µg/mL, também considerada um dos pontos da curva, foram preparadas soluções-padrão com as seguintes concentrações: 1,0, 2,0, 5,0 e 10 µg/mL. Cada diluição foi realizada em triplicata.

Após estabilização da coluna, nas condições do ensaio, as soluções-padrão filtradas (Millex HV - 0,45 µm de diâmetro de poro, JBR610222, Millipore, EUA) foram injetadas no cromatógrafo, em triplicata. A partir das médias das áreas

absolutas dos picos correspondentes a cada concentração do padrão foram plotadas em gráfico de área *versus* concentração. A equação da reta, para a representação gráfica da curva analítica, foi determinada através do estudo da regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados. A linearidade da curva analítica foi avaliada pela variância em torno da inclinação da linha de regressão, por meio do coeficiente de correlação ( $r$ ). A faixa de variação corresponde ao intervalo entre a concentração inferior e a superior da substância analisada que atenda aos requisitos de linearidade. Neste caso, o intervalo linear de concentração foi de 1,0 a 20,0  $\mu\text{g/mL}$ .

#### **4.2.2.4 Seletividade do método analítico**

É a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes, tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz. Para a análise quantitativa, a seletividade pode ser determinada pela comparação dos resultados obtidos de amostras do fármaco contaminadas com quantidades apropriadas de impurezas ou excipientes e amostras não contaminadas, para demonstrar que o resultado do teste não é afetado por esses materiais (Brasil, 2003).

Para a avaliação da seletividade pesou-se 100 mg da NLS Branco (sem o AL) e transferiu-se para um balão volumétrico de 10 mL. O volume foi completado com THF e a solução foi homogeneizada até solubilização completa das NLS. Em seguida, foi realizada a evaporação do THF em rotavapor (modelo R-215, Büchi, Suíça) utilizando bomba de vácuo (modelo V-700, Büchi, Suíça) e banho de aquecimento (modelo B-491, Büchi, Suíça) a 45 °C. Após evaporação, foram transferidos 1,0 mL de acetona, 1,0 mL de solução de brometo de fenacila (BF; 3,0 mg/mL) em acetona e 1,0 mL de solução de trietilamina (TEA; 2,5 mg/mL) em acetona para o balão contendo o resíduo das NLS. A mistura reacional foi deixada em agitação durante 24 horas à temperatura ambiente.

Após o final do tempo de reação, foi realizada a evaporação da acetona em rotavapor (modelo R-215, Büchi, Suíça) utilizando bomba de vácuo (modelo V-700, Büchi, Suíça) e banho de aquecimento (modelo B-491, Büchi, Suíça) a 45 °C. O resíduo foi quantitativamente transferido para um balão volumétrico de 25 mL, usando 12 mL de acetonitrila e o volume do balão completado com fase móvel. Em seguida, a solução foi homogeneizada e filtrada através de unidades filtrantes

descartáveis compostas de membrana *Durapore* PVDF não estéril com 0,45 µm de diâmetro de poro (Millex HV, JBR610222, Millipore, EUA). A seletividade do método para o AL foi avaliada por CLAE, verificando-se a presença de picos de absorção no comprimento de onda de 254 nm.

#### **4.2.2.5 Determinação da precisão do método analítico**

A precisão é avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de um amostragem múltipla de uma mesma amostra (Brasil, 2003). A precisão do método foi avaliada quanto à repetibilidade e à precisão intermediária.

Na repetibilidade (precisão intra-corrída) avalia-se a concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação. A repetibilidade do método é verificada por, no mínimo, nove determinações, contemplando o intervalo linear do método, ou seja, três concentrações, baixa, média e alta, com três réplicas cada ou mínimo de seis determinações a 100% da concentração do teste (Brasil, 2003).

Na precisão intermediária (precisão inter-corrída) avalia-se a concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes ou equipamentos diferentes (Brasil, 2003).

A precisão, expressa como desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%), foi calculada de acordo com a seguinte fórmula:  $DPR = (DP/CMD) \times 100$ ; onde DP é o desvio padrão e CMD, a concentração média determinada. O valor máximo aceitável deve ser definido de acordo com a metodologia empregada, a concentração do analito na amostra, o tipo de matriz e a finalidade, não se admitindo valores superiores a 5% (Brasil, 2003).

Para a avaliação da repetibilidade do método, foram preparadas soluções com as concentrações de 2,0 (baixa), 10 (média) e 20 (alta) µg/mL de AL derivatizado, de acordo com a metodologia descrita no item 4.2.2.3 e o CV das áreas correspondentes aos picos foi analisado. Para a avaliação da precisão intermediária, este mesmo procedimento foi realizado em dois dias diferentes.

#### **4.2.2.6 Determinação da exatidão do método analítico**

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro. A exatidão deve ser determinada após o estabelecimento da linearidade, do intervalo linear e da especificidade do método, sendo verificada a partir de, no mínimo, 9 (nove) determinações contemplando o intervalo linear do procedimento, ou seja, 3 (três) concentrações, baixa, média e alta, com 3 (três) réplicas cada (Brasil, 2003).

Para a avaliação da exatidão pesou-se 9 amostras 100 mg da NLS branco (sem o AL) e transferiu-se para um balão volumétrico de 10 mL. O volume foi completado com THF e a solução foi homogeneizada até solubilização completa das NLS. Em seguida, foi realizada a evaporação do THF em rotavapor (modelo R-215, Büchi, Suíça) utilizando bomba de vácuo (modelo V-700, Büchi, Suíça) e banho de aquecimento (modelo B-491, Büchi, Suíça) a 45 °C. Após evaporação, as amostras foram divididas em três grupos, com três amostras cada. Para cada grupo de três amostras foi transferido 1,0 mL de solução de AL 0,02 mg/mL (concentração baixa), 0,1 mg/mL (concentração média) e 0,2 mg/mL (concentração alta). Em seguida, para todas as amostras foram adicionados 1,0 mL de solução de brometo de fenacila (BF; 3,0 mg/mL) em acetona e 1,0 mL de solução de trietilamina (TEA; 2,5 mg/mL) em acetona. A mistura reacional foi deixada em agitação durante 24 horas à temperatura ambiente.

Após o final do tempo de reação, foi realizada a evaporação da acetona em rotavapor (modelo R-215, Büchi, Suíça) utilizando bomba de vácuo (modelo V-700, Büchi, Suíça) e banho de aquecimento (modelo B-491, Büchi, Suíça) a 45 °C. O resíduo foi quantitativamente transferido para um balão volumétrico de 10 mL, usando acetonitrila e o volume do balão completado com fase móvel. Em seguida, a solução foi homogeneizada e filtrada através de unidades filtrantes descartáveis compostas de membrana *Durapore* PVDF não estéril com 0,45 µm de diâmetro de poro (Millex HV, JBR610222, Millipore, EUA). A exatidão do método analítico foi determinada avaliando-se a capacidade de recuperação do AL derivatizado a partir das NLS através da equação:  $\text{exatidão} = (\text{concentração média experimental} / \text{concentração teórica}) \times 100$ , conforme especificado pela RE 899 (BRASIL, 2003).

#### **4.2.2.7 Determinação da robustez do método analítico**

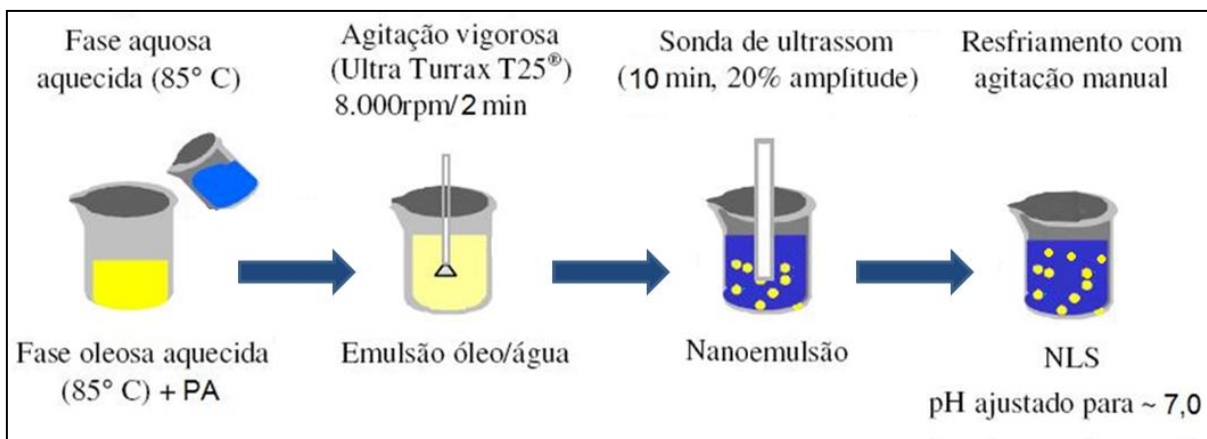
A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. Indica sua confiança durante o uso normal. Durante o desenvolvimento da metodologia, deve-se considerar a avaliação da robustez, constatando-se a susceptibilidade do método às variações nas condições analíticas, estas deverão ser controladas e precauções devem ser incluídas no procedimento (BRASIL, 2003).

Para a avaliação do parâmetro robustez, como especificado pela RE 899 (Brasil 2003), dois fabricantes diferentes de THF [Synth (São Paulo) e Merck (Alemanha)] foram avaliados para a robustez da técnica de extração do AL frente à variação do agente extrator. Também para avaliação da robustez, a fase móvel foi preparada com variações na proporção de acetonitrila ( $90 \pm 2\%$ ) para verificar a robustez frente às variações de composição da fase que podem ocorrer durante o uso da metodologia.

#### **4.2.3 Preparação das NLS**

As NLS foram preparadas pelo método da homogeneização a quente, utilizando o agitador Ultra Turrax T-25 (Ika Labortechnik, Alemanha) e um aparelho de homogeneização do tipo ultrassom com sonda de alta potência (Ultra-cell 750W; Sonics Materials Inc., EUA). A fase oleosa (FO) foi pesada e aquecida a 85°C. Paralelamente, a fase aquosa (FA) também foi aquecida à mesma temperatura. Mantendo-se a temperatura a 85°C, a FA foi lentamente vertida sobre a FO sob uma agitação de 8.000 rotações por minuto (RPM) no agitador Ultra Turrax T-25 durante dois minutos. Em seguida, a emulsão foi homogeneizada durante dez minutos utilizando ultrassom com sonda de alta potência (20 % de amplitude). Após este tempo, a nanoemulsão formada foi resfriada em banho de água com agitação manual para formação das NLS (**Figura 14**).

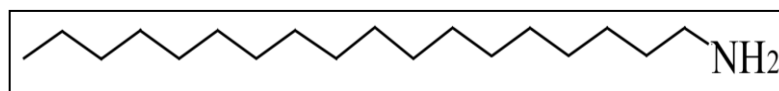
Em um primeiro momento, foram preparadas formulações de NLS contendo AR e avaliada a influência dos parâmetros de preparação sobre o diâmetro médio e o potencial zeta das partículas. Além disso, foi avaliada a influência da formação de par iônico entre o AR e a estearilamina (STE), uma amina lipofílica (**Figura 15**), sobre o teor de encapsulação do AR (**Tabela 5**).



**Figura 14** - Representação esquemática da preparação das nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) pelo método de homogeneização a quente utilizando ultrassom com sonda de alta potência.

**Tabela 5:** Composição das nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) contendo ácido retinóico (AR) (%p/p).

Componentes	NLS AR	NLS AR
	0% STE	0,2% STE
<b>Fase oleosa (%p/p)</b>		
Ácido retinóico	0,05	0,05
Compritol ATO 888	5,0	5,0
Brij 58® (Álcool cetílico etoxilado com 20 moles de óxido de etileno)	2,0	2,0
Colesterol	0,5	0,5
Estearilamina	-	0,2
BHT	0,01	0,01
<b>Fase aquosa (%p/p)</b>		
Propilenoglicol	5,0	5,0
EDTA	0,01	0,01
Água destilada q.s.p.	100	100



**Figura 15 - Estrutura química da estearilamina (octadecilamina).**

Em um segundo momento, foram preparadas formulações de NLS contendo AL. Foram avaliados o diâmetro médio e o potencial zeta das partículas, assim como a influência da estearilamina sobre o teor de encapsulação do AL nas NLS. Para esta avaliação, foram utilizados três níveis de estearilamina (0, 0,2 e 0,4%) (**Tabela 6**). O nível 0,4% foi avaliado considerando a adição posterior do AR à formulação, uma vez que, teoricamente, o nível de 0,2% não seria suficiente para a formação do par iônico com o AR e com o AL e ainda o consumo da acidez livre do Compritol ATO 888 (Acidez máxima: 4 mg KOH/g).

**Tabela 6: Composição das nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) contendo ácido láurico (AL) (%p/p).**

<b>Componentes</b>	<b>NLS AL 0% STE</b>	<b>NLS AL 0,2% STE</b>	<b>NLS AL 0,4% STE</b>
<b>Fase oleosa (%p/p)</b>			
Ácido láurico	0,1	0,1	0,1
Compritol ATO 888	5,0	5,0	5,0
Brij 58® (Álcool cetílico etoxilado com 20 moles de óxido de etileno)	2,0	2,0	2,0
Colesterol	0,5	0,5	0,5
Estearilamina	-	0,2	0,4
BHT	0,01	0,01	0,01
<b>Fase aquosa (%p/p)</b>			
Propilenoglicol	5,0	5,0	5,0
EDTA	0,01	0,01	0,01
Água destilada q.s.p.	100	100	100

Em um terceiro momento, foram preparadas formulações de NLS contendo AR e AL. Assim como para as formulações anteriores, foram avaliados o diâmetro

médio e o potencial zeta das partículas. A influência da STE sobre o teor de encapsulação para ambos os ácidos foi avaliada utilizando três níveis de STE (0, 0,2 e 0,4%) (**Tabela 7**), sendo as análises realizadas após a preparação e 15 depois.

**Tabela 7: Composição das nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) contendo ácido retinóico (AR) e ácido láurico (AL) (%p/p).**

<b>Componentes</b>	<b>NLS AR+AL 0% STE</b>	<b>NLS AR+AL 0,2% STE</b>	<b>NLS AR+AL 0,4% STE</b>
<b>Fase oleosa (%p/p)</b>			
Ácido retinóico	0,05	0,05	0,05
Ácido láurico	0,1	0,1	0,1
Compritol ATO 888	5,0	5,0	5,0
Brij 58® (Álcool cetílico etoxilado com 20 moles de óxido de etileno)	2,0	2,0	2,0
Colesterol	0,5	0,5	0,5
Estearilamina	-	0,2	0,4
BHT	0,01	0,01	0,01
<b>Fase aquosa (%p/p)</b>			
Propilenoglicol	5,0	5,0	5,0
EDTA	0,01	0,01	0,01
Água destilada q.s.p.	100	100	100

#### **4.2.4 Caracterização das NLS**

##### **4.2.4.1 Determinação do pH**

O pH da dispersão de NLS contendo o par iônico (AR ou AL + STE) foi ajustado para 7,0 com uma solução de HCl 0,1M utilizando um medidor de pH (Digimed DM 20, Ribeirão Preto, Brasil). Em virtude da baixa viscosidade do sistema não foram realizadas diluições para a determinação e o ajuste do pH.

#### **4.2.4.2 Diâmetro das partículas**

O diâmetro médio das NLS na dispersão foi determinado por espectroscopia de correlação de fótons utilizando um Zetasizer 3000HSA (Malvern Instruments, Inglaterra) a um ângulo fixo de 90° e temperatura de 25° C. As dispersões de NLS foram diluídas em água destilada previamente filtrada através de membrana de éster de celulose com 0,45 µm de diâmetro de poro (HAWPO4700, Millipore, EUA) até a obtenção de 50 a 300 Kcps (1000 contagens por segundo). Os resultados foram fornecidos como diâmetro efetivo (diâmetro médio avaliado pela intensidade). O valor máximo aceitável para o IP foi 0,5. Todas as medidas foram realizadas em triplicata, sendo cada triplicata correspondente à média de dez medidas.

#### **4.2.4.3 Potencial zeta**

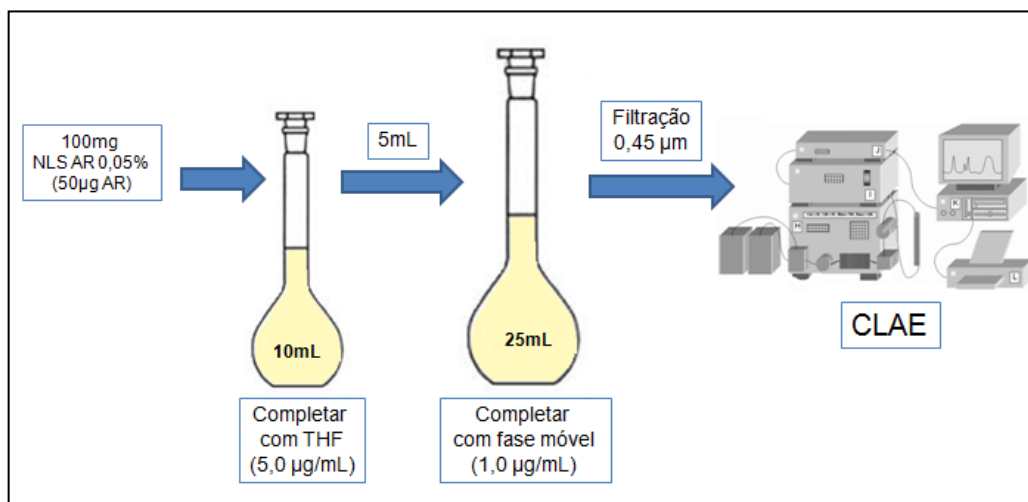
O potencial zeta foi determinado por espalhamento dinâmico da luz e análise da mobilidade eletroforética das NLS. As medidas de potencial zeta foram realizadas utilizando um Zetasizer 3000HSA (Malvern Instruments, Inglaterra) à temperatura de 25° C. As dispersões das NLS foram diluídas em solução de cloreto de sódio 1 mM previamente filtrada através de membrana de éster de celulose com 0,45 µm de diâmetro de poro (HAWPO4700, Millipore, EUA), até a contagem de 100 a 1.000 Kcps. Todas as medidas foram realizadas em triplicata.

#### **4.2.4.4 Teor de encapsulação do AR**

O método de avaliação do teor de encapsulação (TE) do AR foi baseado na determinação da concentração de AR nas NLS antes (Concentração total) e após (Concentração no filtrado) filtração em unidade filtrante descartável composta de membrana Durapore PVDF não estéril com 0,45 µm de diâmetro de poro (Millex HV, JBR610222, Millipore, EUA). A filtração promove remoção dos cristais de AR não encapsulados.

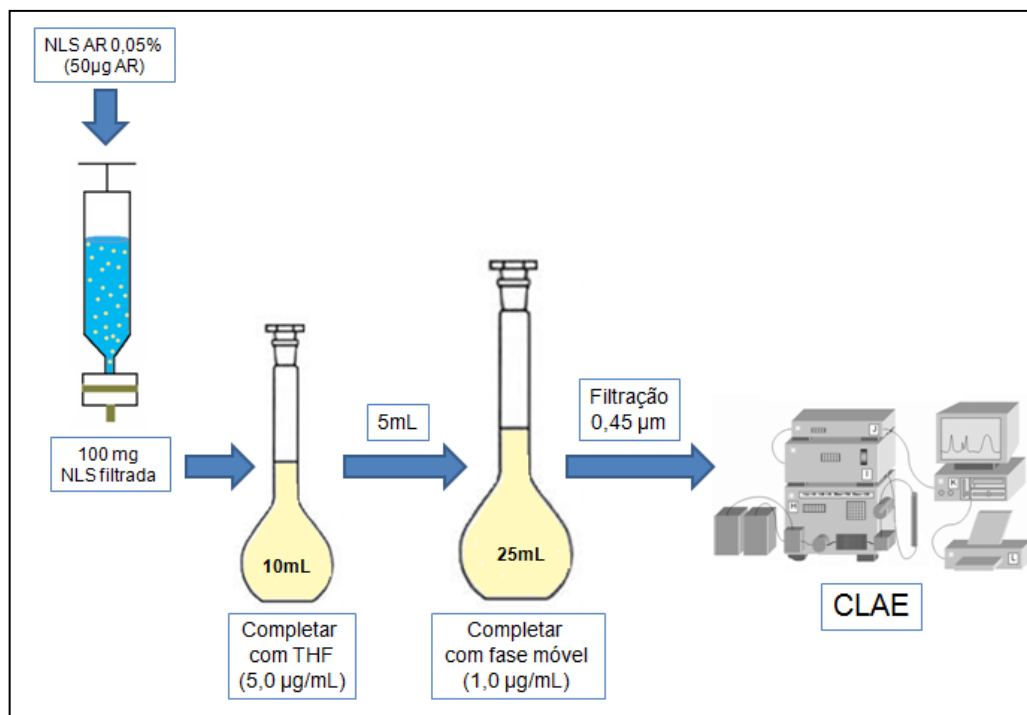
Para análise do teor de AR antes da filtração (AR Total) foram pesados 100 mg da dispersão de NLS AR 0,05% em um balão volumétrico de 10 mL e completou-se o volume com THF (Concentração: 5,0 µg/mL). Após homogeneização, a solução mostrou-se límpida, devido à completa solubilização das NLS. Em seguida,

transferiu-se 5 mL da solução para um balão volumétrico de 25 mL e completou-se o volume com a fase móvel (Concentração: 1,0 µg/mL). A solução resultante manteve o AR solúvel, mas propiciou a precipitação do lípide. Essa dispersão foi filtrada através de unidade filtrante descartável composta de membrana Durapore PVDF não estéril com 0,45 µm de diâmetro de poro (Millex HV, JBR610222, Millipore, EUA) e analisada por CLAE (**Figura 16**).



**Figura 16** - Representação esquemática da metodologia para determinação da concentração total do ácido retinóico (AR) nas nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

Para análise do AR após a filtração (AR encapsulado) foi realizada filtração da dispersão de NLS em unidade filtrante descartável composta de membrana Durapore PVDF não estéril com 0,45 µm de diâmetro de poro (Millex HV, JBR610222, Millipore, EUA). Em seguida, 100 mg da dispersão filtrada foram pesados e transferidos para um balão volumétrico de 10 mL, completando-se o volume com THF (Concentração: 5,0 µg/mL). Após homogeneização, a solução obtida é límpida, devido à completa solubilização das NLS. Em seguida, transferiu-se 5 mL da solução para um balão volumétrico de 25 mL e completou-se o volume com a fase móvel (Concentração: 1,0 µg/mL). A solução resultante manteve o AR solúvel, mas propiciou a precipitação do lípide. Essa dispersão foi filtrada através de unidade filtrante descartável composta de membrana Durapore PVDF não estéril com 0,45 µm de diâmetro de poro (Millex HV, JBR610222, Millipore, EUA) e analisada por CLAE (**Figura 17**).



**Figura 17 - Representação esquemática da metodologia para determinação da concentração do ácido retinóico (AR) encapsulado nas nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).**

O teor de encapsulação foi calculado pela fórmula:

$$TE (\%) = (AR \text{ do filtrado} / AR \text{ teor total}) \times 100$$

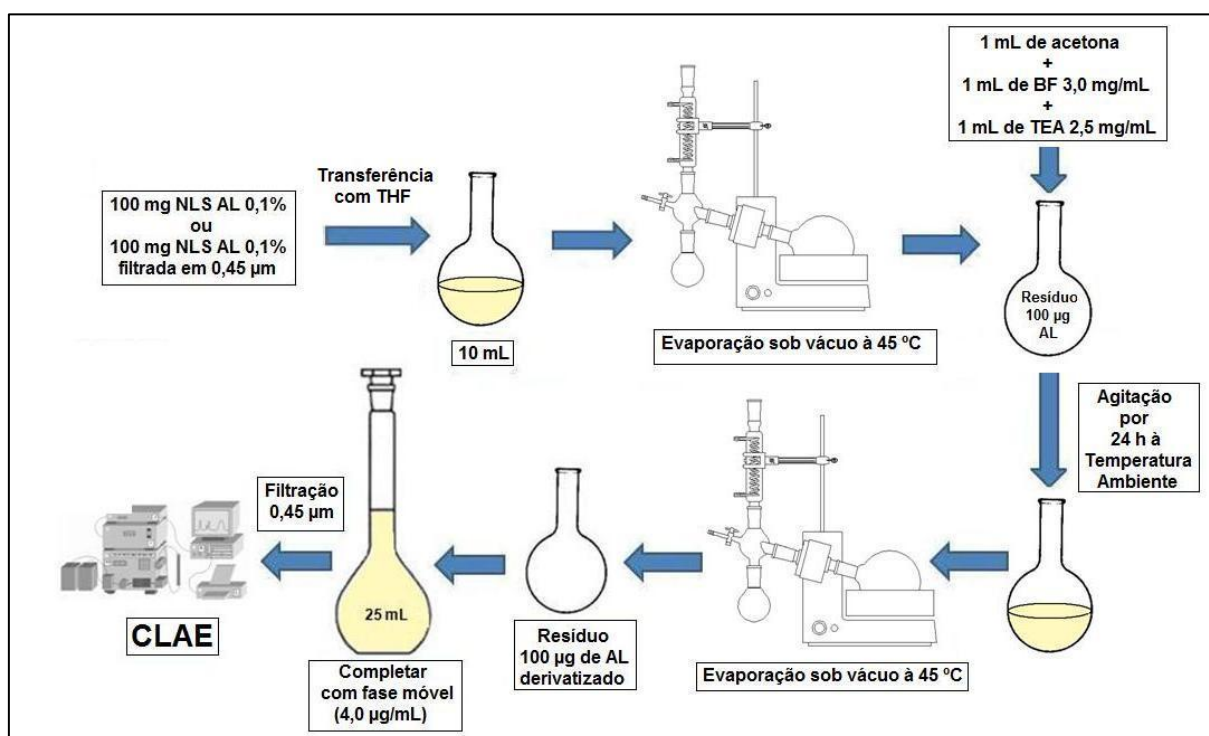
#### **4.2.4.5 Teor de encapsulação do AL**

O método de avaliação do teor de encapsulação (TE) do AL foi baseado na determinação da concentração de AL nas NLS antes (Concentração total) e após (Concentração no filtrado) filtração em unidade filtrante descartável composta de membrana Durapore PVDF não estéril com 0,45 µm de diâmetro de poro (Millex HV, JBR610222, Millipore, EUA). A filtração promove remoção dos cristais de AL não encapsulados. A concentração de AL na fase aquosa é desprezível, em virtude de sua baixa solubilidade em água.

Para análise do teor de AL antes da filtração (AL Total) foram pesados 100 mg da dispersão de NLS AL 0,1%, solubilizados em 10 mL de THF e, logo em seguida, foi realizada evaporação do THF em rotavapor (modelo R-215, Büchi,

Suíça) utilizando bomba de vácuo (modelo V-700, Büchi, Suíça) e banho de aquecimento (modelo B-491, Büchi, Suíça) a 45 °C.

Em seguida, ao resíduo presente no balão (100 µg de AL) foram adicionados 1,0 mL de acetona, 1,0 mL de solução de brometo de fenacila (3,0 mg/mL) em acetona e 1,0 mL de solução de trietilamina (2,5 mg/mL) em acetona. Esta mistura foi deixada em agitação por 24 h à temperatura ambiente. Após o período de reação, a acetona foi evaporada em rotavapor (modelo R-215, Büchi, Suíça) utilizando bomba de vácuo (modelo V-700, Büchi, Suíça) e banho de aquecimento (modelo B-491, Büchi, Suíça) a 45 °C. O resíduo (100 µg de AL derivatizado) foi transferido para um balão volumétrico de 25 mL e completou-se o volume com a fase móvel (Concentração: 4,0 µg/mL de AL derivatizado). A solução resultante manteve o produto da reação solúvel, mas propiciou a precipitação do lípide. Essa dispersão foi filtrada através de unidade filtrante descartável composta de membrana Durapore PVDF não estéril com 0,45 µm de diâmetro de poro (Millex HV, JBR610222, Millipore, EUA) e analisada por CLAE (**Figura 18**).



**Figura 18** - Representação esquemática da metodologia para determinação da concentração total e encapsulado do ácido láurico (AL) nas nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

Para análise do AL após a filtração (AL encapsulado) foi realizada filtração da dispersão de NLS em unidade filtrante descartável composta de membrana Durapore PVDF não estéril com 0,45 µm de diâmetro de poro (Millex HV, JBR610222, Millipore, EUA). Em seguida, 100 mg da dispersão filtrada foram pesados em um béquer e o restante do procedimento realizado foi o mesmo descrito para avaliação do AL antes da filtração (AL Total), conforme mostrado na Figura 20.

O teor de encapsulação foi calculado pela fórmula:

$$\text{TE (\%)} = (\text{AL do filtrado} / \text{AL teor total}) \times 100$$

#### **4.2.4.6 Calorimetria exploratória diferencial**

Com as medidas de DSC, podemos obter informações sobre polimorfismo, interações entre o fármaco e o lípide e indícios do tipo de estrutura cristalina presente, característica relacionada à capacidade de encapsulamento do fármaco (Jenning *et al.*, 2000a; Mehnert e Mäder 2001). Adicionalmente, a DSC é eficiente na identificação do *supercooled melt*, que corresponde à não solidificação do lípide sólido ao final do processo de produção, comprometendo o potencial de liberação controlada das NLS (Mehnert; Mäder, 2001).

As análises de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) foram realizadas utilizando o equipamento DSC50 (Shimadzu), de acordo com a norma ASTM D3418 que regulariza os procedimentos de análise por Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC). Para as medidas de DSC utilizou-se uma taxa de aquecimento de 10° C/minuto dentro de um intervalo de temperatura de 30 a 250° C, em atmosfera dinâmica de nitrogênio (fluxo de 50 mL/min).

As NLS foram liofilizadas por 24 h a -45° C (Liofilizador E-C Apparatus, EUA; Bomba Edwards E2M18, Inglaterra) após congelamento rápido em nitrogênio líquido. Finalizada a liofilização, as amostras (contendo aproximadamente 10 mg do lípide) foram pesadas diretamente em cadinhos de alumínio semierméticos para serem submetidas às análises. A calibração da temperatura e da entalpia do equipamento foi realizada com índio. As temperaturas de transição foram determinadas pela posição do pico máximo de temperatura utilizando o software do próprio equipamento. Os materiais puros (AR, AL, Compritol ATO 888, Brij 58®, colesterol e STE) foram submetidos à análise direta, sem liofilização.

#### **4.2.4.7 Difração de raios-X**

A difração de raios-X (2 Teta = 4° – 90°) foi realizada utilizando um Difratorômetro Philips (modelo PW1710), com radiação CuK $\alpha$  e cristal monocromador de grafita, com velocidade de varredura de 0,06°2 $\theta$ /s e tempo de contagem de 2s. As NLS foram liofilizadas (Liofilizador E-C Apparatus, EUA; Bomba Edwards E2M18, Inglaterra) por 24 h, a - 45° C, após congelamento rápido em nitrogênio líquido. Os materiais puros (AR, AL, Compritol ATO 888 e STE) foram submetidos à análise direta. Filmes finos de todas as amostras foram produzidos para a análise de difração de raios-X.

#### **4.2.5 Avaliação da atividade antibacteriana das NLS *in vitro***

A importância do *Propionibacterium acnes* (*P.acnes*) na etiopatogenia da acne e os benefícios que a terapia antimicrobiana oferece no seu tratamento já são reconhecidos. Contudo, o uso de antibióticos no tratamento da acne pode levar ao aumento de resistência pelo *P.acnes* e outros microorganismos presentes na pele, como o *Staphylococcus aureus* (Gollnick *et al*, 2003). Microorganismos como o *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*) e o *Staphylococcus epidermidis* (*S.epidermidis*) podem apresentar papel importante na complicação de lesões acneicas no que diz respeito à possibilidade de causarem infecções secundárias.

Recentemente a atividade antibacteriana *in vitro* do AL foi avaliada para o crescimento de *P.acnes*, *S.aureus* e *S.epidermidis*, havendo inibição do crescimento para as três bactérias, com destaque para o *P.acnes* (Nakatsuji *et al*, 2009). Neste sentido, foi proposta a avaliação da atividade antibacteriana das NLS contendo AR e AL no crescimento *in vitro* de *P.acnes*, *S.aureus* e *S.epidermidis*.

A metodologia proposta para avaliação da atividade antibacteriana teve como base os trabalhos de Oliveira *et al*. (1998) e Lima *et al*. (2002). Primeiramente, as bactérias foram localizadas no banco de dados do Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. Foram avaliadas seis bactérias, mostradas na tabela 8.

**Tabela 8: Bactérias utilizadas na avaliação das nanopartículas lipídicas sólidas (NLS).**

<b>Nome científico</b>	<b>Especificação</b>
<i>Propionibacterium acnes</i>	ATCC 14157
<i>Propionibacterium acnes</i>	Isolado clínico
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 29313
<i>Staphylococcus aureus</i>	Isolado clínico
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC 12228
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Isolado clínico

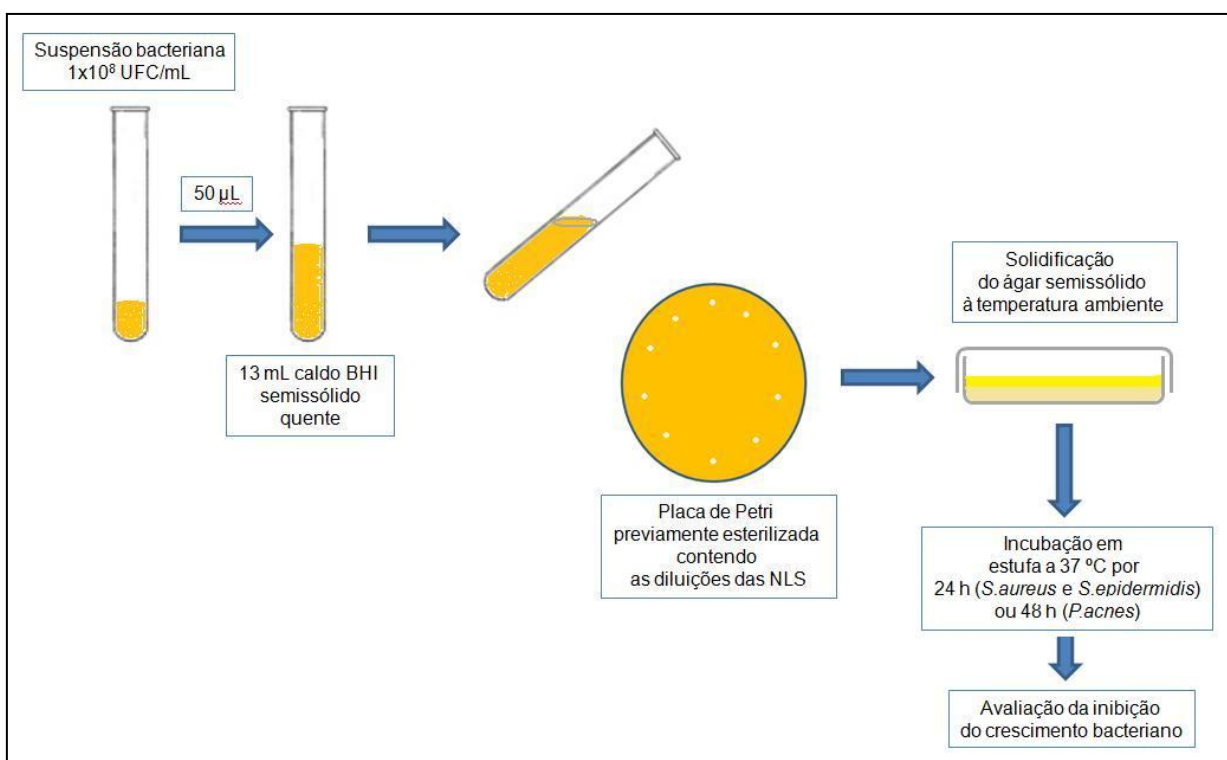
Após localização e descongelamento à temperatura ambiente, as bactérias foram semeadas em 2 mL de caldo BHI (*Brain Heart Infusion; Becton, Dickinson and Company; Le Point de Claix, França*) previamente esterilizado e colocadas para crescimento. *S. epidermidis* e *S. aureus* foram incubadas em estufa a 37° C por 24 h. *P. acnes* foi incubada em câmara de anaerobiose (Modelo 1025, Forma Scientific®) a 37° C por 48 h.

Foram preparadas diluições das NLS contendo AR e AL em solução de PBS pH 7,4 previamente esterilizada, de modo a obter as seguintes concentrações de AL: 10, 20, 50, 100, 200, 400, 600, 800 e 1000 µg/mL. A solução de PBS foi usada como controle negativo. A concentração de 1000 µg/mL refere-se à NLS sem diluição. Paralelamente, foi preparada uma solução de AL puro dissolvido em solução de NaOH 0,01 M nas mesmas concentrações citadas acima. Para NLS Branco (0 e 0,2% STE) toda a diluição foi efetuada da mesma maneira que para NLS AR+AL para manter uniformidade. O procedimento foi realizado em capela de fluxo laminar. Foram preparadas placas de Petri de 14 cm de diâmetro, contendo 50 mL de ágar BHI (*Brain Heart Infusion; Becton, Dickinson and Company; Le Point de Claix, França*) previamente esterilizado.

Após identificação, as placas foram abertas em capela de fluxo laminar e foram transferidos 10 µL de cada concentração diretamente ao ágar. As placas foram mantidas na capela até secagem das alíquotas e, a seguir, foi colocado 1 mL de clorofórmio no papel de filtro presente na tampa de cada placa. Deixou-se as placas fechadas por 30 minutos para formar atmosfera esterilizante de clorofórmio.

Após este tempo, as placas foram abertas e deixou-se por mais 30 minutos para evaporação do clorofórmio residual.

A seguir, para cada bactéria foi preparada uma suspensão contendo  $1 \times 10^8$  UFC (Unidades Formadoras de Colônia)/mL, com ajuste 0,5 pela Escala de McFarland. De cada suspensão, 50  $\mu$ L foram transferidos para 13 mL de caldo BHI semissólido previamente esterilizado. Após agitação, o ágar semissólido contendo as bactérias foi vertido sobre o ágar sólido que estava com as alíquotas de diluição, formando um filme sobre toda a superfície da placa. Após solidificação, as placas foram levadas para incubação, com *S. aureus* e *S. epidermidis* sendo incubadas por 24 h em estufa a 37° C e *P. acnes* incubada por 48 h em câmara de anaerobiose (Modelo 1025, Forma Scientific®) a 37° C (**Figura 19**). Os resultados foram avaliados com relação à presença ou ausência de crescimento bacteriano, avaliadas para cada concentração de AL e cada bactéria.



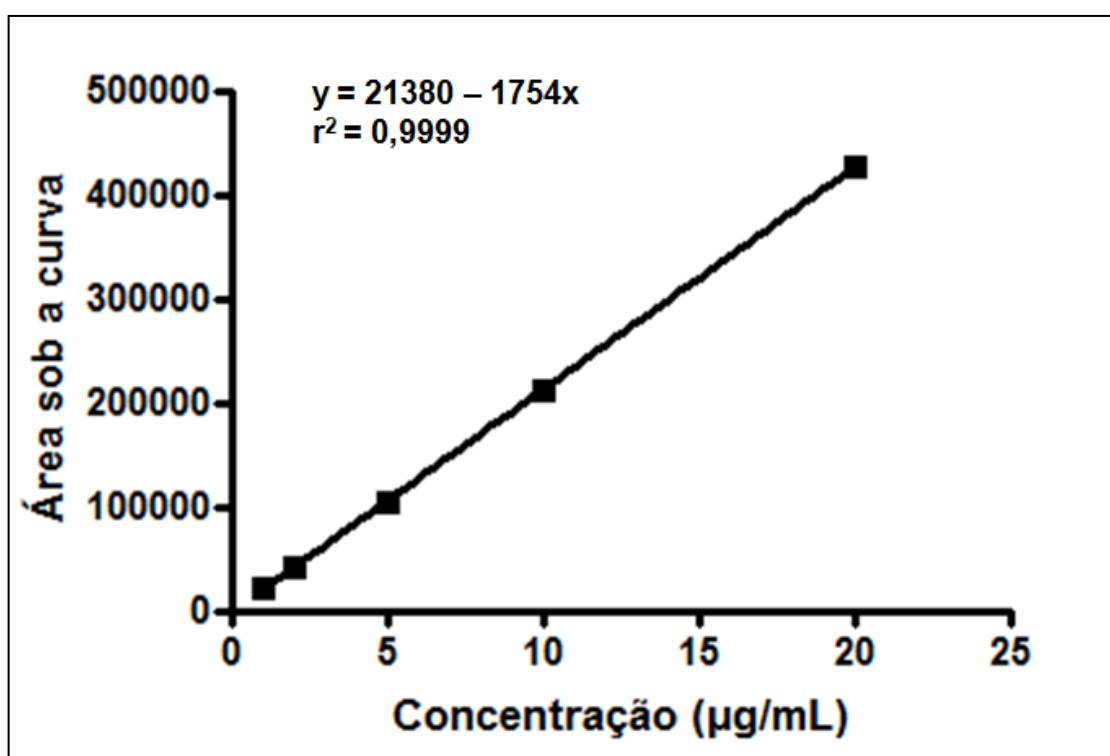
**Figura 19** - Representação esquemática da preparação das placas para avaliação da atividade antibacteriana *in vitro* das nanopartículas lipídicas sólidas (NLS).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Desenvolvimento e validação da metodologia de determinação da concentração do AL por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

#### 5.1.1 Linearidade do método analítico

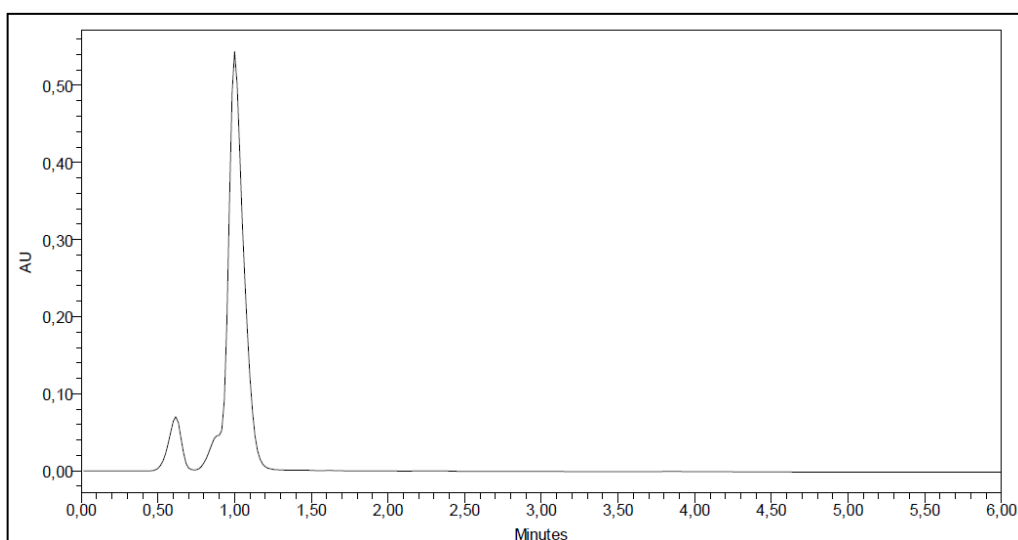
A curva construída para a avaliação da linearidade do método analítico apresentou coeficiente de correlação linear satisfatório ( $r = 0,9999$ , **Figura 22**) após análise de regressão linear dos cinco pontos analisados. Assim, o método analítico mostrou boa linearidade dentro da faixa de trabalho proposta. A equação da reta obtida da análise de regressão linear foi:  $y = 21380 - 1754x$ , e o tempo de retenção médio encontrado foi de 3,7 minutos (**Figura 20**).



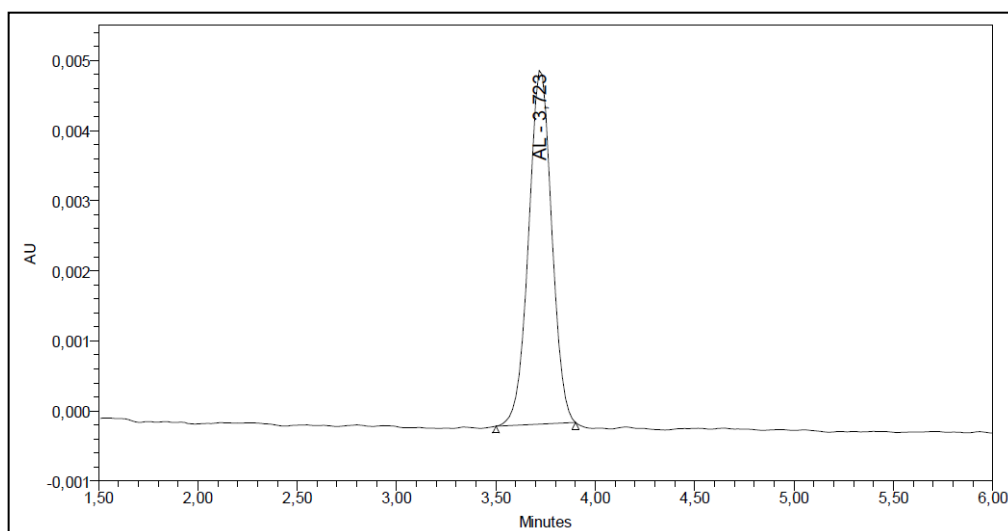
**Figura 20** - Curva analítica para avaliação da linearidade do método analítico de quantificação do ácido láurico (AL) por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

### **5.1.2 Seletividade do método analítico**

Após a injeção da amostra de NLS Branco submetida às mesmas condições de reação da solução de AL, obtem-se um cromatograma com picos localizados no tempo de retenção em torno de 1,5 minutos (**Figura 21A**). Considerando o tempo de retenção médio observado para o AL (3,7 minutos) (**Figura 21B**), verificamos que estes picos não interferem em sua análise e, desta forma, pode-se dizer que o método é seletivo para o AL.



**(A)**



**(B)**

**Figura 21 - Cromatogramas obtidos a partir da injeção das NLS Branco (A) e solução de AL (B).**

### **5.1.3 Precisão do método analítico**

As Tabelas 9 e 10 mostram os valores médios das absorvâncias para as concentrações de 2,0, 10 e 20 µg/mL e seus respectivos desvios-padrões determinados no mesmo dia e em dias diferentes. Como pode ser observado nas tabelas, o coeficiente de variação (CV) das amostras de cada concentração foi inferior a 5%, estando de acordo com o CV máximo aceitável 5% especificado pela RE 899 (Brasil, 2003).

**Tabela 9 - Resultados obtidos para a avaliação da repetibilidade do método de quantificação do ácido láurico (AL) por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).**

Concentração (µg/mL)	Média das áreas obtidas	Fator de resposta (Média)	CV (%)*
2,0	41261 ± 339	20630 ± 169	0,82
10	211405 ± 2278	21141 ± 228	1,1
20	426486 ± 1250	21324 ± 62	0,30

\*CV (coeficiente de variação) = (Desvio padrão/área média determinada) x 100).

**Tabela 10 - Resultados obtidos para a avaliação da precisão intermediária do método de quantificação do ácido láurico (AL) por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).**

Concentração (µg/mL)	Dia	Média das áreas obtidas	Fator de resposta (Média)	CV (%)*
2,0	1	41261 ± 339	20630 ± 169	0,82
	2	42352 ± 1019	21176 ± 509	2,4
10	1	211405 ± 2278	21141 ± 228	1,1
	2	209888 ± 335	20989 ± 34	0,16
20	1	426486 ± 1250	21324 ± 62	0,30
	2	436682 ± 458	21834 ± 23	0,11

\*CV (coeficiente de variação) = (Desvio padrão/área média determinada) x 100).

#### **5.1.4 Exatidão do método analítico**

A Tabela 11 mostra os resultados obtidos na avaliação da recuperação do AL a partir de amostras de NLS Branco contendo soluções de AL nas concentrações de 2,0, 10 e 20 µg/mL. Como pode ser observado na tabela, o valor médio da recuperação do AL foi superior a 90%, sendo considerada satisfatória para o método utilizado.

**Tabela 11 - Resultados obtidos para a avaliação da exatidão do método de quantificação do ácido láurico (AL) por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).**

Concentração teórica (µg/mL)	Concentração real média (µg/mL)	Recuperação (%)
2,0	1,85 ± 0,1	93
10	9,65 ± 0,2	97
20	18,7 ± 1	94
Média ± desvio padrão	-	95 ± 2

#### **5.1.5 Robustez do método analítico**

Com relação ao parâmetro robustez, o método analítico mostrou-se robusto, não sendo observadas diferenças nos cromatogramas quando dois diferentes fabricantes foram utilizados para o THF [Synth (São Paulo) e Merck (Alemanha)] e diferentes proporções de acetonitrila foram utilizadas na preparação da fase móvel.

#### **5.2 Caracterização das NLS**

A Tabela 12 mostra os resultados da caracterização das NLS contendo AR com relação ao diâmetro das partículas, potencial zeta e teor de encapsulação. Como pode ser observado na tabela, a adição da STE levou a um aumento significativo do teor de encapsulação do AR (99,8 ± 6%) em relação à NLS sem amina (57 ± 10%). Esses dados estão em concordância com o trabalho de Castro *et al.* (2007) que mostrou a importância da STE, uma amina lipofílica, na formação de

um par iônico com o AR, aumentando seu caráter lipofílico e, desta forma, tem também aumentando sua afinidade pela matriz lipídica das NLS. Com relação ao diâmetro das partículas, estes se apresentam na escala nanométrica, sendo que a adição da STE causou diminuição tanto no tamanho quanto no Índice de Polidispersividade (IP).

A medida do potencial zeta permite prever a estabilidade da dispersão durante a estocagem. Para que a repulsão eletrostática seja suficiente para manter uma partícula afastada da outra, evitando a aproximação/fusão, é necessário que o potencial zeta seja pelo menos 25 mV (negativo ou positivo) (The Zeta Potential, 1999). Verifica-se que a presença da amina leva à uma elevação do valor do potencial zeta, tornando-o positivo. Isto poderia ser explicado pela presença de moléculas ionizadas de STE presentes na interface da nanopartícula e que não se encontram envolvidas na formação do par iônico com o AR.

**Tabela 12 – Caracterização das NLS contendo AR quanto ao diâmetro das partículas, potencial zeta e teor de encapsulação.**

Parâmetros	Formulação (n=3)	
	NLS AR 0,05%	
	0% STE	0,2% STE
Diâmetro (nm)	227 ± 24	147 ± 35
IP	0,55 ± 0,06	0,37 ± 0,05
Potencial Zeta (mV)	-17 ± 1	43 ± 2
Teor de Encapsulação (%)	57 ± 10	99,8 ± 6

A Tabela 13 mostra os resultados da caracterização das NLS contendo AL com relação ao diâmetro das partículas, potencial zeta e teor de encapsulação. Com relação ao diâmetro das partículas, verifica-se que a adição de STE não determinou alteração significativa e todas se encontram dentro da escala nanométrica.

A PCS fornece o diâmetro médio das partículas e o índice de polidispersividade (IP), como uma medida da extensão da distribuição do diâmetro das partículas. Valores de IP inferiores a 0,1 indicam sistemas considerados monodispersos e valores superiores a 0,7 indicam a obtenção de preparações com

partículas de diâmetro heterogêneo, portanto, polidispersos (Malvern Instruments, 2000; Souto *et al.*, 2004).

Verifica-se que o IP encontra-se com valores próximos à 0,5 para os três níveis de STE utilizados. Embora a preparação não esteja monodispersa, este valor de IP é considerado satisfatório para o contexto da aplicação tópica. Para as NLS AL também observa-se que a adição da amina causa elevação no valor do potencial zeta de maneira diretamente proporcional. Um fato interessante é que a adição de 0,2% de STE não determinou aumento de mesma magnitude daquele observado nas NLS AR. Isto poderia sugerir que a dinâmica de interação da STE numa NLS contendo AL se processa de forma diferente das NLS AR.

De maneira inesperada, o teor de encapsulação do AL mostrou-se elevado para os três níveis de STE avaliados, sendo  $98 \pm 3$ ,  $97 \pm 2$  e  $95 \pm 4$ , respectivamente, para 0, 0,2 e 0,4% de STE. Estes resultados indicam que a adição de STE não parece apresentar papel significativo para a encapsulação do AL nas NLS. Uma possível justificativa para este fato seria a própria natureza química da molécula de ácido láurico (**Figura 7**). Este, por ser um ácido graxo, estruturalmente já apresentaria lipofilicidade característica, não necessitando da eventual formação de um par iônico para interagir bem com a matriz lipídica das NLS.

**Tabela 13 – Caracterização das NLS contendo AL quanto ao diâmetro das partículas, potencial zeta e teor de encapsulação.**

Parâmetros	Formulação (n=3)		
	NLS AL 0,1%		
	0% STE	0,2% STE	0,4% STE
Diâmetro (nm)	$157 \pm 4$	$147 \pm 22$	$146 \pm 10$
IP	$0,48 \pm 0,02$	$0,42 \pm 0,07$	$0,46 \pm 0,06$
Potencial Zeta (mV)	$-11 \pm 1,3$	$21 \pm 9$	$41 \pm 3$
Teor de Encapsulação (%)	$98 \pm 3$	$97 \pm 2$	$95 \pm 4$

A Tabela 14 mostra os resultados da caracterização das NLS contendo AR e AL com relação ao diâmetro das partículas e ao potencial zeta. Com relação às NLS contendo AR e AL, nota-se que a adição da STE não representou alteração significativa para o diâmetro das partículas, sendo que o IP também foi considerado satisfatório para as três formulações avaliadas. Observa-se novamente aqui, assim como para as NLS contendo AL (**Tabela 13**), que a adição de STE causa elevação proporcional nos valores do potencial zeta. Quanto ao papel do potencial zeta, sabe-se que valores próximos de zero estão ligados à uma maior agregação das partículas, com prejuízo para a estabilidade do sistema (Mehnert; Mäder, 2001). Neste sentido, a formulação contendo 0,4% de STE é a que melhor atenderia a este quesito.

**Tabela 14 – Caracterização das NLS contendo AR e AL quanto ao diâmetro das partículas e ao potencial zeta.**

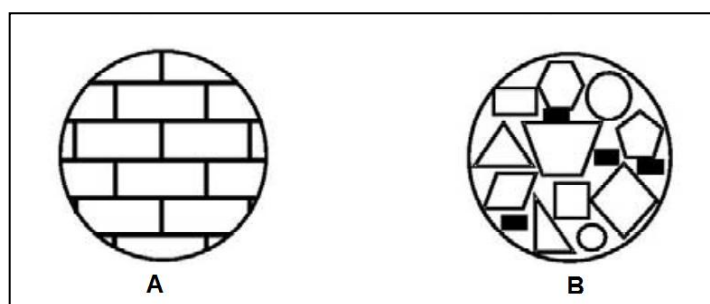
Parâmetros	Formulação (n=3)		
	NLS AR (0,05%) + AL (0,1%)		
	0% STE	0,2% STE	0,4% STE
Diâmetro (nm)	148 ± 0,25	150 ± 1	157 ± 7
IP	0,41 ± 0,01	0,38 ± 0,01	0,45 ± 0,02
Potencial Zeta (mV)	-25 ± 2	11 ± 4	41 ± 1

Os resultados da análise do teor de encapsulação do AR e do AL encontram-se representados na Figura 23. Os teores de encapsulação do AR para as NLS AR+AL contendo 0, 0,2 e 0,4% de STE foram, respectivamente, 100 ± 7%, 94 ± 7% e 98 ± 7%, após a preparação e 46 ± 6%, 106 ± 5% e 100 ± 4%, 15 dias depois. Como é possível observar na Figura 23, o teor de encapsulação do AR após a preparação é elevado para as três formulações avaliadas. Apesar disso, na análise realizada 15 dias depois da preparação, é claramente notada a diminuição significativa do teor de encapsulação do AR para a formulação contendo 0% de STE. Em contrapartida, nas formulações contendo 0,2 e 0,4% de STE os valores se mantem elevados.

Nota-se aqui, assim como mostrado na Tabela 12 e ainda considerando os resultados do trabalho de Castro *et al.* (2007), a importância da STE no aumento e

manutenção de elevado teor de encapsulação do AR. Um fato inesperado foi o elevado valor do teor de encapsulação do AR para a formulação com 0% de STE após a preparação. Este valor ( $100 \pm 7\%$ ) é consideravelmente maior que aquele observado na formulação de NLS AR com 0% de STE ( $57 \pm 10\%$ ).

A natureza química dos lípides usados também é importante no que diz respeito à rede cristalina que eles podem formar. Redes muito bem organizadas levam à expulsão do fármaco da matriz. Lípides mais complexos, como misturas de mono, di e triglicerídeos e também contendo ácidos graxos com cadeias de diferentes comprimentos, formam redes cristalinas com mais imperfeições, oferecendo mais espaço para acomodar o fármaco (**Figura 22**) (Müller *et al.*, 2000).

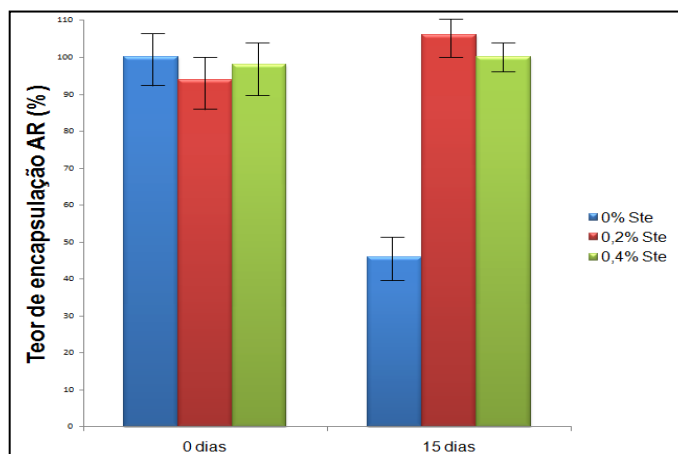


**Figura 22** - Representação da estrutura cristalina das NLS de composição lipídica homogênea (A) e NLS na qual foi usada uma mistura complexa de lípides (B), fornecendo mais espaços para acomodar o fármaco. Adaptado de Müller *et al.* (2002).

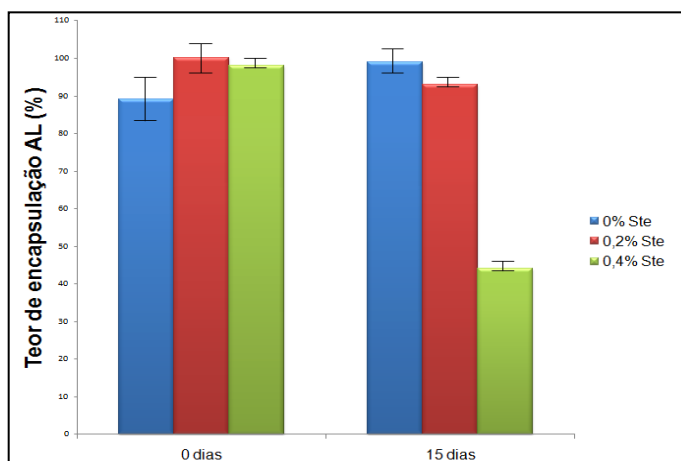
A hipótese aqui sugerida para este aumento no teor de encapsulação é que na formulação de NLS AR+AL com 0% STE, o AL poderia, de alguma forma, estar interagindo com a matriz lipídica das NLS de modo a aumentar o número de imperfeições na rede cristalina. Este maior número de imperfeições resultaria numa maior capacidade da matriz em acomodar as moléculas do AR, resultando assim em maior teor encapsulado.

No entanto, ainda observando a Figura 23, nota-se que o teor de encapsulação do AR nas NLS AR+AL com 0% STE, diminuiu para valores em torno de 46%, apenas 15 dias depois da preparação. Esta informação mostra que, apesar de num momento inicial, a presença do AL, por si só, proporcionar aumento no teor de encapsulação do AR, este não se mantém elevado sem a presença da STE. Colabora com esta informação a manutenção dos elevados valores de teor de

encapsulação do AR nas formulações com 0,2 e 0,4% de STE, 15 dias depois da preparação.



(AR)



(AL)

**Figura 23 – Representação gráfica dos teores de encapsulação do AR e do AL nas NLS AR+AL contendo 0, 0,2 e 0,4% de STE avaliados após a preparação e 15 dias depois .**

Os teores de encapsulação do AL para as NLS AR+AL contendo 0, 0,2 e 0,4% de STE foram, respectivamente,  $89 \pm 6\%$ ,  $100 \pm 4\%$  e  $98 \pm 1\%$ , após a preparação e  $99 \pm 3\%$ ,  $93 \pm 1\%$  e  $44 \pm 1\%$ , 15 dias depois. Da mesma maneira observada para o AR, o teor de encapsulação do AL após a preparação é elevado para as três formulações avaliadas (**Figura 23**). Porém, na análise realizada 15 dias depois da preparação, é notada a diminuição significativa do teor de encapsulação do AL para a formulação contendo 0,4% de STE, enquanto nas formulações contendo 0 e 0,2% de STE os valores se mantêm elevados.

Assim como para as NLS AL, sugere-se aqui que este elevado teor de encapsulação do AL para as NLS AR+AL com 0% STE tanto após a preparação quanto 15 dias depois, estaria ligado ao fato de que o AL seria capaz de interagir bem com os lípides da matriz das NLS. Esta melhor interação tornaria desnecessário ou pouco importante o uso da STE com o intuito de aumentar o teor de encapsulação do AL.

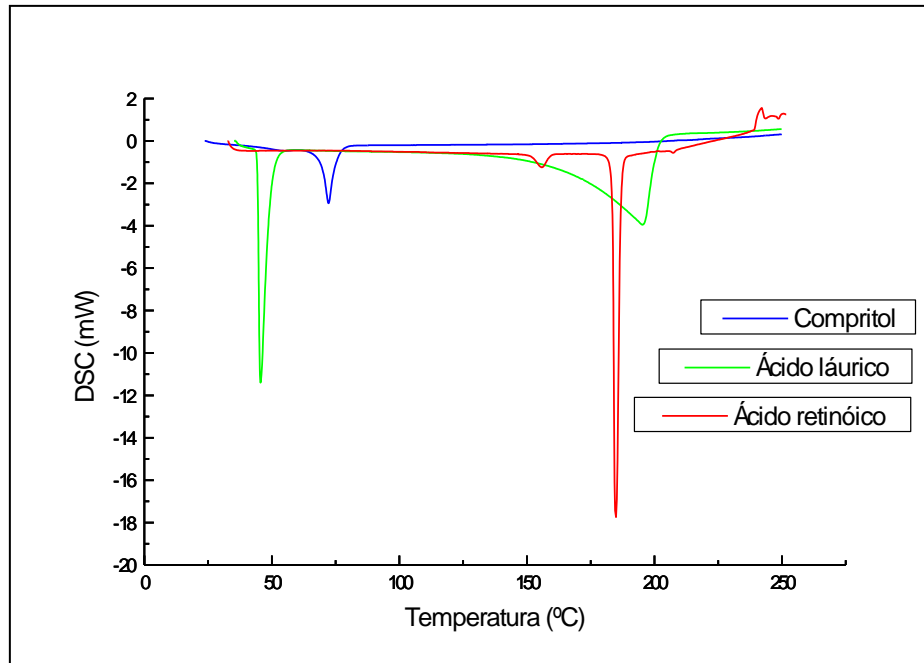
Um fato inesperado foi a diminuição significativa do teor de encapsulação do AL na formulação contendo 0,4% de STE, 15 depois da preparação. Este valor diminuiu de  $99 \pm 3\%$  para  $44 \pm 1\%$  e pode ser observado na Figura 23. A hipótese proposta é que em níveis mais elevados como 0,4%, a STE poderia competir com o AL na localização dentro da matriz lipídica, uma vez que a STE é uma amina de caráter lipofílico. Sua maior concentração poderia levar à uma expulsão do AL a partir da rede cristalina das NLS, justificando a diminuição de seu teor de encapsulação num curto período de tempo. Este fato não ocorre na formulação contendo 0,2% de STE porque a concentração de STE, neste caso, não seria suficiente para exercer um efeito significativo na expulsão do AL da matriz lipídica.

Cabe ressaltar que a formulação de NLS AR+AL contendo 0,2% de STE apresentou elevados valores de teor de encapsulação para ambos os ácidos. Além disso, foi capaz de manter estes teores elevados 15 depois da preparação. Frente à essas informações esta formulação foi considerada de escolha para posteriores avaliações biológicas.

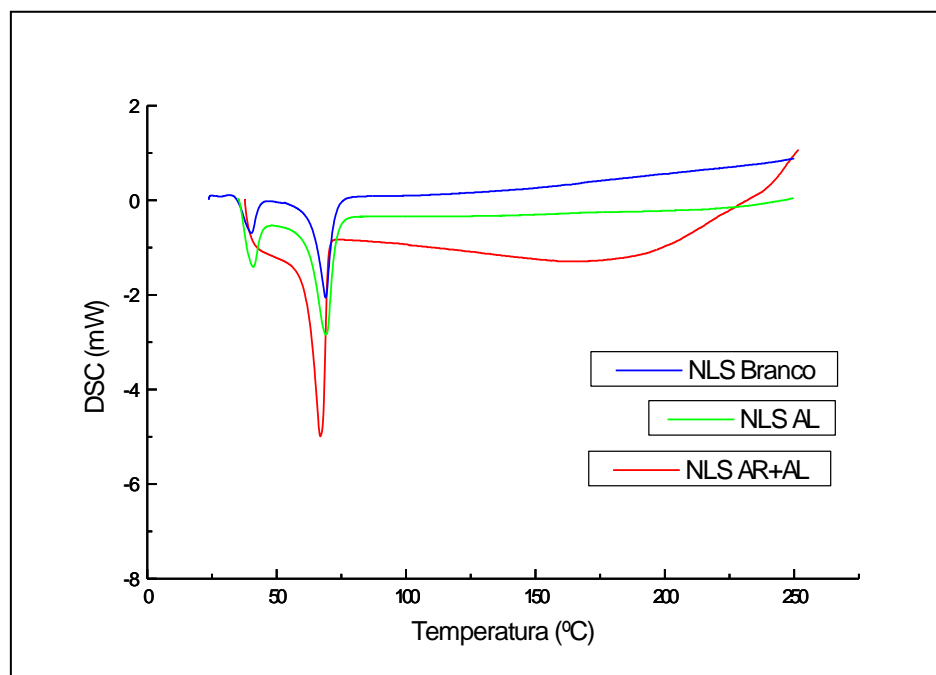
### **5.2.1 Calorimetria Exploratória Diferencial**

A Figura 24 mostra as curvas de DSC dos principais componentes das NLS (Compritol ATO 888, AR e AL) e das NLS AL e NLS AR+AL.

Na Figura 24A é possível visualizar o aspecto dos picos de fusão endotérmicos do lípide (Compritol ATO 888), do AR e do AL, que apresentaram os respectivos pontos de fusão:  $72,1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ;  $184,9^{\circ}\text{C}$  e  $45,5^{\circ}\text{C}$ . Na Figura 24B é possível observar as curvas de DSC para as NLS Branco, NLS AL e NLS AR+AL.



(A)



(B)

**Figura 24 –** Curvas de DSC dos principais componentes das nanopartículas lipídicas sólidas [(Compritol ATO 888, Ácido retinóico (AR) e Ácido láurico (AL)] (Curva A) e das NLS AL e NLS AR+AL (Curva B).

Quando se avalia a presença dos picos de fusão dos principais componentes nas curvas das formulações (**Figura 24B**), nota-se que os picos de fusão do AR e do AL estão ausentes. Isto sugere que estes componentes encontram-se integrados ao

lípidos da matriz. Ainda considerando a Figura 24B, observa-se que na curva das NLS Branco e NLS AL ocorre diminuição na temperatura de fusão do lípido (de 72,1 °C para 69 °C), representada pelo deslocamento do pico de fusão. Além disso, nota-se também o alargamento do pico em relação ao pico observado na curva das NLS Branco.

Estas informações fornecem uma importante evidência para a hipótese de que a presença do AL seria capaz de proporcionar um maior número de imperfeições na matriz lipídica. Estas imperfeições estariam ligadas com o maior teor de encapsulação do AR observado para as NLS AR+AL com 0% STE após a preparação. Na curva da NLS AR+AL, o ponto de fusão do lípido encontra-se em temperatura ainda menor (67 °C) e o pico mais largo em comparação às formulações anteriores.

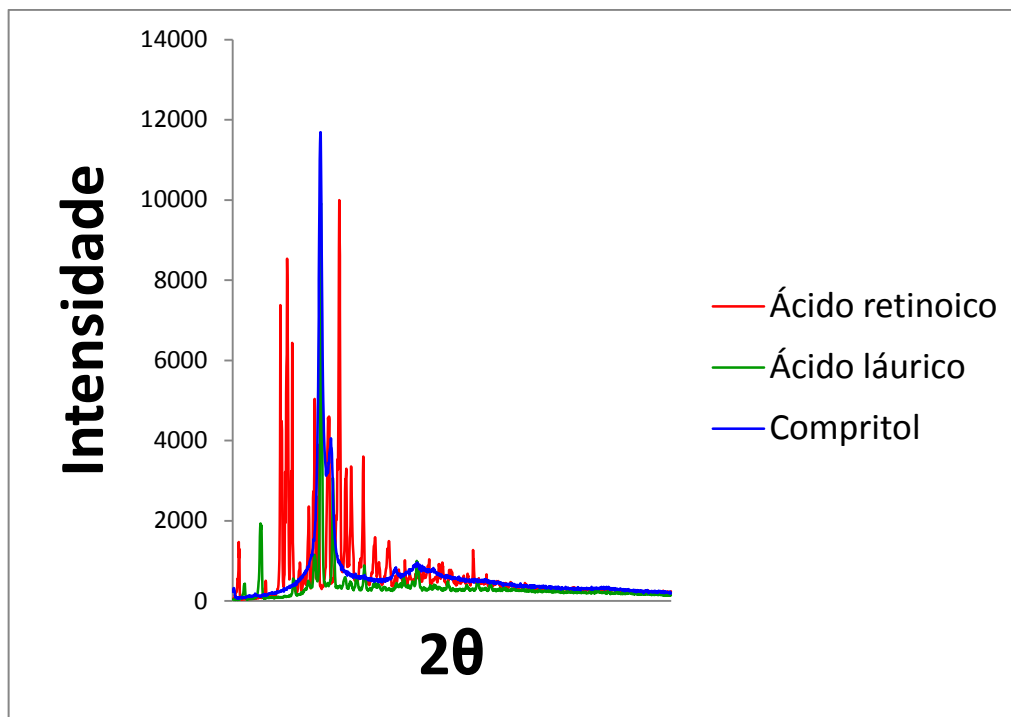
Este fato sugere uma desestruturação mais acentuada da matriz lipídica devido a presença do AR e do AL na formulação. Em conjunto estas informações mostram que a incorporação do AR e do AL ocorrem de maneira efetiva na matriz das NLS, mesmo sem a presença da STE. Além disso, nota-se que a adição do AL sozinho já seria capaz de causar desestruturação da matriz lipídica, influenciando o teor de encapsulação do AR na formulação sem amina.

Contudo, ainda que a DSC seja capaz de monitorar e quantificar eventos térmicos ocorridos em uma amostra, ela não revela diretamente as causas deste evento. Para isto, é necessário que as análises por DSC sejam acompanhadas de métodos complementares, como observações microscópicas, espectroscopia e difração de raios X (Bunjes; Unruh, 2007).

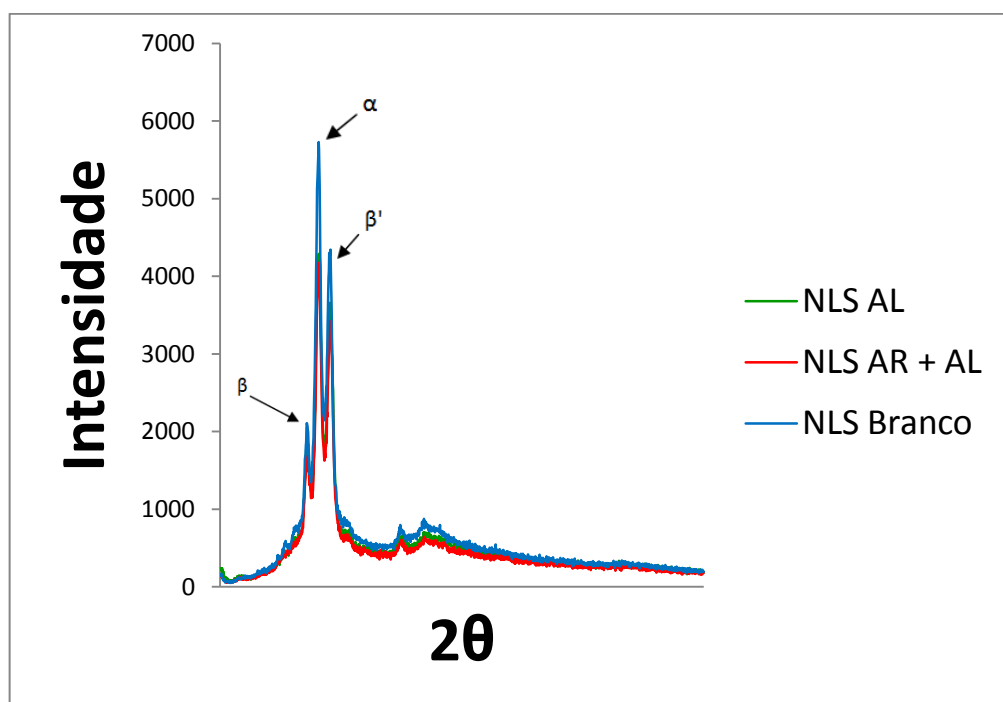
### **5.2.2 Difração de raios-X**

Os experimentos de difração foram realizados visando uma melhor compreensão das interações entre os componentes das formulações. A Figura 25 mostra os dados obtidos por difração de raios-X para os principais componentes das NLS (Compritol ATO 888, AR e AL) e para as NLS AL e NLS AR+AL na ausência de STE.

Na figura 25A é possível observar os picos de difração de raios-X característicos dos principais componentes das NLS (Compritol ATO 888, AR e AL).



(A)



(B)

**Figura 25** – Difratogramas dos principais componentes das nanopartículas lipídicas sólidas [(Compritol ATO 888, Ácido retinóico (AR) e Ácido láurico (AL)] (Difratograma A) e das NLS AL e NLS AR+AL (Difratograma B).

Verifica-se que, excetuando-se o Compritol ATO 888 (lípide constituinte da matriz das NLS), nenhum pico é observado para o AR e para o AL quando se

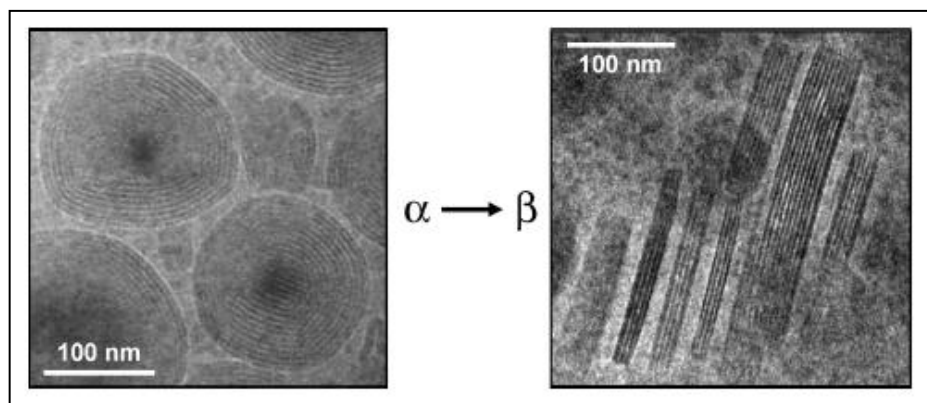
analisam as formulações de NLS AL e NLS AR+AL (**Figura 25B**). Isto é um indicativo de que estes dois componentes encontram-se integrados à matriz lipídica das NLS.

Na figura 25B observa-se também que ocorre diminuição da intensidade dos picos de difração do lípide constituinte da matriz das NLS (Compritol ATO 888) quando são analisadas as formulações de NLS.

No que diz respeito aos picos de difração do lípide na NLS AL, tem-se um indicativo de que a presença do AL nas NLS causaria desestruturação da matriz lipídica, fato este que se reflete na diminuição da intensidade dos picos de difração do lípide. Associando esta informação aos dados obtidos pelas análises de DSC, tem-se mais uma importante evidência para a hipótese proposta de que o AL seria capaz de desestruturar a matriz das NLS. Esta desestruturação estaria ligada ao maior teor de encapsulação do AR com a presença apenas do AL. Para a NLS AR+AL, a diminuição dos picos de difração do lípide também é verificada, sendo ligeiramente inferior e bastante próxima àquela observada para NLS AL. Pode-se dizer que esta diminuição dos picos de difração na presença do AR e do AL estaria ligada à uma desestruturação da matriz lipídica causada por estes componentes.

As análises por difração de raios-X também são úteis na determinação dos parâmetros subcelulares e das formas polimórficas dos glicerídeos da matriz. Com relação à rede lipídica presente nas NLS, as formas polimórficas  $\alpha$ ,  $\beta'$  e  $\beta$  são as principais (**Figura 26**). A estabilidade termodinâmica e a densidade do empacotamento lipídico aumentam, e a taxa de incorporação do fármaco diminui, na seguinte ordem: *supercooled melt* < modificação  $\alpha$  < modificação  $\beta'$  < modificação  $\beta$  (Müller *et al.*, 2000). Por conseguinte, as formas polimórficas e os arranjos da rede cristalina da matriz lipídica das NLS podem ser avaliados pela difração de raios-X (Jenning *et al.*, 2000a).

Na Figura 25B, todos os difratogramas (NLS Branco, NLS AL e NLS AR+AL) apresentaram picos característicos das formas polimórficas  $\alpha$  e  $\beta'$ , conforme indicado. Além disso, um terceiro pico pequeno é indicado mostrando também a formação parcial da forma  $\beta$ . Estas observações estão de acordo com o trabalho de Castro *et al.* (2008), onde também é mostrado que cada um destes picos relaciona-se com distâncias interplanares que são características de cada forma polimórfica.



**Figura 26 - Formas  $\alpha$  e  $\beta$  dos lípides presentes na matriz das NLS vistas em microscopia eletrônica de transmissão. Adaptado de Bunjes *et al.* (2007).**

Em conjunto, estas informações associadas àquelas provenientes das análises de DSC mostram que a incorporação do AR e do AL ocorreu de maneira eficiente. Adicionalmente, verifica-se que a presença do AL é capaz de proporcionar um nível de desestruturação da matriz lipídica das NLS que permitiria à esta acomodar melhor o AR, com o conseqüente aumento de seu teor de encapsulação. Mas cabe ressaltar mais uma vez que este aumento não se mostrou estável. Considerando os três níveis de STE avaliados nas NLS AR+AL e o comportamento destas quanto ao teor de encapsulação para ambos os ácidos, a formulação contendo 0,2% de STE foi escolhida para posteriores avaliações biológicas.

### **5.2.3 Avaliação da atividade antibacteriana das NLS *in vitro***

As Tabelas 15 e 16 mostram os resultados da avaliação da atividade da solução de AL, das NLS Branco (0 e 0,2% STE) e das NLS AR+AL (0,2% STE) sobre o crescimento de *P.acnes* ATCC 14157 e um isolado clínico da mesma espécie, respectivamente.

**Tabela 15 – Avaliação da atividade antibacteriana da solução de AL, NLS Branco (0 e 0,2% STE) e NLS AR+AL (0,2% STE) sobre o crescimento de *P.acnes* ATCC 14157 *in vitro*.**

Concentração (µg/mL)	Inibição do crescimento*			
	Solução AL	NLS Branco 0% STE	NLS Branco 0,2% STE	NLS AR+AL 0,2% STE
0	-	-	-	-
10	-	-	-	-
20	-	-	-	-
50	-	-	-	-
100	-	-	-	-
200	-	-	+	+
400	-	-	+	+
600	-	-	+	+
800	-	-	+	+
1000	-	-	+	+

\*(-) Ausência de inibição, (+) Presença de inibição com halo límpido.

**Tabela 16 – Avaliação da atividade antibacteriana da solução de AL, NLS Branco (0 e 0,2% STE) e NLS AR+AL (0,2% STE) sobre o crescimento de *P.acnes* isolado de espécime clínico *in vitro*.**

Concentração (µg/mL)	Inibição do crescimento*			
	Solução AL	NLS Branco 0% STE	NLS Branco 0,2% STE	NLS AR+AL 0,2% STE
0	-	-	-	-
10	-	-	-	-
20	-	-	-	-
50	-	-	+	+
100	-	-	+	+
200	-	-	+	+
400	-	-	+	+
600	-	-	+	+
800	-	-	+	+
1000	-	-	+	+

\*(-) Ausência de inibição, (+) Presença de inibição com halo límpido.

As Tabelas 17 e 18 mostram os resultados da avaliação da atividade da solução de AL, das NLS Branco (0 e 0,2% STE) e das NLS AR+AL (0,2% STE) sobre o crescimento de *S.aureus* ATCC 29313 e um isolado clínico da mesma espécie, respectivamente.

**Tabela 17 – Avaliação da atividade antibacteriana da solução de AL, NLS Branco (0 e 0,2% STE) e NLS AR+AL (0,2% STE) sobre o crescimento de *S.aureus* ATCC 29313 *in vitro*.**

Concentração (µg/mL)	Inibição do crescimento*			
	Solução AL	NLS Branco 0% STE	NLS Branco 0,2% STE	NLS AR+AL 0,2% STE
0	-	-	-	-
10	-	-	-	-
20	-	-	-	-
50	-	-	-	-
100	-	-	-	-
200	-	-	+	+
400	-	-	+	+
600	-	-	+	+
800	-	-	+	+
1000	-	-	+	+

\*(-) Ausência de inibição, (+) Presença de inibição com halo límpido.

**Tabela 18 – Avaliação da atividade antibacteriana da solução de AL, NLS Branco (0 e 0,2% STE) e NLS AR+AL (0,2% STE) sobre o crescimento de *S.aureus* isolado de espécime clínico *in vitro*.**

Concentração (µg/mL)	Inibição do crescimento*			
	Solução AL	NLS Branco 0% STE	NLS Branco 0,2% STE	NLS AR+AL 0,2% STE
0	-	-	-	-
10	-	-	-	-
20	-	-	-	-
50	-	-	-	-
100	-	-	-	-
200	-	-	-	+
400	-	-	-	+
600	-	-	-	+
800	-	-	-	+
1000	-	-	-	+

\*(-) Ausência de inibição, (+) Presença de inibição com halo límpido.

As Tabelas 19 e 20 mostram os resultados da avaliação da atividade da solução de AL, das NLS Branco (0 e 0,2% STE) e das NLS AR+AL (0,2% STE) sobre o crescimento de *S.epidermidis* ATCC 12228 e um isolado clínico da mesma espécie, respectivamente.

**Tabela 19 – Avaliação da atividade antibacteriana da solução de AL, NLS Branco (0 e 0,2% STE) e NLS AR+AL (0,2% STE) sobre o crescimento de *S.epidermidis* ATCC 12228 *in vitro*.**

Concentração (µg/mL)	Inibição do crescimento*			
	Solução AL	NLS Branco 0% STE	NLS Branco 0,2% STE	NLS AR+AL 0,2% STE
0	-	-	-	-
10	-	-	-	-
20	-	-	-	-
50	-	-	-	+
100	-	-	-	+
200	-	-	+	+
400	-	-	+	+
600	-	-	+	+
800	-	-	+	+
1000	-	-	+	+

\*(-) Ausência de inibição, (+) Presença de inibição com halo límpido.

**Tabela 20 – Avaliação da atividade antibacteriana da solução de AL, NLS Branco (0 e 0,2% STE) e NLS AR+AL (0,2% STE) sobre o crescimento de *S.epidermidis* isolado de espécime clínico *in vitro*.**

Concentração (µg/mL)	Inibição do crescimento*			
	Solução AL	NLS Branco 0% STE	NLS Branco 0,2% STE	NLS AR+AL 0,2% STE
0	-	-	-	-
10	-	-	-	-
20	-	-	-	-
50	-	-	-	-
100	-	-	+	+
200	-	-	+	+
400	-	-	+	+
600	-	-	+	+
800	-	-	+	+
1000	-	-	+	+

\*(-) Ausência de inibição, (+) Presença de inibição com halo límpido.

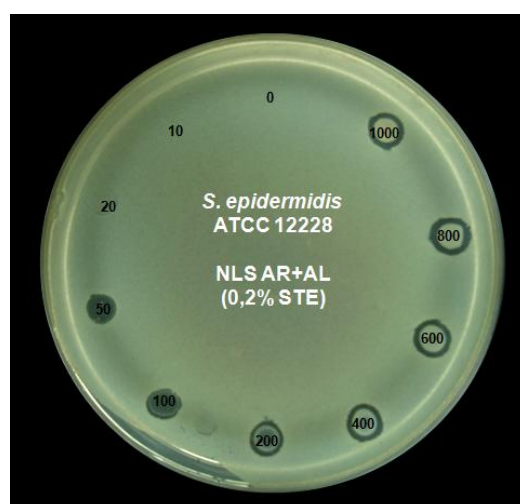
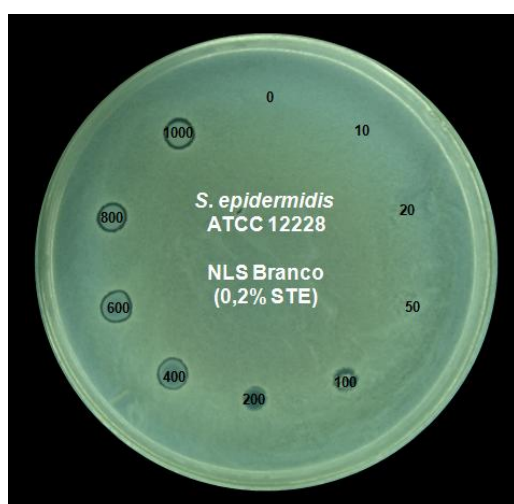
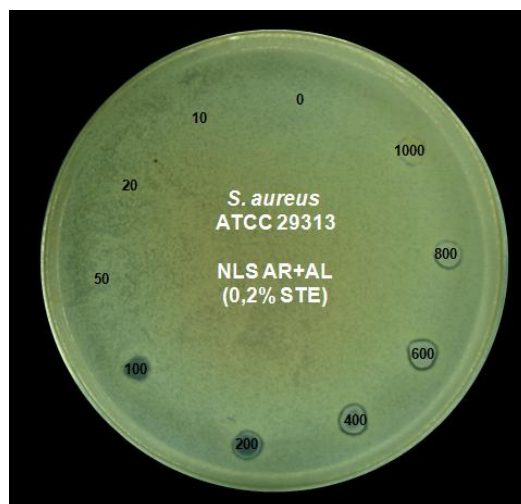
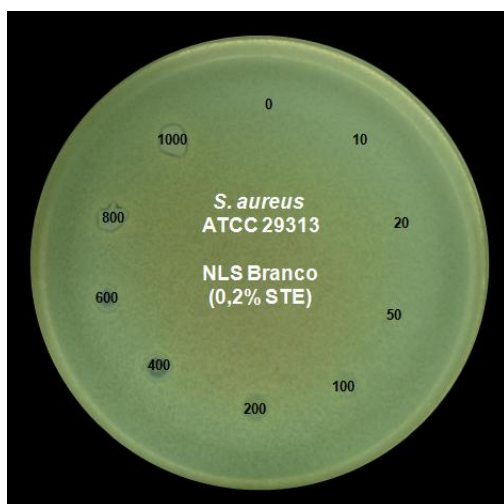
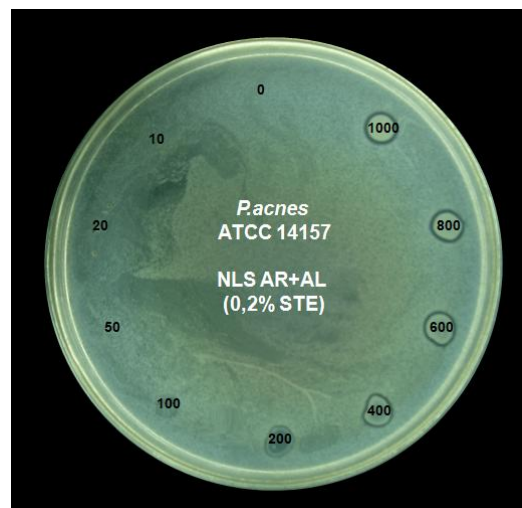
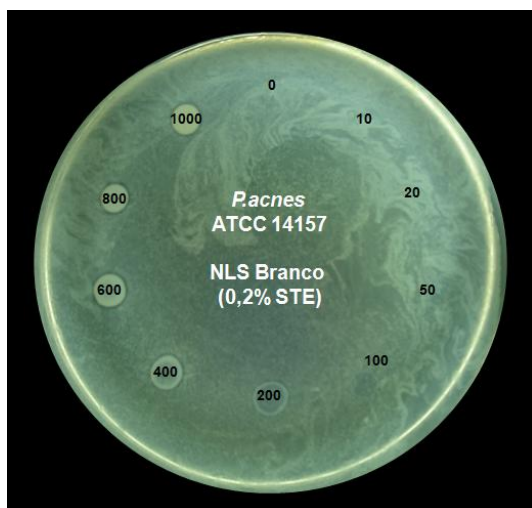
É possível observar em todas as tabelas que a solução de AL puro em NaOH 0,01M não apresentou atividade inibitória no crescimento bacteriano em nenhuma das concentrações avaliadas para todas as bactérias (*P.acnes* ATCC 14157 e isolado clínico; *S.aureus* ATCC 29313 e isolado clínico; e *S.epidermidis* ATCC

12228 e isolado clínico). A formulação de NLS Branco (0% STE) mostrou o mesmo comportamento apresentado pela solução de AL.

Observa-se que ocorre inibição do crescimento pela NLS Branco (0,2% STE) e NLS AR+AL (0,2% STE) com visualização de halo límpido de maneira idêntica para as seguintes bactérias: *P.acnes* (ATCC 14157 e isolado clínico) (**Tabelas 15 e 16**), *S.aureus* ATCC 29313 (**Tabela 17**) e *S.epidermidis* de isolado clínico (**Tabela 20**). Com estas informações sugere-se que, quando se avalia apenas qualitativamente a inibição do crescimento bacteriano a formulação NLS AR+AL (0,2% STE) apresenta atividade semelhante à encontrada para NLS Branco (0,2% STE). Devido à ausência de atividade da NLS Branco (0% STE) comparativamente à NLS Branco (0,2% STE), é sugerido que a presença da STE seria responsável pela inibição observada, possivelmente devido à carga positiva presente na superfície das partículas. Esta carga positiva interagiria com a membrana bacteriana levando à inibição do crescimento. Na NLS AR+AL (0,2% STE) esta atividade estaria mantida.

Sendo assim, aparentemente, a adição do AR e do AL não proporcionou uma maior atividade em relação à formulação Branco (0,2% STE). Contudo, há indícios de que a NLS AR+AL (0,2% STE) poderia ter uma maior atividade. Corroborando com esta hipótese, poderia se considerar, por exemplo, o fato de que o crescimento de *S.aureus* proveniente de isolado clínico foi inibido pela NLS AR+AL (0,2% STE) a partir da diluição que tem 200 µg/mL de AL, sem inibição correspondente pela NLS Branco (0,2% STE) em nenhuma concentração, conforme mostra a Tabela 18. Além disso, na Tabela 19 é possível notar que a inibição do crescimento de *S.epidermidis* ATCC 12228 pela NLS AR+AL (0,2% STE) se inicia numa concentração menor (50 µg/mL) em relação ao início de inibição apresentado pela NLS Branco (0,2% STE) em 200 µg/mL.

Em adição à estas informações, é importante considerar que, embora a metodologia utilizada não permita a medição dos halos de inibição, sugere-se que o diâmetro dos halos apresentados pela NLS AR+AL (0,2% STE) seria maior que os apresentados pela NLS Branco (0,2% STE). Isto pode ser ilustrado pela Figura 27, que mostra as placas de ágar BHI utilizado na avaliação da atividade antibacteriana sobre *P.acnes* ATCC 14157.



**Figura 27 – Placas de Petri mostrando os halos de inibição apresentados pelas NLS Branco (0,2% STE) e NLS AR+AL (0,2% STE) na avaliação do crescimento de *P. acnes* ATCC 14157, *S. aureus* ATCC 29313 e *S. epidermidis* ATCC 12228.**

É ainda importante considerar que um fato inesperado na avaliação da atividade antibacteriana, foi que a solução de AL não apresentou inibição do crescimento tanto das amostras de referência quanto dos isolados clínicos de *P. acnes*, *S. aureus* e *S. epidermidis*, contrariamente ao que foi observado no trabalho de Nakatsuji *et al.* (2009) e de Yang *et al.* (2009). Contudo, cabe dizer que a metodologia empregada foi diferente daquela dos trabalhos citados, não permitindo uma comparação direta com os resultados alcançados nestes trabalhos.

## 6 CONCLUSÃO

Nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) carregadas com ácido retinóico (AR) e ácido láurico (AL) para o tratamento tópico da acne vulgaris foram desenvolvidas, caracterizadas e avaliadas.

O método desenvolvido para determinação da concentração de AL nas NLS por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência mostrou-se adequado, atendendo as especificações necessárias. O diâmetro das NLS preparadas ficou em torno de 150 nm, com índice de polidispersividade (IP) inferior à 0,5, considerado adequado ao contexto da aplicação tópica.

O teor de encapsulação do AR nas NLS contendo 0, 0,2 e 0,4% de STE foi elevado após a preparação. O elevado teor de encapsulação na NLS com 0% de STE pode ser atribuído ao fato de o AL ser capaz de aumentar o número de defeitos na rede cristalina do lípide formador das nanopartículas, proporcionando uma melhor acomodação do AR na matriz. Contudo, uma diminuição significativa foi observada 15 dias após a preparação para a NLS com 0% de STE, enquanto que, na presença da STE, o teor de encapsulação do AR nas NLS manteve-se estável.

O teor de encapsulação do AL nas NLS contendo 0, 0,2 e 0,4% de STE foi elevado após a preparação. No entanto, uma diminuição significativa foi observada 15 dias após a preparação para a NLS com 0,4% de STE, enquanto que, para os níveis de 0 e 0,2% de STE, o teor de encapsulação do AL nas NLS manteve-se estável.

Os resultados das análises por Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e Difração de raios-X indicam que o AL causa desestruturação da matriz lipídica das NLS. Estas informações colaboraram com a hipótese de que esta desestruturação AL proporciona aumento da encapsulação do AR.

Na avaliação da atividade antibacteriana, verifica-se que as NLS carregadas com AR e AL apresentam atividade inibitória do crescimento para as três bactérias avaliadas. Além disso, verifica-se que a carga positiva determinada pela presença da STE tem papel importante para a atividade da formulação.

Sendo assim, é possível concluir que as NLS contendo AL facilitam a incorporação do AR e a presença da STE assegura boa estabilidade da encapsulação. Além disso, NLS carregadas com AR e AL apresentam potencial atividade antimicrobiana, representando, desta forma, uma alternativa interessante para o tratamento tópico da acne vulgaris.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANTUNES, M.V.; NAGEL, V.; LINDEN, R. Determinação de ácido valpróico em soro por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD), após derivatização com brometo de fenacila. **Química Nova**, v. 32, n. 5, 1227-1230, 2009.

BERGSSON, G.; STEINGRÍMSSON, O.; THORMAR, H. Bactericidal effects of fatty acids and monoglycerides on *Helicobacter pylori*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 20, p. 258-262, 2002.

BILLOW, J.A. Acne products. In: BERARDI, RR.. **Handbook of nonprescription drugs**. 11th ed. Washington: American Pharmacists Association, p. 569-578, 1996.

BOJAR, R.A.; HOLLAND, K.T. Acne and *Propionibacterium acnes*. **Clinics in Dermatology**, v. 22, p. 375-379, 2004.

BORCH, R.F. Separation of long chain fatty acids as phenacyl esters by High Pressura Liquid Cromatography. **Analytical Chemistry**, v. 47, p. 2437-2439, 1975.

BRASIL. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 02 jun. 2003.

BUNJES, H.; STEINIGER, F.; RICHTER, W. Visualizing the Structure of Triglyceride Nanoparticles in Different Crystal Modifications. **Langmuir** v. 23, p. 4005-4011, 2007.

BUNJES, H.; UNRUH, T. Characterization of lipid nanoparticles by differential scanning calorimetry, X-ray and neutron scattering. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.59, p. 379-402, 2007.

BURKHART, C.G.; BURKHART, C.N.; LEHMANN, P.F. Acne: a review of immunologic and microbiologic factors. **Postgraduate Medical Journal**, v. 75, p. 328-331, 1999.

BURKHART, C.G.; BURKHART, C.N. Expanding the microcomedone theory and acne therapeutics: *Propionibacterium acnes* biofilm produces biological glue that holds corneocytes together to form plug. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 57, p. 722-724, 2007.

CASTRO, G.A.; ORÉFICE, R.L.; VILELA, J.M.C.; ANDRADE, M.S.; FERREIRA, L.A.M. Development of a new solid lipid nanoparticle formulation containing retinoic acid for topical treatment of acne. **Journal of Microencapsulation**, v. 24, p. 395–402, 2007.

CASTRO, G.A.; FERREIRA, L.A.M. Novel vesicular and particulate drug delivery systems for topical treatment of acne. **Expert Opinion Drug Delivery**, v. 5(6), p. 665-679, 2008.

CASTRO, G.A.; COELHO, A.L.L.R.; OLIVEIRA, C.A.; MAHECHA, G.A.B.; ORÉFICE, R.L.; FERREIRA, L.A.M. Formation of ion pairing as an alternative to improve encapsulation and stability and to reduce skin irritation of retinoic acid loaded in solid lipid nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 381, p. 77–83, 2009.

COLLIER, C.N.; HARPER, J.C.; CANTRELL, W.C.; WANG, W.; FOSTER, K.W.; ELEWSKI, B.E. The prevalence of acne in adults 20 years and older. **Journal of American Academy of Dermatology**, v. 58, p.56-59, 2008.

CONNAH, M.; KASUBA, M. The use of zeta potential in the pharmaceutical industry. Malvern: Malvern Instruments Ltd., 2000. Disponível em: <<http://www.malvern.co.uk/malvern/kbase.nsf/d144375443d1fb7480256bfa0051a22a/09856725e6596f5480256c540051d c7e?OpenDocument>>. Acesso em 15 jan. 2011.

COOPER, A.J. Systemic review of *Propionibacterium acnes* resistance to systemic antibiotics. **The Medical Journal of Australia**, v. 169, p. 259-261, 1998.

CUNLIFFE, W.J.; HOLLAND, D.B.; JEREMY, A. Comedone formation: Etiology, clinical presentation and treatment. **Clinics in Dermatology**, v. 22, p. 367-374, 2004.

DRAKE, DR.; BROGDEN, K.A.; DAWSON, D.V.; WERTZ, P.W. Thematic review series: skin lipids. Antimicrobial lipids at the skin surface. **Journal of Lipid Research**, v. 49, p. 4–11, 2008.

DRÉNO, B. L'acné: actualités. **Journal de pédiatrie et de puériculture**, v. 23, p. 249-253, 2010.

EICHENFIELD, L.F.; FOWLER, J.F.; FRIED, R.G.; FRIEDLANDER, S.F.; LEVY, M.L.; WEBSTER, G.F. Perspectives on therapeutic options for acne: an update. **Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery**, v. 29, p. 13-16, 2010.

FRIEDLANDER, S.; EICHENFIELD, L.F.; FOWLER, J.F.; FRIED, R.G.; LEVY, M.L.; WEBSTER, G.F. Acne epidemiology and pathophysiology. **Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery**, v. 29, p. 2-4, 2010.

GOLLNICK, H.; SCHRAMM, M. Topical therapy in acne. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 11, S1, p. 8-12, 1998.

GOLLNICK, H. Current concepts of the pathogenesis of acne. **Drugs**, v. 63, n. 15, p. 1579-1596, 2003.

GOLLNICK, H.; CUNLIFFE, W.; BERSON, D.; et al. Management of acne: A report from a Global Alliance to Improve Outcomes in Acne. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 49, S1, Part.2, p. 1-37, 2003.

GOULART, Gisele Assis Castro. **Desenvolvimento de nanopartículas lipídicas sólidas para o tratamento tópico da acne vulgaris**. Belo Horizonte: UFMG, 2008. 168 p. Tese (Doutorado), Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2008.

HEURTAULT, B.; SAULNIER, P.; PECH, B.; PROUST, J.; BENOIT, J. Physico-chemical stability of colloidal lipid particles. **Biomaterials**, v. 24, p. 4283–4300, 2003.

ISAACS, C.E.; LITOV, R.E.; THORMAR, H. Antimicrobial activity of lipids added

to human milk, infant formula, and bovine milk. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 6, p. 362-366, 1995.

JENNING, V.; MÄDER, K.; GOHLA, S.H. Solid lipid nanoparticles (SLN™) based on binary mixtures of liquid and solid lipids: a <sup>1</sup>H-NMR study. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 205, p. 15–21, 2000a.

JENNING, V.; GYSLER, A.; SCHÄFER-KORTING, M.; GOHLA, S. Vitamin A-loaded solid lipid nanoparticles for topical use: occlusive properties and drug targeting to the upper skin. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 49, p. 211- 218, 2000b.

JOSHI, M.D.; MÜLLER, R.H. Lipid nanoparticles for parenteral delivery of actives. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 71, p. 161-172, 2009.

KABARA, J.J.; SWIECZKOWSKI, D.M.; CONLEY, A.J.; TRUANT, J.P. Fatty acids and derivatives as antimicrobial agents. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 2, n. 1, p. 23-28, 1972.

KATSAMBAS, A.; DESSINIOTI, C. Hormonal therapy for acne: why not as first line therapy? facts and controversies. **Clinics in Dermatology**, v. 28, p. 17–23, 2010.

KOO, J. The psychosocial impact of acne: patients perceptions. **The Journal of American Academy of Dermatology**, v. 32, n. 5, Part. 3, p.S26-S30, 1995.

KRAUTEIM, A.; GOLLNICK, H.P.M. Acne: topical treatment. **Clinics in Dermatology**, v. 22, p. 398-407, 2004.

LEYDEN, J.J.; MCGINLEY, K.J.; VOWELS, B. *Propionibacterium acnes* colonization in acne and nonacne. **Dermatology**, v. 196, p. 55-58. 1998.

LEYDEN, J.J. Topical treatment of acne vulgaris: retinoids and cutaneous irritation. **The Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 38, p. S1-S4, 1998.

LEYDEN, J.J.; KROCHMAL, L.; YAROSHINSKY, A. Two randomized, Double-blind, controlled trials of 2219 subjects to compare the combination clindamycin/tretinoin hydrogel with each agent alone and vehicle for the treatment of acne vulgaris. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 54, p. 73-81, 2006.

LIM, SOO-JEONG; KIM, CHONG-KOOK. Formulation parameters determining the physicochemical characteristics of solid lipid nanoparticles loaded with all-*trans* retinoic acid. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 243, p. 135-146, 2002.

LIMA, F.L.; FARIAS, F.F.; COSTA, J.E.; CARVALHO, M.A.R.; ALVIANO, C.S.; FARIAS, L.M. Bacteriocin production by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* isolated from the oral cavity of humans with periodontal disease, periodontally healthy subjects and marmosets. **Research in Microbiology**, v. 153, p. 45-52, 2002.

LIU, P.T.; KRUTZIK, S.R.; KIM, J.; MODLIN, L. Cutting edge: All-*trans* retinoic acid down-regulates TLR2 expression and function. **The Journal of Immunology**, v. 174, p. 2467-2470, 2005.

LIU, J; HU, W.; CHEN, H.; NI, Q.; XU, H.; YANG, X. Isotretinoin-loaded solid lipid nanoparticles with skin targeting for topical delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 328, p. 191-195, 2007.

LUCKY, A.W.; CULLEN, S.I.; FUNICELLA, T.; JARRATT, M.T.; JONES, T. Double-blind, vehicle-controlled, multicenter comparison of two 0.025% tretinoin creams in patients with acne vulgaris. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 38, p. S24-S30, 1998.

MALVERN INSTRUMENTS LTD. **Size measurements - Manual of Zetasizer 3000HS**. Malvern, UK. MAN 0149 Issue 2, p 7.5, 2000.

MANCONI, M.; SINICO, C.; VALENTI, D.; LOY, G.; FADDA, A.M. Niosomes as carriers for tretinoin. I. Preparation and properties. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 234, p. 237-248, 2002.

MANDAWAGADE, S.D.; PATRAVALE, V.B. Development of SLNs from natural lipids: Application to topical delivery of tretinoin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 363, p. 132-138, 2008.

MARTIN, B.; MEUNIER, C.; MONTELS, D.; *et al.* Chemical stability of adapalene and tretinoin when combined with benzoyl peroxide in presence and in absence of visible light and ultraviolet radiation. **British Journal of Dermatology**, v. 139, S52, p. 8-11, 1998.

MEHNERT, W.; MÄDER, K. Solid lipid nanoparticles production, characterization and applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 47, p.165-196, 2001.

MEHTA, A.; OESER, A.M.; CARLSON, M.G. Rapid quantitation of free fatty acids in human plasma by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 719, p. 9-23, 1998.

MUKHERJEE, S.; DATE, A.; PATRAVALE, V.; KORTING, H.C.; ROEDER, A.; WEINDI, G. Retinoids in the treatment of skin aging: an overview of clinical efficacy and safety. **Clinical Interventions in Aging**, v. 4, p. 327-348, 2006.

MÜLLER, H.; KARSTEN, M.; GOHLA, S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery – a review of the state of the art. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 50, p. 161-177, 2000.

NAKATSUJI, T.; KAO, M.C.; FANG, J.Y.; ZOUBOULIS, C.C.; ZHANG, L.; GALLO, R.L.; *et al.* Antimicrobial property of lauric acid against *Propionibacterium acnes*: its therapeutic potential for inflammatory acne vulgaris. **Journal of Investigative Dermatology**, doi:10.1038/jid.2009.93, 2009.

OLIVEIRA, A.A.P.; FARIAS, L.M.; NICOLI, J.R.; COSTA, J.E.; CARVALHO, M.A.R. Bacteriocin production by *Fusebacterium* isolates recovered from the oral cavity of human subjects with and without periodontal disease and of marmosets. **Research in Microbiology**, v. 149, p. 585-594, 1998.

PARDEIKE, J.; HOMMOSS, A.; MÜLLER, R.H. Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 366, p. 170–184, 2009.

PAWIN, H.; BEYLOT, C.; CHIVOT, M.; FAURE, M.; POLI, F.; REVUZ, J.; DRÉNO, B. Physiopathology of acne vulgaris: recent data, new understanding of the treatments. **European Journal of Dermatology**, v. 14, p. 4-12, 2004.

PUHVEL, S.M.; REISNER, R.M. Effect of fatty acids on the growth of *Corynebacterium acnes in vitro*. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 54, n. 1, p. 48-52, 1970.

RIGOPOULOS, D.; LARIOS, G.; KATSAMBAS, A. The role of isotretinoin in acne therapy: why not as first-line therapy? facts and controversies. **Clinics in Dermatology**, v. 28, p. 24–30, 2010.

SCHÄFER-KORTING, M.; MEHNERT, W.; KORTING, H.C. Lipid nanoparticles for improved topical application of drugs for skin diseases. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, n. 6, p. 427-43, 2007.

SHAH, K.A.; DATE, A.A.; JOSHI, M.D.; PATRAVALE, V.B. Solid lipid nanoparticles (SLN) of tretinoin: potential in topical delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 345, p. 163-171, 2007.

SOUTO, E.B.; WISSING, S.A.; BARBOSA, C.M.; MÜLLER, R.H. Evaluation of the physical stability of SLN and NLC before and after incorporation into hydrogel formulations. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 58, p. 83–90, 2004.

STECOVÁ, J.; MEHNERT, W.; BLASCHKE, T.; KLEUSER, B.; SIVARAMAKRISHNAN, R.; ZOUBOULIS, C.C.; SELTMANN, H.; KORTING, H.C.; KRAMER, K.D.; SCHÄFER-KORTING, M. Cyproterone acetate loading to lipid nanoparticles for topical acne treatment: particle characterization and skin uptake. **Pharmaceutical Research**, v. 24, p. 991-1000, 2007.

TANGHETTI, E.A. Combination therapy is the standard of care. **Cutis**, v. 76, p. 8-14, 2005.

TASHTOUSH, B.M.; JACOBSON, E.L.; JACOBSON, M.K. UVA is the major contributor to the photodegradation of tretinoin and isotretinoin: implications for development of improved pharmaceutical formulations. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 352, p. 123-128, 2008.

TENAUD, I.; KHAMMARI, A.; DRENO, B. In vitro modulation of TLR-2, CD1d and IL-10 by adapalene on normal human skin and acne inflammatory lesions. **Experimental Dermatology**, v. 16, p. 500-506, 2007.

THE ZETA POTENTIAL. **Colloidal dynamics: eletroacustics tutorials**. 1999. Disponível em: <<http://www.colloidal-dynamics.com/docs/CDEITut1.pdf>>. Acesso em: 15 jan. 2011.

THIBOUTOUT, D. New treatments and therapeutic strategies for acne. **Archives of Family Medicine**, v. 9, p. 179-187, 2000.

THIBOUTOUT, D.; GOLLNICK, H.; BETOLLI, V.; DRÉNO, B.; KANG, S.; LEYDEN, J.J; *et al.* New insights into the management of acne: An update from the Global Alliance to Improve Outcomes in Acne Group. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 60, p. S1-50, 2009.

WANG, K.C.; ZANE, L.T. Recent advances in acne vulgaris research: Insights and clinical implications. **Advances in Dermatology**, v. 24, p. 197–209, 2008.

WEBSTER, G. Topical tretinoin in acne therapy. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 39, p. 38-44, 1998.

WEBSTER, G.F. Acne vulgaris. **British Medical Journal**, v. 325, p. 475-479, 2002.

WEBSTER, G.F.; GRABER, E.M. Antibiotic treatment for acne vulgaris. **Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery**, v. 27, p. 183-187, 2008.

WHITE, G.M. Recent findings in the epidemiologic evidence, classification, and subtypes of acne vulgaris. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 39, p.34-37, 1998.

WISSING, S.A.; KAYSER, O.; MÜLLER, R.H. Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n. 9, p. 1257-1272, 2004.

WOSICKA, H.; CAL, K. Targeting to the hair follicles: Current status and potential. **Journal of Dermatological Science**, v. 57, p. 83-89, 2010.

YANG, D.; PORNATTANANGKUL, D.; NAKATSUJI, T.; CHAN, M.; CARSON, D.; HUANG, C.; ZHANG, L. The antimicrobial activity of liposomal lauric acids against *Propionibacterium acnes*. **Biomaterials**, v. 30, p. 6035-6040, 2009.

ZAENGLEIN, A.L. Topical retinoids in the treatment of acne vulgaris. **Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery**, v. 27, p. 177-182, 2008.

ZETA-METER INC. Zeta Potential: A Complete Course in 5 Minutes. Disponível em <<http://www.zeta-meter.com/5min.pdf>>. Acesso em 14 jan. 2011.