

VANESSA CARLA DINIZ LARA

**DESENVOLVIMENTO DE NANOCÁPSULAS
CONTENDO ÁCIDO RETINÓICO PARA
TRATAMENTO TÓPICO DA ACNE**

**Belo Horizonte
Faculdade de Farmácia da UFMG
2008**

VANESSA CARLA DINIZ LARA

**DESENVOLVIMENTO DE NANOCÁPSULAS
CONTENDO ÁCIDO RETINÓICO PARA
TRATAMENTO TÓPICO DA ACNE**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.
Orientador: Prof. Dr. Lucas Antônio M. Ferreira

**Belo Horizonte
Faculdade de Farmácia da UFMG
2008**

À Deus, pelo dom da vida e amor incondicional, tendo me dado discernimento para superar todos os momentos difíceis e esperança quando quase não havia. À Nossa Senhora, sempre protetora e amável, ensinando-me a amar verdadeiramente.

Ao amor da minha vida, Chiquinho, pela eterna paciência, pelo amor verdadeiro e carinho incessante e por tantos momentos de sacrifício que compartilhou comigo.

Aos meus pais, que sempre acreditaram em mim, pelo apoio, carinho e amor sempre presentes, pelos valores de vida que me ensinaram com tanta sabedoria; pela compreensão em tantos momentos de ausência.

À minha irmã, que sempre se dispôs a me ajudar, pelo carinho e pela linda e carinhosa afilhada a mim confiada.

Aos amigos da Formular, que me incentivaram e compartilharam comigo das alegrias, e, principalmente, ao Renato, que conviveu com tanto estresse, e à Rosana, que torceu por mim.

*“O dia mais belo? Hoje
 A coisa mais fácil? Equivocar-se
 O obstáculo maior? O medo
 O erro maior? Abandonar-se
 A raiz de todos os males? O egoísmo
 A distração mais bela? O trabalho
 A pior derrota? O desalento
 Os melhores professores? As crianças
 A primeira necessidade? Comunicar-se
 O que mais faz feliz? Ser útil aos demais
 O mistério maior? A morte
 O pior defeito? O mau humor
 A coisa mais perigosa? A mentira
 O sentimento pior? O rancor
 O presente mais belo? O perdão,
 O mais imprescindível? O lar
 A estrada mais rápida? O caminho correto
 A sensação mais grata? A paz interior
 O resguardo mais eficaz? O sorriso
 O melhor remédio? O otimismo
 A maior satisfação? O dever cumprido
 A força mais potente do mundo? A fé
 As pessoas mais necessárias? Os pais
 A coisa mais bela de todas? O amor”*

Madre Teresa de Calcutá

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que direta ou indiretamente colaboraram para a realização desse trabalho, em especial:

Ao Professor Lucas Antônio Miranda Ferreira, pela orientação e pelos ensinamentos ministrados durante este trabalho.

À Margareth Spangler (CETEC-MG) pela disponibilização dos equipamentos para a realização das análises de Microscopia de Força Atômica.

Ao Vilela, pela execução dos ensaios de Microscopia de Força Atômica, pela disponibilidade em ajudar e pelo interesse no projeto proposto, pois muito contribuiu para o desenvolvimento desse trabalho.

Ao Eduardo, do Laboratório de Tecnologia, pelo auxílio no estudo de permeação utilizando pele dermatomada.

Aos colegas do curso de Pós-graduação, pela ajuda e convivência.

Aos meus familiares, principalmente ao meu marido, que souberam me incentivar e me apoiar com todo carinho durante minha trajetória.

Ao André Nascimento, pelos desabafos e pela paciência em me ouvir, trocando sempre experiências positivas e incentivos.

Às minhas amigas, principalmente Raquel e Paty, que sempre compartilharam comigo desta caminhada e torceram por mim.

À Comunidade Raízes de Jessé, pelo crescimento pessoal e espiritual proporcionado através da convivência com pessoas maravilhosas que dedicam suas vidas ao projeto de Deus.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	8
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	10
RESUMO	12
ABSTRACT	13
INTRODUÇÃO GERAL	14
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
1ª PARTE – ACNE	18
1 GENERALIDADES	18
2 ETIOLOGIA E PATOGÊNESE DA ACNE	19
3 TRATAMENTO DA ACNE	21
3.1 Tratamento sistêmico	22
3.2 Tratamento tópico	23
2ª PARTE – PELE	28
1 PELE	28
1.1 Barreira epidérmica na acne	28
2 ABSORÇÃO PERCUTÂNEA	29
3ª PARTE – SISTEMAS POLIMÉRICOS: NANOCÁPSULAS	32
1 SISTEMAS POLIMÉRICOS	32
1.1 Propriedades físicas, químicas e biológicas do polímero Poli- ϵ -caprolactona	34
2 NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS	35
3 PREPARAÇÃO DAS NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS	37
4 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS	39
4.1 Distribuição do tamanho das nanocápsulas poliméricas	39
4.2 Potencial Zeta (ζ) das nanocápsulas poliméricas	41
4.3 Teor de Encapsulação	42
4.4 Morfologia externa das nanocápsulas poliméricas	42
5 ESTUDO DE ESTABILIDADE DAS NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS	44
6 NANOCÁPSULAS POLIMERICAS PARA APLICAÇÃO TÓPICA	45

OBJETIVOS	48
1 OBJETIVO GERAL	49
2 OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	49
MATERIAIS E MÉTODOS	50
1 MATERIAIS	51
2 MÉTODOS	51
2.1 Construção da Curva Analítica para o doseamento do Ácido retinóico	51
2.1.1 Condições cromatográficas	53
2.1.2 Preparo da fase móvel	53
2.1.3 Linearidade da Curva Analítica	53
2.2 Preparação das nanocápsulas poliméricas	54
2.2.1 Preparação das nanocápsulas brancas	55
2.2.2 Preparação das nanocápsulas contendo ácido retinóico a 0,1% p/v	57
2.2.3 Preparação das nanocápsulas contendo ácido retinóico a 0,1% p/v e antioxidantes a 0,01% p/v	57
2.3 Caracterização físico-química das nanocápsulas poliméricas	58
2.3.1 Distribuição do Tamanho e Potencial Zeta	58
2.3.2 Teor de Encapsulação	58
2.3.3 Morfologia externa das nanocápsulas poliméricas	60
2.4 Estudo de Estabilidade das nanocápsulas poliméricas	61
2.5 Estudos de liberação <i>in vitro</i>	61
2.5.1 Estudo da solubilidade do AR no Líquido Receptor	61
2.5.2 Obtenção das formulações	62
2.5.3 Perfil de liberação <i>in vitro</i>	62
2.6 Permeação cutânea <i>in vitro</i>	64
2.6.1 Estudo da solubilidade do AR no Líquido Receptor	64
2.6.2 Montagem das células	64
2.6.3 Aplicação das formulações	65
2.6.4 Determinação da difusão	65
2.6.5 Validação da remoção do AR não absorvido	66
2.6.6 Validação da extração do AR retido na fita <i>stripping</i>	66
2.6.7 Validação da extração do AR retido na pele	67

RESULTADOS E DISCUSSÃO	68
1 LINEARIDADE DA CURVA ANALÍTICA	69
2 PREPARAÇÃO DAS NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS	70
3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS	70
3.1 Caracterização físico-química das nanocápsulas brancas	71
3.2 Caracterização físico-química das NC contendo AR a 0,1% p/v	72
3.3 Morfologia externa das nanocápsulas poliméricas	74
4 ESTUDO DE ESTABILIDADE DAS NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS	78
4.1 Estudo de estabilidade das NC brancas	78
4.2 Estudo de estabilidade das NC contendo AR a 0,1% p/v	80
5 ESTUDO DE LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i>	80
5.1 Solubilidade do AR no Líquido Receptor	80
5.2 Perfil de liberação <i>in vitro</i>	81
6 PERMEAÇÃO CUTÂNEA <i>IN VITRO</i>	84
6.1 Solubilidade do ácido retinóico no Líquido receptor	84
6.2 Validação da remoção do AR não absorvido	84
6.3 Validação da extração do AR retido na fita stripping	84
6.4 Validação da extração do AR retido na pele	84
6.5 Permeação cutânea <i>in vitro</i>	85
CONCLUSÃO	89
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Os agentes utilizados na terapia tópica da acne e suas respectivas atividades ..	23
Tabela 2: Composição (% p/v) das formulações das nanocápsulas poliméricas	57
Tabela 3: Resultados estatísticos obtidos para as soluções padrões de AR em fase móvel, para as diferentes concentrações utilizadas na construção da Curva Analítica	70
Tabela 4: Características físico-químicas das nanocápsulas brancas.....	71
Tabela 5: Características físico-químicas das nanocápsulas contendo AR a 0,1% p/v	73
Tabela 6: Estudo de estabilidade das nanocápsulas brancas	79
Tabela 7: Estudo de estabilidade das NC contendo AR a 0,1% p/v sem antioxidantes (NC 3) e com antioxidantes (NC 5)	80
Tabela 8: Penetração e permeação cutânea do AR (% dose aplicada e $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) a partir de nanocápsula e solução, através da pele intacta de orelha de porco, após 8 horas	85
Tabela 9: Permeação cutânea do AR (% dose aplicada e $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) a partir de solução etanólica ^a , através da pele intacta sem estrato córneo ^b (EC) e pele dermatomada ^c , após 8h.....	86
Tabela 10: Penetração e permeação cutânea do AR (% dose aplicada e $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) a partir de solução, nanocápsula (NC) e nanoemulsão (NE) através de pele de orelha de porco dermatomada ^b , após 8h	87

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Diagrama esquemático da comedogênese	19
Figura 2: Representação esquemática da patogênese da acne	20
Figura 3: Estrutura química do ácido <i>trans</i> -retinóico	26
Figura 4: Diagrama simplificado do estrato córneo e de duas microrrotas de penetração de fármacos (1) via matriz lipídica entre os corneócitos (rota intercelular) e (2) através dos corneócitos e matriz lipídica intercelular (rota transcelular)	29
Figura 5: Diagrama simplificado da estrutura da pele e rota folicular (UPS) de penetração de fármacos	30
Figura 6: Estrutura química da poli- ϵ -caprolactona	34
Figura 7: Mecanismo de hidrólise da poli- ϵ -caprolactona	34
Figura 8: Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas: (a) fármaco dissolvido no núcleo oleoso das nanocápsulas; (b) fármaco adsorvido à parede polimérica das nanocápsulas; (c) fármaco retido na matriz polimérica das nanoesferas; (d) fármaco adsorvido ou disperso molecularmente na matriz polimérica das nanoesferas	35
Figura 9: Método usual, empregado na preparação de nanopartículas poliméricas, baseado na precipitação de polímeros pré-formados	56
Figura 10: Representação esquemática da metodologia para determinação da concentração de ácido retinóico total, livre solúvel e livre precipitado	60
Figura 11: Representação esquemática da Célula de difusão de Franz	62
Figura 12: Representação gráfica da Curva Analítica do ácido retinóico, obtida por CLAE..	69
Figura 13: Imagens de nanocápsulas brancas obtidas por MFA (vista do topo) (Varredura de 20 x 20 μm)	75
Figura 14: Imagens de nanocápsulas carregadas com ácido retinóico obtidas por MFA. Em (A) vista do topo e em (B) visão tridimensional das partículas (Varredura de 10 x 10 μm) ...	76
Figura 15: Representação esquemática da evolução de: (a) sistema nanomatriz (nanoesfera) e (b) sistema nanovesicular (nanocápsula) depositados e secos sobre uma superfície	77
Figura 16: Imagem topográfica e perfil topográfico de nanocápsulas carregadas com ácido retinóico, apresentando a relação diâmetro/altura das partículas	78
Figura 17: Perfil de liberação <i>in vitro</i> do AR a partir de nanocápsula, nanoemulsão e solução etanólica, através da membrana de teflon (0,45 μm)	81
Figura 18: Perfil de liberação <i>in vitro</i> do AR a partir de nanocápsula, nanoemulsão e solução etanólica, através da membrana de nylon (0,22 μm)	82
Figura 19: Modelo esquemático da interface da nanocápsula, mostrando a localização do polímero na interface entre o núcleo oleoso e a fase aquosa	83

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AR	Ácido Retinóico
BHT	Butilhidróxitolueno
°C	Graus Celsius
CETEC-MG	Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais
CLAE	Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência
Cm ²	Centímetro elevado ao quadrado (segunda potência)
Cm ³	Centímetro elevado ao cubo (terceira potência)
CV	Coeficiente de Variação
Da	Dalton
DAD	<i>Diode Array Detector</i>
D/h	Diâmetro por Altura
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DP	Desvio Padrão
DPR	Desvio Padrão Relativo
EC	Estrato córneo
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético sal dissódico
EHL	Equilíbrio Hidrófilo-lipófilo
Et al.	Et alli
g/mol	Grama por mol
h	Hora
Hz	Hertz
IA	Índice de Acidez
IP	Índice de Polidispersão
kHz	Kilo Hertz
MET	Microscopia de Transmissão Eletrônica
MFA	Microscopia de Força Atômica
mg/mL	Miligrama por mililitro
mL	Mililitro
mL/min	Mililitro por minuto
mm	Milímetro
mM	Mili Molar
MM	Massa Molar
mV	milivolt
µg, mcg	Micrograma

$\mu\text{g}/\text{cm}^2$	Micrograma por centímetro ao quadrado
$\mu\text{g}/\text{mL}$	Micrograma por mililitro
μL	Microlitro
μm	Micrômetro
n	Número de repetições
NC	Nanocápsula
nd	Não determinado
ND	Abaixo do limite de detecção
NE	Nanoemulsão
Nm	Nanômetro
N/m	Newton por metro
NP	Nanopartícula
O/A	Emulsão óleo em água
OE	Óxido de etileno
P	Coeficiente de partição octanol/água
PCL	Poli- ϵ -caprolactona
PGA	Ácido poliglicólico
PLA	Ácido polilático
PLGA	Ácido polilático e poliglicólico
pH	Potencial Hidrogeniônico
PP 2	Poliolprepolímero 2
PTFE	Politetrafluoroetileno
r	Coeficiente de correlação
r^2	Coeficiente de determinação
RAR	Receptores nucleares de ácido retinóico
RP	<i>Reverse Phase</i>
rpm	Rotação por minuto
RXR	Receptores X retinóides
TCL	Triglicérides de cadeia longa
TCM	Triglicérides de cadeia média
UPS	Unidade pilosebácea
%	Porcentagem
% p/v	Título em Porcentagem Peso por Volume
% v/v	Título em Porcentagem Volume por Volume
ζ	Potencial Zeta
\emptyset	Diâmetro

RESUMO

Acne vulgaris é uma condição que afeta cerca de 80% dos adolescentes no mundo. De acordo com sua evolução, acne é classificada como média, moderada ou severa. Ácido retinóico (tretinoína; AR) é a primeira escolha para pacientes com acne média a moderada. Contudo, aplicação tópica de AR é seguida por uma elevada incidência de reações adversas: irritação local tais como eritema, *peeling* e queimação no sítio de aplicação e susceptibilidade à luz solar aumentada. Estratégia para novas formulações é modificar a biodisponibilidade local, controlando a liberação do AR através de polímeros, e promover o direcionamento folicular, resultando num tratamento mais eficiente com efeitos colaterais reduzidos. Nanocápsulas (NC) representam uma alternativa interessante para liberação controlada, tão bem como pela capacidade de se acumular na unidade pilosebácea. NC têm elevada eficiência de encapsulação para fármacos lipofílicos, tais como AR ($\log P = 4,6$), baixo conteúdo polimérico e baixa toxicidade inerente. O objetivo desse trabalho foi a preparação, a caracterização e a investigação do perfil de liberação e permeação cutânea das NC contendo AR. NC contendo AR foram preparadas pelo método da nanoprecipitação. NC foram caracterizadas por tamanho, homogeneidade (Índice de polidispersão) e potencial zeta usando um Zetasizer 3000HS. A morfologia externa foi avaliada por Microscopia de Força Atômica (MFA). Os estudos de liberação *in vitro* foram avaliados através da membrana de teflon ($0,45 \mu\text{m}$) e de nylon ($0,22 \mu\text{m}$), usando células de difusão de Franz. Eficiência de encapsulação de AR em NC foi elevada (~90%). O diâmetro médio, calculado por Espectroscopia de Correlação de Fótons, variou de 218 a 318 nm (NC brancas) e de 219 a 281 nm (NC contendo AR). O potencial zeta variou de $-31,5$ a $-44,0$ mV (NC brancas) e de $-26,0$ a $-50,0$ mV (NC contendo AR). NC brancas mantiveram a estabilidade físico-química após 30 dias de armazenamento a 25°C , contudo NC não foram capazes de prevenir a degradação do AR (redução de 40% na concentração do fármaco foi observada após 30 dias). Liberação do AR a partir da nanocápsula (NC) foi maior que aquela observada para solução do fármaco e menor do que para Nanoemulsão (NE). A baixa liberação da solução foi devido à evaporação do etanol e precipitação do AR no compartimento doador. O polímero presente na interface da NC produziu liberação controlada do AR. Os estudos de permeação conduzidos em pele dermatomada de orelha de porco foram realizados por 8 horas, conforme o tempo de aplicação clínica. Ele indicou que o AR não foi encontrado nos canais receptores para NC e NE. A solução alcoólica contendo AR permeou a pele. Isso pode ser devido ao efeito significativo acelerador de penetração do etanol e do propilenoglicol. Conclui-se que a formulação de NC pode evitar a captação sistêmica de tretinoína em comparação com o controle e a NC apresenta um potencial de evitar efeitos colaterais sistêmicos. Esses resultados indicam que a NC contendo AR, com alvo para a pele, pode ser um carreador promissor para aplicação tópica de um sistema de liberação controlada de tretinoína e evitar reações adversas.

Palavras-chave: Ácido retinóico; nanocápsulas poliméricas; penetração na pele; liberação tópica

ABSTRACT

Acne vulgaris is a frequent condition affecting about 80 percent of teenagers in the world. According to the evolution, acne is classified as mild, moderate or severe. Retinoic acid (tretinoin; RA) is the first choice for patients with mild to moderate acne. Nevertheless, topical application of RA is followed by a high incidence of adverse effects: local irritation such as erythema, peeling and burning at the application site and increased susceptibility to sunlight. Strategy for the new formulations is modifying local bioavailability, controlling RA release through polymers, and promoting follicular targeting resulting in more efficient treatment with reduced side effects. Nanocapsules (NC) representing an interesting alternative for controlled release, as well as for their capacity to target the pilosebaceous unit. NC has high entrapment efficiency for lipophilic drugs, as RA ($\log P = 4.6$), low polymer content and low inherent toxicity. The aim of this work was the preparation, characterization and investigation of the release profile and cutaneous permeation of the RA-loaded NC. NC containing RA was prepared by nanoprecipitation method. NC were characterized for size, homogeneity (IP) and zeta potential using a Zetasizer 3000HS. The external morphology was evaluated by atomic force microscopy (AFM). The *in vitro* release studies were evaluated through Teflon (0.45 μm) and Nylon (0.22 μm) membranes, using Franz diffusion cells. Encapsulation efficiency of RA in NC was high (~90%). The average diameter, calculated by photon correlation spectroscopy (PCS), ranged from 218 to 318nm (blank NC) and from 219 to 281nm (RA-loaded NC). The zeta potential ranged from -31.5 to -44.0 mV (blank NC) and from -26.0 to -50.0 mV (RA-loaded NC). Blank NC maintained the physicochemical stability after 30 days of storage at 25°C, however RA-loaded NC was not able to prevent RA degradation (reduction of 40% in drug concentration was observed after 30 days). RA release from a nanocapsule (NC) was higher than that observed for drug solution and minor than that observed for Nanoemulsion (NE). The low release from solution was due to evaporation of ethanol and precipitation of RA in donor compartment. The polymer present in the interface of the NC provided controlled release of the RA. The permeation studies conducted in dermatomed pig ear skin were performed for 8h according to the clinical application time. It indicated that RA was not found in receptor chambers from NC and NE. The alcoholic solution containing RA permeated the skin. This might be due to the significant penetration enhancement effect of ethanol and propylene glycol. It is concluded that the NC formulation can avoid the systemic uptake of tretinoin in comparison with the control and NC present a potential to avoid the systemic adverse side effect. These results indicate that RA-loaded NC with skin targeting may be a promising carrier for topical application of tretinoin controlling release system and avoiding adverse effects.

Keywords: Retinoic acid; polymeric nanocapsules; skin penetration; topical delivery

INTRODUÇÃO GERAL

INTRODUÇÃO GERAL

Acne vulgaris é uma doença de pele comum, que afeta cerca de 70 a 80% de adolescentes e jovens. A acne representa um desafio devido à sua prevalência, complexidade e faixa de expressão clínica e, se não tratada, pode ter sérias conseqüências físicas e psicológicas.

Acne é uma doença inflamatória crônica da unidade pilosebácea (UPS). Não existe cura conhecida para a acne. Contudo, a maioria dos casos de acne pode ser controlada com tratamento, com o objetivo de se conseguir eficácia e tolerabilidade máximas com reações adversas mínimas. É de extrema importância se propor intervenções precoces e efetivas no tratamento da acne, no qual o sucesso está intimamente relacionado ao tratamento das causas patogênicas e dos sintomas clínicos.

Tratamentos sistêmicos são indicados para acne nodular ou severa. A maioria dos pacientes apresenta acne pápulopustular ou comedogênica, leve a moderada. Em tais pacientes, a terapia tópica é a primeira linha de tratamento.

Os agentes tópicos mais utilizados no tratamento da acne são os retinóides tópicos, tais como ácido retinóico (AR), isotretinoína e adapaleno, além de peróxido de benzoíla, ácido azelaico, entre outros. AR é o agente antiacne tópico mais efetivo.

Aplicação tópica do AR é freqüentemente acompanhada de uma série de reações adversas locais: irritação, eritema, *peeling*, queimação e *secura* da pele. Diante dessas manifestações clínicas, novas formulações de AR, com efetividade similar, mas com menor toxicidade, têm sido propostas. Lipossomas, microesferas e formulações contendo poliolioprepolímero 2 são os mais citados. As microesferas, disponíveis comercialmente, mostraram efetividade similar, mas menor incidência de reações adversas do que as formulações convencionais de AR.

Recentemente, muita ênfase tem sido dada à aplicação tópica de nanocápsulas. As nanocápsulas, carreadores nanoparticulados submicrônicos, compostos de um núcleo oleoso circundado por uma parede polimérica, são excelentes carreadores para fármacos lipofílicos. A aplicação tópica das nanocápsulas favorece o acúmulo, dependente do tamanho, nos folículos pilosos, mas a penetração cutânea destes sistemas, em áreas não foliculares, não foi observada.

Diante do exposto, o encapsulamento do ácido retinóico em nanocápsulas seria uma alternativa interessante para o tratamento tópico da acne vulgaris. O objetivo deste trabalho é, portanto, desenvolver e caracterizar nanocápsulas de AR, avaliar o perfil de liberação *in vitro* e avaliar a permeação cutânea *in vitro* comparada com sistemas convencionais.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1ª PARTE – ACNE

1 GENERALIDADES

Acne vulgaris é uma doença de pele comum, que afeta cerca de 70 a 80% de adolescentes e jovens adultos, entre 11 e 30 anos (KRAUTHEIM & GOLLNICK, 2004; FEDERMAN & KIRSNER, 2000). Embora a acne acometa adolescentes, 8% dos jovens de 25 a 34 anos e 3% dos adultos de 35 a 44 anos também são afetados (FEDERMAN & KIRSNER, 2000). Acne representa um desafio para dermatologistas, devido à sua prevalência, complexidade e faixa de expressão clínica. Embora seja superficial e não seja uma ameaça à vida do paciente, acne é uma doença que, se não tratada, pode ter sérias conseqüências físicas e psicológicas. Alguns fatores psicológicos implicados na acne severa são fatores de risco para suicidas, baixa auto-estima e expectativas profissionais, inibição social, depressão e ansiedade (GOLLNICK, 2003).

Acne vulgaris pode se apresentar sob uma grande variedade de formas clínicas, dependendo do tipo, número e severidade da lesão predominante. Acne pode ser classificada primariamente como comedogênica, papular, pustular ou nodular (SHALITA, 1998). Para Ng e colaboradores (2003), a acne pode ser classificada em três categorias principais: comedogênica, inflamatória e nodulocística. Cada diferente categoria tem tratamentos específicos recomendados e pode ser classificada de acordo com o grau da severidade em leve, moderada ou severa. O grau da severidade pode ser determinado pela contagem do número de lesões e pela quantidade de área superficial envolvida.

Acne é uma doença inflamatória crônica da unidade pilosebácea (UPS) (KORECK et al., 2003). Geralmente, ela está limitada a regiões do corpo onde as glândulas sebáceas são mais abundantes: face, pescoço, tórax, membros superiores e parte superior das costas. Lesões acnéicas não-inflamatórias incluem comedões abertos e fechados. Lesões inflamatórias incluem pápulas, pústulas e nódulos (BROWN & SHALITA, 1998).

Não existe cura conhecida para a acne. Contudo, a maioria dos casos de acne pode ser controlada substancialmente com tratamento. O diagnóstico e tratamento da acne são bem estabelecidos e a pesquisa terapêutica da acne continua a expandir. O objetivo na seleção de um regime terapêutico deveria ser conseguir eficácia e tolerabilidade máximas com efeitos colaterais mínimos (NG et al., 2003).

2 ETIOLOGIA E PATOGÊNESE DA ACNE

Acne é uma doença multifatorial e os fatores patogênicos mais significantes da acne são: queratinização anormal do ducto (comedogênese), aumento da secreção de sebo, anormalidades da flora microbiana e inflamação (KORECK et al., 2003; CUNLIFFE et al., 2003; WEBSTER, 2005).

A UPS na pele normal é composta por glândulas sebáceas multilobulares, pêlo rudimentar e canal folicular revestido com epitélio escamoso estratificado. Durante a renovação celular normal da pele, as células provenientes da descamação do epitélio folicular são carregadas ao canal folicular, através do infundíbulo (túnel com abertura no topo do folículo), pelo sebo secretado pelas glândulas sebáceas. O desenvolvimento normal, crescimento e diferenciação da UPS requerem a interação de andrógenos com vários outros fatores biológicos. Se o infundíbulo da UPS sofre progressiva oclusão, o sebo retido e as células provenientes da descamação normal da pele promovem a formação do microcomedão, que, embora clinicamente não visível, é o precursor de todas as lesões acnéicas, conforme o diagrama da comedogênese (Figura 1) (GOLLNICK, 2003).

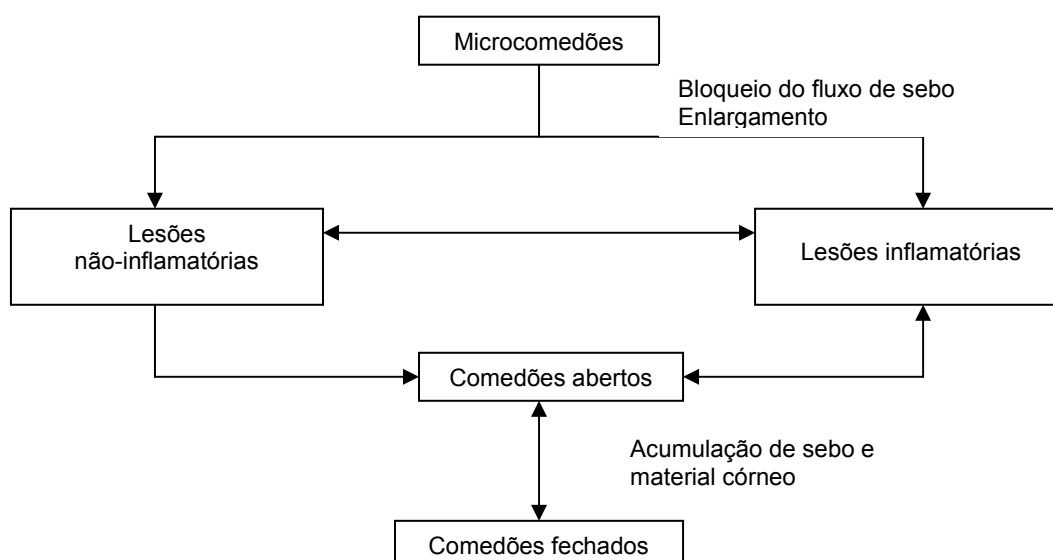


Figura 1: Diagrama esquemático da comedogênese

Fonte: GOLLNICK (2003)

O bloqueio do fluxo de sebo e o crescimento progressivo dos microcomedões originam comedões clinicamente visíveis (lesões não-inflamatórias). Os comedões podem ser abertos ou fechados. Os comedões abertos (*blackhead*) são ocupados com células de queratina descamadas e sebo e têm um orifício dilatado. Eles podem apresentar coloração escura

devido à melanina produzida pelas células epiteliais que revestem o infundíbulo. Comedões abertos podem se resolver espontaneamente ou desenvolver, para dentro da pele, lesões acnéicas inflamatórias. À medida que o sebo e as células vão se acumulando na UPS, o microcomedão aumenta de tamanho e se torna visível, formando o comedão fechado (*whitehead*). Com o contínuo acúmulo de sebo, o comedão fechado começa a distender-se, a cavidade folicular pode romper-se dentro do tecido adjacente, conduzindo à produção de lesões inflamatórias. Se o processo é superficial, forma-se uma pústula. Pápulas representam lesões inflamatórias dérmicas mais profundas e aparecem como eritematosas, conduzindo a lesões sólidas. Pequenos nódulos ou pseudocistos representam a forma mais severa da acne (GOLLNICK, 2003) (Figura 2).

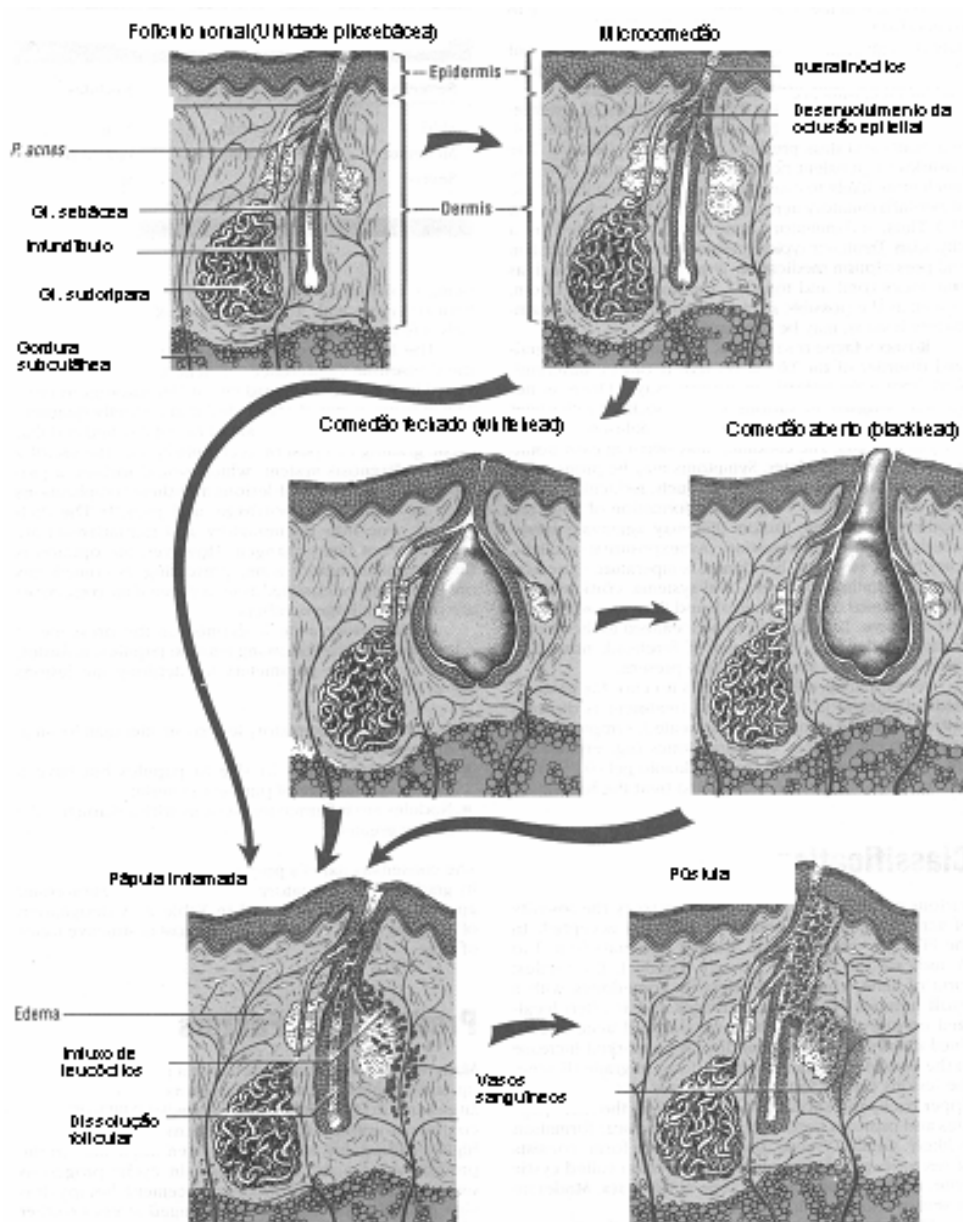


Figura 2: Representação esquemática da patogênese da acne

Fonte: Adaptado de BILLOW (1996)

A comedogênese ocorre devido ao acúmulo de corneócitos no ducto pilosebáceo. Isso pode ser devido à hiperproliferação de queratinócitos do ducto, à separação inadequada dos corneócitos do ducto ou à combinação de ambos os fatores (CUNLIFFE et al., 2003).

Acne freqüentemente inicia-se no período pré-adolescente, quando os andrógenos adrenais, liberados pela glândula adrenal em processo de amadurecimento, produzem um aumento na produção de sebo, uma secreção rica em lipídeos das glândulas sebáceas (FEDERMAN & KIRSNER, 2000). Indivíduos acometidos com acne têm maior produção de sebo do que indivíduos não acometidos. Além disso, a severidade da acne é geralmente proporcional à quantidade de produção de sebo (BROWN & SHALITA, 1998).

O folículo ocluído, rico em lipídeo, é um substrato ideal para proliferar a bactéria *Propionibacterium acnes*, anaeróbica, que é parte da flora normal da pele, mas está geralmente ausente na pele antes da puberdade. *P. acnes* está, geralmente, presente em maior quantidade em pacientes com acne (FEDERMAN & KIRSNER, 2000). Existe uma correlação entre a redução do *P. acnes* e uma melhora clínica da acne. Esta redução do *P. acnes* está associada a uma diminuição nos mediadores pró-inflamatórios no sítio da acne (GOLLNICK et al., 2003).

A associação da seborréia ao crescimento bacteriano propicia um processo inflamatório (GOLLNICK, 2003). Microorganismos *P. acnes* elaboram uma lipase que hidrolisa triglicérides do sebo em ácidos graxos livres e glicerol, que tem propriedades pró-inflamatórias e comedogênicas. *P. acnes* favorece a inflamação uma vez que ele libera o fator quimiotático, atraindo neutrófilos, linfócitos e macrófagos, que liberam enzimas lisossomais causando danos ou ruptura à parede folicular. A proliferação desta bactéria conduz à ativação do complemento e à liberação de proteases e enzimas hidrolíticas. A extensão dérmica do processo inflamatório, causada por ruptura do folículo, produz pápulas, pústulas, nódulos e cistos (FEDERMAN & KIRSNER, 2000). A permeabilidade alterada na parede folicular permite a liberação de antígenos bacterianos e de mediadores inflamatórios. É a resposta celular desses antígenos e mediadores que pode direcionar a transição das lesões de não-inflamatórias para inflamatórias (WEBSTER, 2005).

3 TRATAMENTO DA ACNE

A maioria dos especialistas no tratamento da acne concorda que a escolha dos agentes usados no tratamento envolve a integração de múltiplos fatores, tais como: severidade das

lesões presentes, duração da doença, resposta passada e presente à terapia e tendência à cicatrização e pigmentação pós-inflamatória. Uma grande faixa de tratamentos tópicos e sistêmicos está disponível, cobrindo todas as variantes da doença (LEYDEN, 2003).

Os objetivos terapêuticos são: reduzir a produção de sebo; reverter a hiperproliferação e normalizar a queratinização; eliminar os microcomedões e os comedões já existentes; reduzir a colonização por *Propionibacterium acnes* e a inflamação; prevenir o desenvolvimento de novos microcomedões e lesões inflamatórias; eliminar lesões acnéicas inflamatórias existentes (GOLLNICK, 2003). Vários fatores requerem consideração quando da seleção de um regime terapêutico, sendo que o mais relevante deles inclui a severidade da acne (TANGHETTI, 2005).

3.1 Tratamento sistêmico

A terapia sistêmica da acne é utilizada nas seguintes circunstâncias: falta de resposta à terapia tópica, intolerância às medicações tópicas, níveis severos da acne, acne desfigurante, acne com envolvimento do pescoço e tronco, áreas onde o tratamento tópico não é efetivo como o sistêmico. Os principais agentes farmacológicos utilizados no tratamento sistêmico da acne são: isotretinoína, antibióticos e hormônios (BROWN & SHALITA, 1998).

Antibióticos orais são altamente efetivos no tratamento da acne inflamatória. Neste grupo incluem as tetraciclinas (tetraciclina, minociclina, doxiciclina e limeciclina), eritromicina e clindamicina, tendo como alvo *P. acnes*. Alguns desses antibióticos parecem modular os efeitos inflamatórios induzidos por patógenos (WEBSTER, 2005). Devido ao seu baixo custo, tetraciclina é, freqüentemente, o antibiótico oral de escolha para a terapia inicial. O potencial desenvolvimento de resistência bacteriana é também problemático (LEYDEN, 2003). Evidências têm mostrado que ambos antibióticos orais e tópicos estão associados com resistência do *P. acnes* sobre a superfície da pele e narinas.

A isotretinoína oral (ácido 13-*cis*-retinóico) tem sido usada no tratamento de acne severa há mais de 35 anos e é indicada como terapia de primeira escolha para acne nodular severa. Isotretinoína oral exibe atividade contra todos os principais fatores etiológicos envolvendo a patogênese da acne, reduz significativamente a produção de sebo, normaliza a queratinização folicular, previne o desenvolvimento de microcomedões e comedões, inibe indiretamente o crescimento de *P. acnes* e exerce atividade antiinflamatória direta (THIELITZ et al., 2006; WEBSTER, 2005).

Os antiandrogênicos, como acetato de ciproterona, espironolactona, desogestrel e flutamida, agem por reduzir a produção de sebo induzida por androgênios e, conseqüentemente, reduz o número de comedões (WEBSTER, 2005). Um novo conceito promissor sobre a terapia tópica com antiandrogênicos é a inibição da 5- α -redutase. Esta enzima metaboliza testosterona à 5- α -dihidrotestosterona em tecidos regulados por androgênios. A principal limitação da terapia antiandrogênica é o fato óbvio de que ela não pode ser utilizada em pacientes do sexo feminino sob condições normais (KRAUTHEIM & GOLLNICK, 2004).

3.2 Tratamento tópico

A maioria dos pacientes apresenta acne leve a moderada. Em tais pacientes, a terapia tópica é a primeira linha de tratamento. Os agentes tópicos mais utilizados no tratamento da acne são os retinóides tópicos (tretinoína, isotretinoína, adapaleno, tazaroteno), os antibióticos tópicos (clindamicina e eritromicina), peróxido de benzoíla, ácido azeláico e outras terapias tópicas (antiandrogênios, *peeling* químico, fototerapia, tratamento físico e agentes queratolíticos) (KRAUTHEIM & GOLLNICK, 2004). Os agentes tópicos e suas respectivas atividades são descritos (Tabela 1) (GOLLNICK, 2003).

Tabela 1: Os agentes utilizados na terapia tópica da acne e suas respectivas atividades

Agentes/atividade	Comedolítico	Antimicrobiano	Antiinflamatório	Antiseborréico
Tretinoína	Forte	Fraca	Ausente	Ausente
Isotretinoína	Forte	Fraca	Fraca	Ausente
Adapaleno	Forte	Fraca	Moderada	Ausente
Tazaroteno	Forte	Fraca	Ausente	Ausente
Ácido azeláico	Moderada	Moderada	Fraca	Ausente
Peróxido de benzoíla	Fraca	Forte	Ausente	Ausente
Antibióticos	Fraca	Forte	Fraca	Ausente

Fonte: GOLLNICK (2003)

O peróxido de benzoíla é um agente seguro e eficaz no tratamento da acne e está disponível em concentrações que variam de 1 a 10%. Ele exerce seu efeito bacteriostático por suprimir o crescimento de *P. acnes*. Não existe evidência de resistência bacteriana adquirida. A aplicação tópica de peróxido de benzoíla tem mostrado uma melhora no tratamento de lesões inflamatórias e não-inflamatórias. Dermatite, *secura* e *peeling*, podem ser minimizados pela redução na dosagem ou na freqüência de aplicação (FEDERMAN & KIRSNER, 2000; WEBSTER, 2005).

O ácido azeláico, um ácido dicarboxílico de ocorrência natural, age inibindo a síntese do ácido desoxirribonucléico - DNA - dos queratinócitos (LEYDEN, 2003). Além de ser comedolítico, tem propriedade antibacteriana, inibe a proliferação melanocítica (FEDERMAN & KIRSNER, 2000), modifica a queratinização epidérmica e exerce atividade antiinflamatória (KRAUTHEIM & GOLLNICK, 2004). Contudo, a sua ação é dose-dependente e queimadura pode ocorrer a altas concentrações (LEYDEN, 2003).

Agentes antibacterianos podem ser bacteriostáticos ou bactericidas contra *P. acnes* e muitos demonstram efeitos antiinflamatórios. Além disso, diminuem a porcentagem de ácidos graxos livres em lípides de superfície. Clindamicina e eritromicina tópicas são os agentes mais comumente usados e efetivos em reduzir o número de pápulas e pústulas em pacientes com acne inflamatória. O uso contínuo de antibióticos tópicos pode induzir a cepas resistentes de *P. acnes* (FEDERMAN & KIRSNER, 2000).

Agentes queratolíticos têm sido substituídos por agentes antiacne mais novos, contudo, eles estão disponíveis, em menor custo, sendo: enxofre, resorcina e ácido salicílico. Eles manifestam seus benefícios por causar esfoliamento das células epiteliais no revestimento do folículo. Uma das desvantagens é o odor, algumas vezes associado com sulfeto de hidrogênio. Outras incluem descamação amarronzada devido à resorcina e salicilismo devido ao uso excessivo de salicilatos (FEDERMAN & KIRSNER, 2000).

Retinóides

Retinóides tópicos têm sido usados na terapia da acne desde 1962 e a primeira substância estudada foi a tretinoína (THIELITZ et al., 2006), tendo sido a principal terapia tópica de retinóides durante décadas (LEYDEN, 2003).

O termo retinóide foi usado muitos anos atrás para definir uma mistura de ambos componentes com atividade de Vitamina A (retinol), de ocorrência natural, e análogos sintéticos da vitamina A. Esta definição, baseada na estrutura molecular e na atividade biológica, contudo, tinha uma limitação clara. Alguns análogos sintéticos do retinol não possuíam atividade de vitamina A, enquanto alguns compostos sintéticos com nenhuma semelhança à vitamina A tinham atividades como vitamina A. Desta forma, uma relação entre a estrutura molecular de um retinóide e sua função não poderia ser harmonizada. Com a descoberta dos receptores nucleares de ácido retinóico (RARs) e receptores X retinóides (RXRs), uma definição unificada de retinóides poderia ser feita. Baseado no conhecimento

atual, retinóide pode ser definido como uma molécula que se liga e ativa RARs - por ele mesmo e através da conversão metabólica – por meio disso, obtendo ativação transcripcional de genes responsivos ao ácido retinóico. Contudo, fármacos com a habilidade de se ligarem a um receptor e aqueles com nenhuma similaridade química ao ácido retinóico podem ser considerados retinóides (KANG, 2006).

O mais abundante retinóide na pele humana é o retinol, um nutriente provido de pigmentos pró-vitamina de caroteno, presente em frutas e vegetais, ou como ésteres de retinol, presentes em alimentos de origem animal. *In vivo*, retinol é convertido nas formas aldeído e ácido, respectivamente, retinaldeído e ácido retinóico. As principais funções dessas pequenas moléculas hormonais são visão, reprodução e integridade epidérmica. A importância da vitamina A na pele normal foi primeiramente reconhecida em 1925, através da verificação da queratinização anormal em animais com deficiência em vitamina A. O primeiro estudo da vitamina A oral para tratamento da acne surgiu em 1943. Em 1969, o uso do ácido retinóico tópico foi descrito para acne. Após esta importante descoberta, o ácido retinóico tornou-se comercialmente disponível para tratamento da acne na década de 70 (BERSHAD, 2001).

Retinóides são importantes reguladores da diferenciação e proliferação epidérmica. Como moléculas lipofílicas, eles difundem através das membranas celulares, ligando-se a receptores nucleares e modulando a expressão de genes responsáveis pela diferenciação celular (SORG et al., 2006), normalizando a queratinização folicular e sinais pró-inflamatórios na UPS (JAIN, 2004).

Primeiramente, retinóides tópicos foram usados em pacientes com acne comedogênica (lesões não-inflamatórias). Contudo, retinóides tópicos também demonstraram atividade em acne inflamatória por efeitos imunomodulatórios diretos e por reverter o microcomedão, o precursor de ambas as lesões inflamatórias e não-inflamatórias (LEYDEN, 2003).

O mecanismo de ação dos retinóides é mediado pela ligação a receptores nucleares (GOLLNICK, 2003), sendo que dois principais tipos de receptores têm sido caracterizados: receptores de ácido retinóico (RARs) e receptores X retinóides (RXRs) (WEBSTER, 1998) e proteínas de ligação citosólicas. Cada família de receptor inclui três subtipos (α, β, γ) que induzem a expressão ou a regulação de genes-alvo (THIELITZ et al., 2006).

Os retinóides são classificados em não aromáticos (retinol, tretinoína e isotretinoína), monoaromáticos (etretinato e acitretina) e poliaromáticos (arotinóide, adapaleno e

tazaroteno) (MILLIKAN, 2000). Eles são divididos em três gerações. A primeira geração consiste do ácido *trans*-retinóico e do isômero *cis* (isotretinoína) e o ácido 9-*cis*-retinóico (alitretinoína), usado para Sarcoma de Kaposi. Membros da segunda geração são isômeros monoaromáticos do ácido retinóico, que incluem etretinato e acitretina, usados para psoríase. Os retinóides da terceira geração são isômeros poli-aromáticos do ácido retinóico, denominados arotinóides, que serviram como modelo para as últimas moléculas, incluindo os agentes tópicos para acne, adapaleno e tazaroteno (BERSHAD, 2001).

Ácido *trans*-retinóico (AR; vitamina A ácida; tretinoína) é a principal forma biologicamente ativa de ocorrência natural (YAMAGUCHI et al., 2005), sendo a forma ativa do produto metabólico da vitamina A (RIGOPOULOS et al., 2004). AR é um pó cristalino amarelo a laranja claro, praticamente insolúvel em água, solúvel em cloreto de metileno e acetona, fracamente solúvel em éter e levemente solúvel em álcool. É sensível ao ar, calor e luz, especialmente em solução e, por isso, deve ser armazenado em recipientes fechados, protegido da luz e sob atmosfera de nitrogênio (BP 2005). AR é ácido 3,7-dimetil-9-(2,6,6-trimetil-1-ciclohexen-1-il)-2,4,6,8-nonatetraenoíco (Figura 3), que apresenta Massa Molar de 300,4 g/mol (SWEETMAN, 2005).

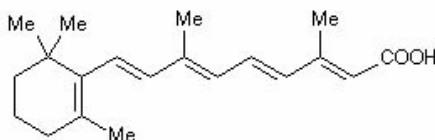


Figura 3: Estrutura química do ácido *trans*-retinóico

Fonte: BP 2005

Ácido retinóico é o agente comedolítico tópico mais efetivo disponível (BROWN & SHALITA, 1998). O AR tem demonstrado eficácia em distúrbios de queratinização e no tratamento de outras lesões cutâneas, quando aplicado topicamente (CONTRERAS et al., 2005). Não existe reação adversa sistêmica associada à aplicação tópica do AR. Apenas cerca de 1% do fármaco aplicado topicamente é absorvido, o que não é suficiente para alterar o nível de vitamina A no plasma. Portanto, as reações adversas da tretinoína são limitadas à pele (WEBSTER, 1998). A principal desvantagem da sua aplicação tópica é a irritação local, eritema, *peeling*, queimação e *secura* da pele. O AR também aumenta a sensibilidade da pele à radiação solar, sendo necessário o uso de protetores solares. O AR está disponível comercialmente em concentrações que variam de 0,025% a 0,1% nas formas farmacêuticas creme, gel e solução alcoólica (BROWN & SHALITA, 1998). Uma vez que os efeitos colaterais aumentam com a concentração do fármaco e a frequência de uso, a terapia tópica

deveria ser iniciada com uma dose baixa do AR e aumentada lentamente até a dose terapêutica máxima (NG et al., 2003).

Combinação de agentes pode aumentar a eficácia e diminuir os efeitos colaterais. Estratégias para aumentar a tolerabilidade aos retinóides incluem o uso de análogos de retinóides, como o adapaleno ou novos sistemas de liberação, tais como microesfera de tretinoína (WEBSTER, 2005). Formulações lipossomais de tretinoína, sistema microesfera de liberação da droga, além de outras formulações contendo poliolprepolímero 2 (PP-2), o qual auxilia na retenção do fármaco na superfície e nas camadas superiores da pele, estão sob investigação.

No sistema de microesfera disponível comercialmente (Retin-A[®] Micro; Ortho Dermatological, Raritan, NJ, EUA), a tretinoína encapsulada é gradualmente liberada dependendo do atrito, temperatura, pH e outros fatores. Esse sistema parece oferecer proteção contra a fotodegradação da tretinoína (KRAUTHEIM & GOLLNICK, 2004), além de ter demonstrado ser menos irritante e tão efetivo quanto formas disponíveis comercialmente (BROWN & SHALITA, 1998). Uma das vantagens da tretinoína microencapsulada é que essas partículas seletivamente se localizam nos folículos, onde a tretinoína é liberada ao longo do tempo, reduzindo a concentração do fármaco sobre a pele e, conseqüentemente, reduzindo a irritação (GOLLNICK et al., 2003). Comparativamente, gel contendo microesfera de ácido retinóico a 0,1% demonstrou menor toxicidade local que creme convencional de ácido retinóico na mesma concentração. Sendo assim, a formulação de microesfera pode ser tão efetiva e menos irritante que concentrações equivalentes do fármaco em um veículo convencional (WEBSTER, 1998).

Uma das mais promissoras inovações tem sido a incorporação de tretinoína em um veículo contendo poliolprepolímero 2. Esse material retém o fármaco sobre a pele. A incorporação de tretinoína em um veículo contendo poliolprepolímero 2 tem como objetivo prevenir uma absorção percutânea rápida e excessiva do fármaco, reduzindo irritação provocada pelos géis e cremes comercialmente disponíveis (QUIGLEY & BUCKS, 1998). Estudos recentes com o complexo ácido retinóico/ciclodextrina 0,025% demonstraram eficácia e tolerabilidade aumentadas, quando comparada a uma preparação convencional duas vezes mais concentrada (THIELTIZ et al., 2006). A tolerabilidade aumentada das novas formulações do ácido retinóico permitiu o uso desse agente como terapia de primeira linha em quase todas as formas da acne.

2ª PARTE - PELE

1 PELE

A pele humana é essencial à vida através da proteção do corpo à entrada de toxinas estranhas ao organismo e da função de conservação da água (ROBERTS, 1997). Além disso, a pele humana é uma barreira seletiva e efetiva à absorção de substâncias aplicadas sobre ela. Em geral, a epiderme, especificamente o estrato córneo, representa o principal elemento-controle da absorção de substâncias através da pele (BARRY, 2001; ROBERTS, 1997).

A pele é principalmente composta de epiderme (camada externa) e derme (interna). A derme contém capilares, glândulas sebáceas e sudoríparas, folículos pilosos e nervos; a epiderme é avascular, além de ter uma estrutura multilamelar que representa os diferentes estágios da diferenciação celular. Acima da camada basal, encontram-se os corneócitos, que são células queratinizadas, funcionalmente mortas, circundadas por lípidos, constituindo a camada mais externa da epiderme denominada estrato córneo (MOSER et al., 2001).

A função barreira da pele é principalmente atribuída ao estrato córneo. A camada córnea é formada pelos corneócitos, devido à apoptose de queratinócitos durante a passagem dessas células da camada basal da epiderme à superfície. Durante esse processo, as células degradam fosfolípidos e sintetizam ceramidas que são secretadas dentro do espaço intercelular, onde, juntamente com colesterol, ácidos graxos livres de cadeia longa e sulfato de colestera, formam camadas lipídicas altamente ordenadas (SHAFER-KORTING et al., 2007). Desta forma, os lípidos do estrato córneo formam bicamadas circundando os corneócitos, formando uma estrutura rígida e compacta (MOSER et al., 2001). Essa barreira formada é essencialmente lipofílica. Por essa razão, moléculas lipofílicas são aceitas mais facilmente pelo estrato córneo. Idealmente, um fármaco deve possuir ambas solubilidades em lípidos e em água. Se ele for muito hidrofílico não será capaz de penetrar no estrato córneo e se for muito lipofílico tenderá a permanecer no estrato córneo (NAIK et al., 2000).

1.1 Barreira epidérmica na acne

Desordens básicas e o uso de muitos tratamentos tópicos para a acne são associados com um prejuízo da barreira epidérmica. Deficiência de ácido linoléico, que tem sido implicado na

patofisiologia da acne, pode prejudicar a função barreira. Sob circunstâncias normais, o ácido linoléico é incorporado em esfingolipídeos, que participam da formação de unidades de membranas unicelulares lamelares entre os queratinócitos. Em pacientes com pele seca, medicamentos tópicos usados para acne podem atingir a camada epitelial através de microfissuras na pele, onde eles podem causar irritação e inflamação (DEL ROSSO, 2005).

A escolha do veículo é importante quando for estabelecido um regime terapêutico. Formulações que produzam umedecimento, através do uso de umectante e emoliente, são ideais para o tratamento da acne, porque o prejuízo à barreira epidérmica é minimizado (DEL ROSSO, 2005).

2 ABSORÇÃO PERCUTÂNEA

A permeação de fármacos através da pele inclui a difusão através da epiderme intacta e através dos apêndices da pele, que formam desvios na epiderme. Dois caminhos de permeação através da barreira intacta podem ser identificados: a rota intercelular lipídica, entre os corneócitos, e a rota transcelular, através dos corneócitos e lípidos intercelulares (Figura 4) (MOSER et al., 2001).

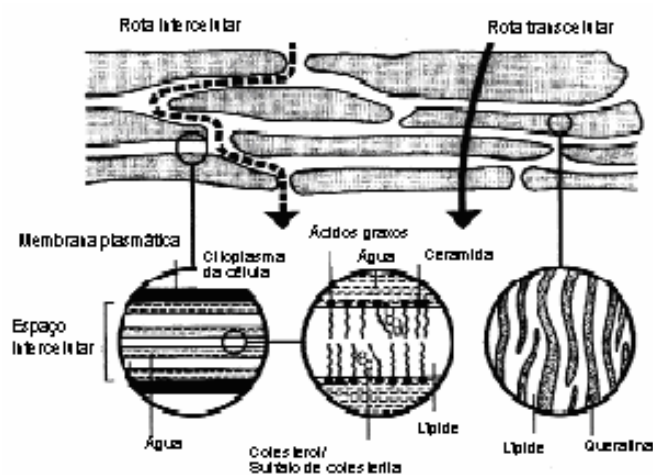


Figura 4: Diagrama simplificado do estrato córneo e de duas microrrotas de penetração de fármacos (1) via matriz lipídica entre os corneócitos (rota intercelular) e (2) através dos corneócitos e matriz lipídica intercelular (rota transcelular)

Fonte: Adaptado de BARRY (2001)

A unidade pilosebácea (folículo piloso, glândula sebácea e infundíbulo) proporciona uma outra rota de permeação que atravessa o estrato córneo intacto, o que representa um alvo

para a liberação de fármacos (BARRY, 2001). Essa rota de penetração folicular está demonstrada na Figura 5.

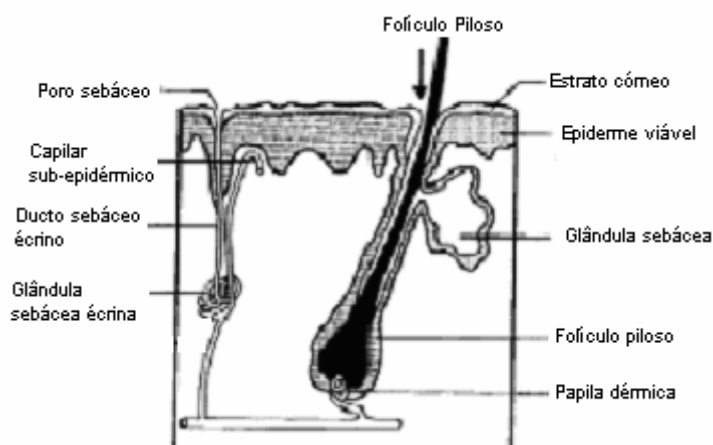


Figura 5: Diagrama simplificado da estrutura da pele e rota folicular (UPS) de penetração de fármacos

Fonte: Adaptado de BARRY (2001)

A penetração passiva do fármaco através da pele ocorre predominantemente via rota intercelular e envolve a difusão de moléculas através da matriz lipídica entre os corneócitos. A rota via folículos pilosos também contribui para a penetração percutânea. Contudo, considerando que esses apêndices ocupam somente aproximadamente 0,1% do total da superfície da pele, sua contribuição para a penetração de formulações convencionais tópicas é freqüentemente considerada desprezível. Entretanto, quando consideramos o transporte cutâneo de formulações particuladas, a rota via apêndices pode exercer uma significativa função (ALVAREZ-ROMÁN et al., 2004a), uma vez que essa rota denominada unidade pilosebácea (folículo piloso, glândula sebácea e infundíbulo), atravessa o estrato córneo intacto, representando um alvo para a liberação de fármacos (BARRY, 2001).

A liberação de fármacos na pele necessita reconhecer dois termos paradoxais: primeiramente, a principal barreira à permeação, formada pelo estrato córneo, necessita ser superada para liberação de fármacos na pele (absorção na pele) e, secundariamente, a deposição de fármaco dentro da pele poderia ser idealmente acompanhada por uma absorção percutânea restrita (LBOUTOUNNE et al., 2004).

A baixa penetração de fármacos na pele e através do estrato córneo freqüentemente limita a eficácia das formulações tópicas. Basicamente, a penetração na pele pode ser aumentada pelas seguintes estratégias: (1) aumentando a difusibilidade do fármaco na pele, (2)

aumentando a solubilidade do fármaco na pele e (3) aumentando o grau de saturação do fármaco na formulação (MOSER et al., 2001).

Desde que o uso de aceleradores químicos, tais como surfactantes e solventes orgânicos induzem irritação, causam danos e reduzem a função barreira da pele, é desejável liberar agentes terapêuticos que mantêm a função barreira normal sem o auxílio de aceleradores químicos. Micelas, lipossomas, nanoemulsões, nanopartículas lipídicas sólidas (NLS), nanoesferas e nanocápsulas são carreadores de liberação que têm sido desenvolvidos para aumentar a absorção percutânea de agentes terapêuticos, assim como para evitar danos à função barreira da pele (SHIM et al., 2004). Carreadores coloidais de fármacos, incluindo emulsões submicrônicas, nanoesferas, nanocápsulas, lipossomas e complexos lipídicos, têm sido alvo de grande interesse nos últimos anos, como veículos para administração tópica de fármacos lipofílicos (JIMENEZ et al., 2004; ALVAREZ-ROMÁN et al., 2001).

3ª PARTE – SISTEMAS POLIMÉRICOS: NANOCÁPSULAS

1 SISTEMAS POLIMÉRICOS

Há várias décadas, fármacos utilizados nos mais variados tratamentos são administrados em sistemas convencionais de liberação. Em sua maioria, os esquemas terapêuticos, empregando os sistemas convencionais, requerem muitas administrações por longo período de tempo, para manter os níveis terapêuticos do fármaco no organismo. Algumas vezes, tais níveis não são alcançados, ou seja, o tratamento não exibe resposta farmacológica ou apresenta exacerbação dos efeitos adversos (CHIEN, 1994).

Visando otimizar a resposta farmacológica, estudos vêm sendo realizados no intuito de controlar a ação de fármacos por meio de modificações químicas no fármaco (pró-fármaco) ou por meio de uma formulação capaz de controlar sua liberação (JAIN et al., 1998).

Nos últimos 20 anos, nanocarreadores para liberação de fármacos têm sido extensivamente estudados no campo da nanotecnologia farmacêutica. Alguns nanocarreadores promissores são lipossomas, nanopartículas lipídicas sólidas, micelas poliméricas e nanopartículas poliméricas (JÄGER et al., 2007).

Os sistemas coloidais podem ser usados para liberar fármacos em alvos específicos, aumentar a biodisponibilidade, sustentar o efeito do fármaco no tecido alvo, solubilizar fármacos e aumentar a estabilidade de agentes terapêuticos contra a degradação enzimática ou fotodegradação (ABDELWAHED et al., 2006a).

Algumas vantagens dos nanocarreadores incluem: (1) manutenção dos níveis do fármaco na faixa terapêuticamente desejável; (2) diminuição dos efeitos colaterais, devido à liberação do fármaco no alvo; (3) redução da dose necessária ao tratamento; (4) melhora do esquema posológico, o que leva a maior colaboração do paciente; (5) facilitação da administração de fármacos com meia-vida plasmática baixa. Essas vantagens devem ser avaliadas contra os seguintes interesses no desenvolvimento de cada sistema: (1) toxicidade dos materiais, ou seus produtos de degradação, dos quais o fármaco é liberado ou outros parâmetros de segurança, tais como liberação rápida não desejável do fármaco (dose de ataque); (2) desconforto causado pelo próprio sistema; (3) custo do sistema devido aos materiais de encapsulação do fármaco ou processo de obtenção (LANGER, 1998).

Esses sistemas poliméricos possibilitam a inclusão ou encapsulação de fármacos, isolando-os por meio de uma barreira física, formada por um polímero, que, em contato com fluidos biológicos, irá se dissolver, desintegrar ou sofrer o processo de degradação, liberando, assim, a forma ativa e tornando-a disponível.

Existem três mecanismos gerais pelos quais os fármacos são liberados do polímero: (1) difusão de espécies do fármaco do sistema e através dele; (2) uma reação química ou enzimática, permitindo a degradação do sistema ou clivagem do fármaco do sistema; (3) ativação do solvente, também através da osmose ou inchaço do sistema. Uma combinação dos mecanismos é possível (LANGER, 1998).

Embora uma grande variedade de polímeros biodegradáveis naturais e sintéticos tenha sido investigada para dirigir um fármaco ao sítio de ação e liberar o fármaco de forma controlada, poucos preenchem os pré-requisitos de biocompatibilidade. Entre os polímeros naturais estão as albuminas bovina e humana, colágeno, gelatina e hemoglobina. O uso desses polímeros tem sido limitado por apresentarem pureza questionável e alto custo. Esta restrição, por outro lado, favoreceu a expansão da utilização dos polímeros sintéticos, que não apresentam a maioria dos problemas associados aos polímeros de origem natural. Os polímeros sintéticos podem ser exemplificados pelas poliamidas, poliaminoácidos, polialquilcianoacrilatos, poliésteres, poliortoésteres, poliuretanos e poliacrilamidas. Entre esses, têm se destacado os poliésteres de cadeia alifática como poli-lático (PLA), poliglicólico (PGA), os copolímeros do ácido lático e glicólico (PLGA) e poli- ϵ -caprolactona (PCL) (JAIN et al., 1998). Os poliésteres têm sido os mais utilizados devido às suas propriedades de biocompatibilidade e biodegradabilidade (ABDELWAHED et al., 2006b).

O polímero empregado na preparação desses sistemas carreadores de fármacos deve apresentar características de inocuidade, biocompatibilidade, estabilidade, facilidade de processamento e cinética de biodegradação adequada, não se acumulando indefinidamente nos tecidos (LIMA, 1998).

O principal obstáculo que limita o uso das nanopartículas é a instabilidade física (agregação e fusão da partícula) e ou a instabilidade química (hidrólise dos materiais poliméricos que formam as nanopartículas), ligação do fármaco às nanopartículas e reatividade química durante o armazenamento, que são freqüentemente relatados quando essas suspensões aquosas de nanopartículas são armazenadas por longos períodos (ABDELWAHED et al., 2006b).

1.1 Propriedades físicas, químicas e biológicas do polímero Poli-ε-caprolactona

A poli-ε-caprolactona (Figura 6) é um polímero semicristalino, apresentando ponto de fusão entre 59 e 64°C, dependendo do tamanho do cristal, e temperatura de transição vítrea de -70°C a -60°C, a qual pode variar sistematicamente pela copolimerização. É solúvel, à temperatura ambiente, em tetrahidrofurano, clorofórmio, cloreto de metileno, tetracloreto de carbono; pouco solúvel em acetona, 2-butanona, acetato de etila, acetonitrila e dimetilformamida; insolúvel em álcoois, éter de petróleo e éter de dietila (PIRES, 1998).

A cristalinidade da caprolactona varia com sua massa molar. Para massas molares superiores a 100.000, a cristalinidade é de cerca de 40%, chegando a 80% quando a massa molar diminui até 5.000. A cristalinidade é um importante fator na determinação da permeabilidade e da biodegradabilidade, pelo fato da fase cristalina ser inacessível à água e a outros solventes. Por isso, uma alta cristalinidade reduz a permeabilidade, tanto por reduzir a solubilidade do soluto, quanto por aumentar a tortuosidade da rota difusional (PIRES, 1998).

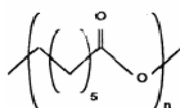


Figura 6: Estrutura química da poli-ε-caprolactona

Fonte: CHANDRA & RUSTGI (1998)

Poli-ε-caprolactona hidrolisa a velocidades muito baixas, podendo ser acelerada pela copolimerização com outros monômeros, tais como ácido lático (MERKLI et al., 1998).

A poli-ε-caprolactona é preparada pela polimerização da abertura de anel da lactona correspondente através de um radical livre aniônico, catiônico ou polimerização coordenada. A hidrólise da poli-ε-caprolactona produz ácido ε-hidróxicapróico, pela clivagem das cadeias poliméricas na ligação éster (Figura 7). Esta clivagem randômica das cadeias poliméricas produz uma diminuição inicial da massa molar, sem significativa perda de peso. Quando a massa molar média atinge cerca de 5.000, a perda de peso inicia-se devido à difusão de pequenos fragmentos da matriz polimérica (MERKLI et al., 1998).

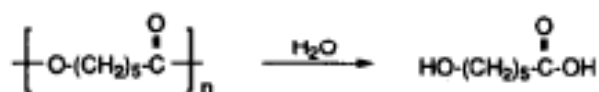


Figura 7: Mecanismo de hidrólise da poli-ε-caprolactona

Fonte: MERKLI e colaboradores (1998)

2 NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS

As nanopartículas poliméricas são sistemas carreadores de fármacos que apresentam diâmetro inferior a 1 μm . O termo nanopartícula inclui as nanocápsulas e as nanoesferas, as quais diferem entre si segundo a composição e organização estrutural (SCHAFFAZICK et al., 2003).

Nanocápsulas são carreadores nanoparticulados submicrônicos compostos de um núcleo oleoso circundado por uma parede polimérica com surfactantes lipofílicos ou hidrofílicos na interface (Figura 8 – a; b) (LEGRAND et al., 1999).

As nanoesferas, que não apresentam óleo em sua composição, são formadas por uma matriz polimérica, onde o fármaco pode ficar retido ou adsorvido (Figura 8 – c; d) (SCHAFFAZICK et al., 2003).

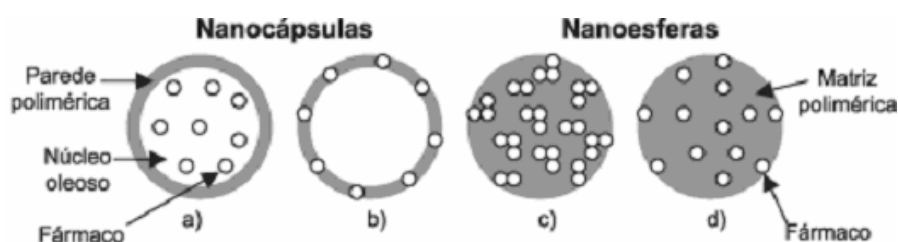


Figura 8: Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas: (a) fármaco dissolvido no núcleo oleoso das nanocápsulas; (b) fármaco adsorvido à parede polimérica das nanocápsulas; (c) fármaco retido na matriz polimérica das nanoesferas; (d) fármaco adsorvido ou disperso molecularmente na matriz polimérica das nanoesferas

Fonte: SCHAFFAZICK e colaboradores (2003)

Nanocápsulas apresentam uma característica ímpar de ser um sistema sólido vesicular. A parede polimérica confere à nanocápsula muito mais estabilidade que nanoemulsões e lipossomas, onde o núcleo interno tem uma grande capacidade carreadora de acordo com a solubilidade do fármaco no núcleo (COUVREUR et al., 1996). Uma das vantagens das nanocápsulas sobre as nanoesferas é o baixo conteúdo polimérico e a elevada capacidade de carregamento de fármacos lipofílicos, como o AR, devido ao núcleo oleoso interno (BLOUZA et al., 2006).

Outras vantagens de confinar o fármaco dentro de uma cavidade central é que um efeito de explosão pode ser evitado, pois o fármaco não está em contato direto com tecidos e, por

essa razão, irritação no sítio de administração será reduzida, e o fármaco pode ser protegido de degradação durante o armazenamento e após administração (BLOUZA et al., 2006).

O principal obstáculo que limita o uso de tais vetores é a instabilidade em meio aquoso. Agregação e fusão das partículas são freqüentemente verificadas após um longo período de armazenamento (ABDELWAHED et al., 2006c). Além disso, essas suspensões apresentam outras desvantagens durante o armazenamento, tais como contaminação microbiológica e hidrólise polimérica não-enzimática (TEWA-TAGNE et al., 2007).

Surfactantes lipofílicos e hidrofílicos são usados na preparação de nanocápsulas. Geralmente, o surfactante lipofílico é a lecitina de elevada pureza, enquanto o surfactante hidrofílico é sintético: aniônico (laurilsulfato), catiônico (quaternário de amônio), ou, mais comumente, não-iônico (polioxietileno-polioxipropilenoglicol) (LEGRAND et al., 1999).

Como fase oleosa da nanocápsula, óleos de origem vegetal ou semi-sintética, como triglicerídeos de cadeia média (TCM) e longa (TCL) têm sido amplamente utilizados. Os TCM são obtidos da hidrólise do óleo de côco e fracionados em ácidos graxos livres, contendo de 6 a 12 átomos de carbono, sendo esses ácidos graxos esterificados com o glicerol. Os TCM apresentam a vantagem de serem até 100 vezes mais solúveis em água que os TCL (WADE & WELLER, 2000).

Podem ser utilizados antioxidantes de fase oleosa, como butilhidróxitolueno (BHT; log *P* 4,17–5,80) e agente quelante, como ácido etilendiaminotetracético sal dissódico (EDTA sal dissódico), em concentrações de 0,01 a 0,1% p/v (WADE & WELLER, 2000).

Os polímeros utilizados na encapsulação consistem, geralmente, de materiais biocompatíveis e biodegradáveis, como a poli- ϵ -caprolactona. Ela tem sido estudada como matriz em sistemas de liberação controlada de fármacos. Sua degradação *in vivo* é lenta, sendo adequada para liberação controlada, com tempo de meia vida de 1 a 2 anos (CHANDRA & RUSTGI, 1998). A biodegradação de nanopartículas é essencial para reduzir o risco de danos ao tecido devido ao sobrecarregamento celular polimérico, resultando em citotoxicidade. Contudo, biodegradação não deve ser tão rápida, senão as nanopartículas degradarão antes de alcançar o sítio de ação desejado (MAGENHEIM & BENITA, 1991).

3 PREPARAÇÃO DAS NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS

Para a preparação de nanocápsulas, de acordo com Legrand e colaboradores (1999), são descritas duas principais técnicas: (1) técnica de emulsificação e difusão e (2) processo de deposição interfacial, seguido de deslocamento do solvente. Este último pode se classificado em duas principais categorias: se requerem a formação de nanopartículas a partir de uma reação de polimerização *in situ* ou se são conseguidos diretamente a partir de uma macromolécula ou um polímero pré-formado, tais poli- ϵ -caprolactona (PCL) (COUVREUR et al., 1996; SCHAFFAZICK et al., 2003).

A técnica da emulsificação e difusão é baseada na formação inicial de uma emulsão óleo/água (O/A) contendo óleo, polímero e fármaco no solvente orgânico, em uma solução aquosa contendo um agente estabilizante. O solvente orgânico é deslocado para dentro da fase externa pela adição de um excesso de água. Este método apresenta vantagens, como: pequena quantidade de solvente, simplicidade, controle do tamanho das nanocápsulas obtidas (de 80 a 900 nm), controle da espessura da parede polimérica pelo aumento da concentração do polímero e a possibilidade de se preparar nanocápsulas com um núcleo interno aquoso: contudo, uma grande quantidade de água tem que ser removida por evaporação se o solvente orgânico for altamente miscível em água (LEGRAND et al., 1999; LBOUTOUNNE et al., 2002, 2004; ALVAREZ-ROMÁN et al., 2004b).

Os processos de deposição interfacial, seguido de deslocamento do solvente, são baseados em um polímero pré-formado ou em monômeros que se polimerizam na interface óleo / água. Em ambos os casos, o processo consiste em misturar uma fase orgânica miscível em água, tais como álcool ou acetona, contendo óleo (com ou sem surfactante lipofílico) com uma fase aquosa contendo um surfactante hidrofílico. Após adição da fase orgânica à fase aquosa, sob agitação moderada, o solvente orgânico difunde para a fase aquosa e o polímero é depositado na interface óleo/água (LETCHFORD & BURT, 2007). No segundo caso, monômeros de alquilcianoacrilatos são solubilizados em etanol e óleo, então dispersados em água acidificada contendo surfactantes. Polimerização aniônica do cianoacrilato na fase oleosa é iniciada na interface por nucleófilos, tais como íons hidroxila na fase aquosa, levando à formação das nanocápsulas (LEGRAND et al., 1999).

O fator mais importante que conduz à estrutura das nanocápsulas é a difusão do solvente orgânico, com uma completa miscibilidade da fase orgânica na fase aquosa e uma insolubilidade do polímero em ambas as fases oleosa e aquosa. A preparação das nanocápsulas pelo método da deposição interfacial do polímero pré-formado é uma técnica

simples, reprodutível e aplicável a muitos polímeros (LEGRAND et al., 1999). De fato, nanopartículas podem ser preparadas facilmente por simples dispersão de uma fase orgânica não-tóxica em uma fase aquosa sem purificação adicional e com um elevado rendimento de encapsulação para substâncias lipofílicas (MOSQUEIRA et al., 2000).

Quando o método de deslocamento do solvente é usado para obter nanocápsulas, gotas de óleo submicrônicas são formadas e estabilizadas por uma camada de polímero, que produz uma barreira mecânica à coalescência. Durante o processo de fabricação, após a injeção da fase orgânica na fase aquosa, uma rápida difusão interfacial é observada como resultado da mútua difusão entre os solventes, que produz energia para a formação da gota oleosa. Esta instabilidade mecânica é causada pelas variações locais na tensão interfacial que pode arrancar o óleo de dentro da fase aquosa. Uma vez que a difusão do solvente é completada, o polímero agrega ao redor da gota de óleo. A velocidade de difusão depende das propriedades físicas da fase oleosa, tais como viscosidade e tensão interfacial (MOSQUEIRA et al., 2000).

Um dos mais importantes problemas na nanoencapsulação de fármacos muito hidrofóbicos é a migração deles durante a precipitação polimérica para o meio aquoso externo, formando um núcleo de cristalização. Esses nanocristais serão detectáveis somente quando eles crescerem durante o armazenamento. Este problema pode ser eventualmente solucionado aumentando a quantidade de polímero ou modificando o meio aquoso (ALONSO, 1996).

Obviamente, parâmetros de processo, tais como pH, concentração do monômero ou do polímero pré-formado, estabilizantes, força iônica e adição de outros excipientes podem, profundamente, afetar as propriedades físico-químicas das nanopartículas formadas (MAGENHEIM & BENITA, 1991).

Fármacos lipofílicos, que tem alguma solubilidade na matriz polimérica (nanoesferas) ou no núcleo oleoso (nanocápsulas), são mais facilmente incorporados que compostos hidrofílicos, embora esses últimos possam ser adsorvidos na superfície da partícula (BARRATT, 2003).

Com o objetivo de se verificar a composição química da interface partícula/água das nanocápsulas a nível molecular, em um estudo realizado por Jäger e colaboradores (2007), polímeros fluorescentes (corante quimicamente ligado) e corante benzazol (corante encapsulado, capaz de distinguir o meio ambiente apolar e polar/prótico) foram usados para preparar novas formulações. A organização da nanocápsula a nível molecular foi proposta: os estudos de fluorescência mostraram que os polímeros formam uma parede na interface

óleo/água, interagindo com óleo e água a nível molecular. Estudos de estabilidade mostraram que a água interage com o polímero em função do tempo, porque a hidrólise do grupo carboxilato polimérico é dependente da presença de água. Esta hidrólise produz grupos carboxílicos, que são responsáveis pela diminuição do pH, devido à ionização e, conseqüente, liberação de prótons no meio externo.

4 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS

Em função de sua natureza coloidal e da complexidade dos constituintes que compõem as formulações das nanocápsulas, a caracterização dessas nanoestruturas é, tecnicamente, complexa de ser realizada. Geralmente, após a preparação, a avaliação físico-química envolve: distribuição do tamanho das partículas, determinação do potencial zeta (ζ) ou carga superficial das partículas, determinação do pH, determinação da concentração do fármaco associado às nanopartículas, cinética de liberação do fármaco a partir das nanocápsulas e estabilidade em função do tempo de armazenamento (LEGRAND et al., 1999; SCHAFFAZICK et al., 2003).

A avaliação do tamanho das nanocápsulas é realizada através da difração do raio laser monocromático (Nanosizer). O Potencial Zeta, técnica mais freqüentemente utilizada para caracterizar a superfície das nanocápsulas, reflete o potencial de superfície elétrica das partículas. O Teor de encapsulação está geralmente relacionado à solubilidade do fármaco no núcleo interno oleoso. Técnicas de Ultrafiltração/centrifugação ou Ultrafiltração a pressão reduzida têm sido utilizadas para separar o fármaco encapsulado do não-encapsulado para se obter o Teor de Encapsulação (LEGRAND et al., 1999).

4.1 Distribuição do tamanho das nanocápsulas poliméricas

A distribuição do tamanho (diâmetro) das partículas é uma das mais importantes características físico-químicas das suspensões coloidais, uma vez que a tendência à sedimentação das partículas contendo o fármaco, bem como estudos de sua estabilidade podem ser monitorados através das mudanças no diâmetro das partículas (MAGENHEIM & BENITA, 1991; MÜLLER-GOYMANN, 2004).

Geralmente, o diâmetro das nanocápsulas preparadas pela técnica da nanoprecipitação, varia entre 100 e 500 nm, sendo influenciado por diversos fatores tais como: natureza e

concentração do polímero e do fármaco, concentração de surfactantes, proporção entre solvente e água, concentração do óleo, além da velocidade de difusão da fase orgânica na fase aquosa (LEGRAND et al., 1999).

Vários outros estudos têm sido desenvolvidos para a avaliação dos principais fatores que afetam o diâmetro das partículas de sistemas nanoestruturados. A composição qualitativa e o método de preparação das nanopartículas são fatores determinantes do diâmetro médio e da polidispersão das partículas. No caso das nanocápsulas, um fator importante, que influencia o diâmetro das partículas, é a natureza do óleo utilizado como núcleo. Os resultados são atribuídos às diferenças de viscosidade, hidrofobicidade ou tensão interfacial das substâncias empregadas (SCHAFFAZICK et al., 2003).

O diâmetro das gotas de óleo formadas durante a difusão parece ser determinado pelas mudanças locais na tensão interfacial durante a formação da nanocápsula, como em um processo de emulsificação. Quanto menor a tensão interfacial do óleo, menor o tamanho da nanocápsula. A viscosidade inicial da fase oleosa é outro fator que poderia influenciar o diâmetro médio das nanocápsulas (MOSQUEIRA et al., 2000).

Outra observação relevante é que a adição de monômero à emulsão (método de polimerização interfacial) ou, ainda, a presença do polímero (método de deposição interfacial de polímero pré-formado) pode conduzir à diminuição de tamanho da partícula em relação à emulsão, devido, provavelmente, à redução da energia livre interfacial do sistema, no primeiro caso, ou mediante um efeito estabilizador do polímero ao redor das gotículas, no segundo (SCHAFFAZICK et al., 2003).

De uma forma geral, as nanopartículas obtidas através de diferentes métodos, após a preparação, apresentam uma distribuição unimodal, com um baixo índice de polidispersão. Os métodos usuais para a determinação da distribuição de tamanho das nanopartículas consistem em Espectroscopia de Correlação de Fótons e Microscopia Eletrônica de Varredura ou Microscopia Eletrônica de Transmissão. Dependendo da formulação, podem ser verificadas diferenças de tamanho de partículas, conforme o método empregado na sua determinação, uma vez que a Microscopia Eletrônica fornece uma imagem da partícula isolada do meio, enquanto a Espectroscopia de Correlação de Fótons possibilita a determinação do raio hidrodinâmico das partículas em suspensão (SCHAFFAZICK et al., 2003). O método da Espectroscopia de Correlação de Fótons mede o movimento Browniano das partículas e constitui um procedimento adequado para a determinação da distribuição de tamanho das partículas. As principais vantagens desta técnica não invasiva incluem a

eficiência e ausência de preparo prévio da amostra para análise, tais como isolamento ou secagem. É necessária somente uma diluição adequada em água pura. Contudo, uma vez que as determinações são baseadas no movimento Browniano, as condições do meio suspensor, como, por exemplo, surfactantes adsorvidos, podem afetar as determinações do tamanho da partícula (ALONSO, 1996).

4.2 Potencial Zeta (ζ) das nanocápsulas poliméricas

Medida do Potencial Zeta é a técnica mais freqüentemente usada para caracterizar a superfície das nanocápsulas (LEGRAND et al., 1999).

O Potencial Zeta, que reflete o potencial elétrico da superfície das partículas, é influenciado pelas mudanças na interface com o meio dispersante, em razão da dissociação de grupos funcionais na superfície da partícula ou da adsorção de espécies iônicas presentes no meio aquoso de dispersão (SCHAFFAZICK et al., 2003). Uma carga negativa produzida pelos grupos carboxila do polímero pode ter uma função na superfície da nanocápsula. Neste caso, um polímero de maior massa molar tem uma influência menor sobre a carga da superfície para polímero de menor massa, devido ao menor número de grupamentos terminais (MOSQUEIRA et al., 2000).

A natureza e a intensidade da carga superficial dos carreadores de fármacos nanoparticulados é muito importante, porque ela determina a interação deles com o meio ambiente biológico, tão bem como as interações eletrostáticas com compostos bioativos (ALONSO, 1996). Uma carga superficial relativamente alta comumente explica a boa estabilidade da suspensão coloidal, pois grandes forças repulsivas previnem a agregação e colisões ao acaso de nanopartículas adjacentes (MAGENHEIM & BENITA, 1991).

Os fosfolipídeos (lecitinas) e os polímeros constituintes das nanopartículas são os principais componentes presentes nas formulações capazes de influenciar o potencial zeta. Especialmente os poliésteres, como o PLA, e as lecitinas fornecem um potencial negativo à interface. Em módulo, um valor de potencial zeta relativamente alto é importante para uma boa estabilidade físico-química da suspensão coloidal, pois grandes forças repulsivas tendem a evitar a agregação em função das colisões ocasionais de nanopartículas adjacentes (SCHAFFAZICK et al., 2003).

4.3 Teor de Encapsulação

O Teor de Encapsulação visa determinar a concentração do fármaco associado intimamente à nanopartícula em relação ao total de fármaco adicionado à preparação. Portanto, esse teor é calculado pela diferença entre a quantidade total de fármaco na suspensão e o fármaco presente no meio externo aquoso. Segundo Legrand e colaboradores (1999) o Teor de Encapsulação está relacionado à solubilidade do fármaco no núcleo oleoso interno.

A avaliação do conteúdo do fármaco nas nanopartículas é uma tarefa especialmente complicada, desde que a separação dos fármacos livres dos incorporados é difícil pela natureza coloidal do sistema carreador. A técnica de separação mais utilizada é a Ultracentrifugação. Invariavelmente, o fármaco livre é determinado no sobrenadante. O fármaco total é, geralmente, medido por completa dissolução da suspensão de nanopartículas em um solvente apropriado. Em todas as técnicas de separação descritas, é assumido que o fármaco livre é completamente dissolvido. Contudo, esta hipótese não é sempre verificada, uma vez que parte do fármaco livre pode estar na forma de nanocristais. Contudo, a técnica de separação por Ultracentrifugação pode induzir a uma interpretação errônea nos casos onde os nanocristais do fármaco estão presentes no sedimento juntamente com as nanopartículas (MAGENHEIM & BENITA, 1991).

4.4 Morfologia externa das nanocápsulas poliméricas

A Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) é a técnica mais utilizada para avaliação morfológica e estrutural das nanocápsulas (SCHAFFAZICK et al., 2003). A associação dessa técnica à criofratura tem fornecido informações úteis sobre a estrutura das nanocápsulas. Estudo recente realizado por Rube e colaboradores (2005) demonstrou que a técnica de espalhamento de nêutrons a baixo ângulo fornece informações importantes sobre a espessura da parede polimérica, cujo valor estimado foi de 17 nm, permitindo elucidar e comprovar o modelo reservatório proposto para as nanocápsulas. Entretanto, nos últimos anos, a Microscopia de Força Atômica (MFA) tem sido uma ferramenta muito utilizada na caracterização de nanosistemas, principalmente lipossomas e nanoesferas. A MFA fornece informações com alta resolução em três dimensões, em escala nanométrica sendo capaz ainda de resolver detalhes de superfície a nível atômico (LEITE, 2006).

A MFA tem, como princípio básico, a força de interação entre a sonda utilizada e a amostra, fornecendo importantes informações tais como organização estrutural e distribuição de

diâmetro. À medida que uma sonda extremamente fina, montada sob a extremidade de uma alavanca, se aproxima da superfície de uma amostra, forças de interação sonda-amostra surgem, as quais fazem a alavanca defletir. Essa deflexão é detectada por um sistema laser-fotodetector e todo o sistema monitorado digitalmente, convertendo os dados em um mapa topográfico da superfície da amostra. Forças de interação sonda-amostra, atrativas ou repulsivas, tão pequenas como nano-Newtons podem ser medidas. A longas distâncias essa interação praticamente não existe. À medida que a sonda se aproxima da amostra, forças atrativas de Van der Waals passam a atuar, aumentando com a aproximação da sonda até que a separação seja de ordem interatômica. Nesse ponto, surgem forças eletrostáticas repulsivas sugerindo contato físico entre a sonda e a superfície da amostra. A interação real entre sonda e amostra tem caráter mais complexo; porém, as características básicas da interação são as mesmas: atração à longa distância e repulsão em distâncias menores (LEITE, 2006).

Baseado nessas forças interativas pode-se definir alguns modos de operação na técnica de MFA, a saber: 1) **contato**, onde a interação por forças repulsivas permite obter imagens com alta resolução, a nível atômico. Neste modo, o atrito sonda-amostra pode danificar a superfície, produzindo imagem distorcida; 2) **não-contato**, onde a interação é atrativa, apresenta resolução limitada, apesar de apresentar a vantagem de não danificar a amostra; 3) **contato intermitente**, com regime alternando em atrativo e repulsivo; consegue altas resoluções sem deformação da amostra (NEVES et al., 1998).

MFA permite que amostras sejam observadas sem qualquer tratamento, sendo capaz de obter informações complementares em situações reais, sem interferências ou artefatos. Desde que a amostra não necessita ser eletricamente condutora, nenhum revestimento metálico é requerido. Do mesmo modo, nenhuma desidratação da amostra é necessária e, então, o biofilme pode ser observado em seu estado hidratado (ENGLERT et al., 2003).

Além das grandes ampliações, algumas vantagens da MFA incluem: a obtenção de informações nas três dimensões espaciais, utilização de amostras condutoras e/ou isolantes, além da simplicidade de preparo da amostra, permitindo a análise na amostra hidratada, sem necessidade de utilização de vácuo. Assim, amostras biológicas podem ser preparadas, por exemplo, pela deposição de uma gota em uma lâmina ou outro substrato, como, por exemplo, a mica (NEVES et al., 1998). Além disso, MFA tem como vantagem ser uma técnica de baixo custo de operação e de baixo investimento.

A grande vantagem da MFA sobre a MET é que permite estudar não apenas materiais condutores, mas também todo tipo de material isolante, já que o método não utiliza corrente de tunelamento para produção de imagens.

5 ESTUDO DE ESTABILIDADE DAS NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS

A avaliação da estabilidade físico-química das nanocápsulas poliméricas, sob diferentes condições de armazenamento, é de fundamental importância. O tamanho da partícula, o potencial zeta, a concentração do fármaco e o pH são geralmente os parâmetros físico-químicos que podem ser utilizados para monitorar a estabilidade das suspensões coloidais poliméricas (SCHAFFAZICK et al., 2003).

A estabilidade química dos carreadores poliméricos coloidais depende da temperatura, pH do meio e da exata composição da formulação armazenada. Conseqüentemente, para cada formulação específica, o estudo de estabilidade correspondente teria que ser realizado para garantir a qualidade do produto (ABDELWAHED et al., 2006b).

Após a preparação, as suspensões coloidais normalmente não possuem tendência à separação de fases, pois o processo de sedimentação é lento para partículas submicrométricas, sendo minimizado pelo movimento Browniano. No entanto, com o tempo, pode ocorrer a aglomeração das partículas e, conseqüentemente, a sedimentação. Vários fatores influenciam a estabilidade das suspensões coloidais, como, por exemplo, a adsorção de moléculas ativas à superfície das nanopartículas e a presença de tensoativos adsorvidos. A tendência à agregação e sedimentação das nanopartículas dispersas, em função do tempo, pode ser monitorada pela determinação de mudanças na distribuição de tamanho das partículas (SCHAFFAZICK et al., 2003). Para impedir o fenômeno de agregação, um estabilizante adequado pode ser usado na formulação. Contudo, as suspensões de nanopartículas coloidais podem ser desestabilizadas quando outros componentes da formulação são adicionados. A adsorção de moléculas ativas sobre as nanopartículas pode induzir este fenômeno (aglomeração de partículas) (ABDELWAHED et al., 2006b).

Informações relevantes sobre a estabilidade de suspensões nanoparticuladas podem ser obtidas mediante o monitoramento do pH, em função do tempo. Por exemplo, a alteração do pH pode ser indicio de degradação do polímero (SCHAFFAZICK et al., 2003). No entanto, a diminuição dos valores de pH das suspensões coloidais poliméricas, em um curto período de tempo, pode ser atribuída tanto à ionização de grupos carboxílicos presentes no

polímero, quanto à hidrólise, dependendo da hidrofobicidade do poliéster. Suspensões de nanopartículas preparadas com PCL apresentaram redução nos valores de pH, num período de 3,5 meses. Este fato foi atribuído à exposição de maior número de grupos ácidos carboxílicos terminais, em função do tempo, promovida pela relaxação das cadeias poliméricas (SCHAFFAZICK et al., 2003).

Nanopartículas de polímeros hidrolíticos degradarão em função do tempo, embora a uma baixa velocidade, se a temperatura e o pH estiverem controlados. A estabilidade de nanopartículas depende do tipo de polímero, sendo crescente na seguinte ordem: PLA:PGA (25:50) < PLA:PGA (37,5:25) < PLA 50 = PCL (ABDELWAHED et al., 2006b).

A degradação dos polímeros poliésteres alifáticos pode ser afetada *in vitro*: (1) pelo método de preparação do sistema de liberação, (2) pelas propriedades dos polímeros tais como massa molar inicial e (3) pelos parâmetros físicos e químicos, tais como temperatura, pH, força iônica, exposição à radiação gama (LEMOINE et al., 1996).

A estabilidade dos carreadores coloidais poliméricos durante o armazenamento é dependente não somente das condições de armazenamento, mas também da composição exata das formulações estocadas.

6 NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS PARA APLICAÇÃO TÓPICA

Encapsulação de fármacos é uma estratégia farmacêutica para modificação das propriedades físico-químicas da molécula encapsulada e oferece um meio de facilitar a penetração cutânea (ALVAREZ-ROMÁN et al., 2004a). Partículas coloidais maiores que 10 μm permanecem sobre a superfície da pele, entre 3 e 10 μm concentram-se nos folículos pilosos e menores que 3 μm penetram nos folículos e no estrato córneo (BARRY, 2001).

O controle da liberação de fármacos em sítios de ação específicos tem sido uma área de intensa pesquisa nos últimos dez anos. Dentre os vetores estudados, incluem-se as micropartículas e os sistemas coloidais (lipossomas e nanopartículas). As nanopartículas têm atraído maior atenção dos pesquisadores em relação aos lipossomas, devido às suas potencialidades terapêuticas e à maior estabilidade nos fluidos biológicos e durante o armazenamento (SCHAFFAZICK et al., 2003).

Embora nas últimas décadas, acreditava-se que a penetração de substâncias aplicadas topicamente, através da barreira da pele (estrato córneo), acontecia pela difusão nas camadas lipídicas, que circundam os corneócitos (LADEMANN et al., 2007), recentes investigações têm atribuído aos folículos pilosos significativa função na penetração de fármacos na pele (LADEMANN et al., 2001; TOLL et al., 2004).

Segundo Alvarez-Román e colaboradores (2004b), NP têm sido propostas como veículos tópicos, para acúmulo, dependente do tamanho, nos folículos pilosos, mas penetração cutânea das NP, em áreas não foliculares não foi observada. O encapsulamento do metoxicinamato de octila em NP favoreceu a penetração do ativo no estrato córneo quando comparado com uma emulsão do filtro solar. A elevada superfície de contato de partículas nanométricas facilitou o contato da molécula encapsulada com o estrato córneo.

Micro e nanopartículas direcionaram a deposição de fármacos em camadas externas da epiderme (ALVAREZ-ROMÁN et al. 2004b; JENNING et al., 2000), tão bem como nos folículos pilosos (SUMIAN et al. 1999; MORDON et al. 2003; ALVAREZ-ROMÁN et al. 2004a), sendo capazes de aumentar a atividade do fármaco e minimizar efeitos colaterais provenientes da penetração na pele. Os folículos pilosos parecem ser um eficiente reservatório para substâncias aplicadas topicamente, especialmente partículas têm uma importante função na penetração folicular (LADEMANN et al., 2007). Partículas de 100 nm contendo dióxido de titânio penetraram nos folículos pilosos, mas não passaram dos folículos para a derme (LADEMANN et al., 1999). Partículas com diâmetro de 750 nm penetraram mais eficientemente nos folículos (TOLL et al., 2004). Lboutonne e colaboradores (2004) estudaram em detalhe o transporte de NC para dentro da pele, usando NC marcada com substância fluorescente. Após exposição de 8 horas, fluorescência foi distribuída principalmente nos folículos: a maior intensidade de fluorescência nas camadas mais profundas da pele confirmou o transporte de NC via folículos pilosos. Shim e colaboradores (2004) mostraram que a distribuição de NC fluorescentes foi mais concentrada ao longo dos folículos pilosos que em outro sítio. Alvarez-Román e colaboradores (2004a) utilizaram Microscopia Confocal para visualizar a distribuição de NP na pele. As imagens revelaram que as NP acumularam-se preferencialmente nas aberturas foliculares. Lademann e colaboradores (2007) demonstraram a superioridade das NP versus formulações não particuladas, não somente na penetração, mas também no armazenamento: as NP permanecem nos folículos mais tempo que substâncias não encapsuladas. Em princípio, o estrato córneo não é adequado como um reservatório prolongado para substâncias aplicadas topicamente, pois essas substâncias são principalmente localizadas na superfície da pele ou em camadas superiores de células que

são arrastadas por descamação; conseqüentemente, folículos pilosos são importantes alvos para liberação de fármacos.

A parede polimérica das NC tem função predominante na proteção de fármacos (RUBE et al., 2005), no direcionamento de fármacos e como sistema de liberação controlada. A incorporação de fármacos lipofílicos nas NC permite a modificação dos parâmetros farmacocinéticos e de distribuição do fármaco, aumentando a biodisponibilidade e/ou reduzindo a toxicidade (TEWA-TAGNE et al., 2007), a utilização de baixo conteúdo polimérico e a habilidade em proteger o fármaco de degradações (MOSQUEIRA et al., 2006).

Devido ao pequeno tamanho, NC podem penetrar através de barreiras (pele) permitindo acúmulo eficiente do fármaco no alvo. Por isso, a toxicidade e os efeitos colaterais do fármaco são reduzidos e a eficácia do tratamento aumentada (YIH & AL-FANDI, 2006).

NC tem elevada taxa de encapsulação para fármacos lipofílicos, baixo conteúdo polimérico e baixa toxicidade inerente quando comparada a lipossomas e nanoesferas (MOSQUEIRA et al., 2006; ALVES et al., 2007). O AR é um candidato a ser encapsulado em NC, uma vez que ele é altamente lipofílico ($\log P = 4,6$)(ABDULMAJED & HEARD, 2004).

Assim, o desenvolvimento de nanocápsulas contendo ácido retinóico pode ser uma alternativa interessante para tratamento tópico da acne, favorecendo a penetração nos folículos pilosos e reduzindo a permeação do fármaco na pele.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e caracterizar nanocápsulas contendo ácido retinóico, para o tratamento tópico da *Acne vulgaris*, e avaliar o perfil de liberação *in vitro* e permeação cutânea *in vitro* desse fármaco.

2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver e caracterizar (Tamanho de partículas, Potencial Zeta, pH, Teor de Encapsulação e Microscopia de Força Atômica) nanocápsulas poliméricas contendo Ácido retinóico;
- Adequação de metodologia analítica para doseamento do Ácido retinóico através de Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência (CLAE);
- Avaliar o perfil de liberação *in vitro* do Ácido Retinóico através de membranas poliméricas sintéticas, a partir dos sistemas desenvolvidos;
- Avaliar a permeação cutânea *in vitro* do Ácido retinóico em pele de orelha de porco, a partir dos sistemas desenvolvidos.

MATERIAIS E MÉTODOS

1 MATERIAIS

O Ácido retinóico foi fornecido pela Basf® (Alemanha). Os solventes grau CLAE, como metanol e acetonitrila, foram adquiridos da Fischer Chemicals® (EUA); ácido ortofosfórico 85% (Synth®, Brasil); triglicérides dos ácidos cáprico e caprílico (Lipoid® MCT, Lipoid®, Alemanha); polímero poli- ϵ -caprolactona, de Massa Molar 65000 Da (Sigma-Aldrich®, EUA); acetona (Quimex-Merck®, Alemanha); monooleato de sorbitano (Span® 80, Synth®, Brasil, EHL = 4,3); álcool cetílico 2 moles de óxido de etileno (Brij® 52, Sigma-Aldrich®, EUA, EHL = 5,3); álcool cetílico 20 moles de óxido de etileno (Brij® 58, Sigma-Aldrich®, EUA, EHL = 15,7); Polissorbato 80 ou Monooleato de sorbitano 20 moles de óxido de etileno (Tween® 80, Synth®, Brasil, EHL = 15,0); Copolímero de polioxietileno e polioxipropileno (Poloxamer® 188, Basf®, Alemanha, EHL = 29,0); Álcool oléico 20 moles de óxido de etileno (Volpo® 20, Croda®, Brasil, EHL = 15,3); Butilhidróxitolueno – BHT (All Chemistry®, Brasil); Ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) sal dissódico (Synth®, Brasil); Etanol 95% (Synth®, Brasil); Etanol absoluto (Synth®, Brasil); Propilenoglicol (Synth®, Brasil); tampão fosfato salina pH 7,4.

Todos os solventes utilizados no preparo das nanocápsulas foram de grau analítico. Os solventes utilizados no doseamento por Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência (CLAE) foram de grau CLAE e as demais substâncias químicas disponíveis foram de grau reagente e utilizadas sem purificação adicional. A água foi purificada por uma seqüência de deionização (Deionizador Permutation®, Brasil) e destilação (Destilador Tecnal® TE 178, Brasil).

2 MÉTODOS

2.1 Construção da Curva Analítica para o doseamento do Ácido retinóico

Para se avaliar o desempenho da curva construída, utilizou-se o parâmetro analítico denominado Linearidade. A linearidade da Curva Analítica corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame, dentro de uma determinada faixa de aplicação (RIBANI et al., 2004).

A correlação entre o sinal medido (área sob o pico, para CLAE) e a concentração da espécie a ser quantificada muito raramente é conhecida *a priori*. Na maior parte dos casos, a relação

matemática deve ser determinada, empiricamente, a partir de sinais medidos para concentrações conhecidas dessa espécie. Essa relação matemática pode ser expressa como uma equação de reta chamada de Curva Analítica. Embora somente dois pontos definem uma reta, na prática, as linhas devem ser definidas por, no mínimo, cinco pontos que não incluam o ponto zero na curva, devido aos possíveis erros associados (RIBANI et al., 2004).

Matematicamente, a estimativa dos coeficientes de uma curva analítica, a partir de um conjunto de medições experimentais, pode ser efetuada usando o método matemático conhecido como regressão linear. Além dos coeficientes de regressão **a** e **b**, também é possível calcular, a partir de pontos experimentais, o coeficiente de correlação **r**. Este parâmetro permite uma estimativa da qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo de 1,0, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados. Em qualquer técnica instrumental, a relação linear simples, descrita pela equação $y = ax + b$, só é válida em um determinado intervalo de concentração da espécie medida. Esse intervalo, no qual se pode construir uma Curva Analítica linear, é a faixa linear dinâmica (RIBANI et al., 2004).

Na construção da Curva Analítica, utilizada no doseamento do AR, foram utilizados Cromatógrafo a Líquido de Alta Eficiência (Waters[®], Milford, EUA) composto por bomba isocrática (modelo 515; Waters[®]), injetor automático (modelo 717 plus; Waters[®]), detector Photo Diode Array – DAD (modelo 2996; Waters[®]), software Empower[®] 2 (Waters[®]), coluna cromatográfica (Lichrospher[®] RP 18 5 μm , 150 x 4 mm, Merck[®], Alemanha), balança analítica (modelo BP 221S, Sartorius[®], Alemanha), ultra-som (modelo R-MTH 3210, Damburcy[®], EUA), sistema para filtração a vácuo (Millipore[®], França), membrana de celulose regenerada (47 mm de diâmetro e 0,45 μm de porosidade, Sartorius[®], Alemanha), dispositivo de filtração (MINISART SRP 15, 13 mm de diâmetro e 0,45 μm de porosidade, Sartorius[®], Alemanha), pipeta automática 200 μL (Gilson[®], França).

O método de análise utilizado para a construção da Curva Analítica foi extraído do trabalho de Jennings e colaboradores (2000) e Manconi e colaboradores (2006) no qual eles definem as condições cromatográficas, conforme estabelecido no item abaixo.

2.1.1 Condições cromatográficas

As condições cromatográficas definidas abaixo foram utilizadas no método para determinação da concentração do ácido retinóico nas formulações estudadas.

Fase móvel:	Acetonitrila : Água (80 : 20) + 0,1% v/v de ácido fosfórico 85%
Fluxo:	1,0 mL/min
Volume de injeção:	20 µL
Detecção:	340 nm
Temperatura:	25°C

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 20 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 celulose regenerada de 0,45 µm e desgaseificada durante 20 minutos em banho de ultra-som.

2.1.3 Linearidade da Curva Analítica

Para obtenção da Curva Analítica, pesou-se, exatamente, 20,0 mg de ácido retinóico (BASF®; Alemanha) e transferiu-se quantitativamente para um balão volumétrico de 50 mL. O fármaco foi solubilizado em acetona e o volume do balão foi completado com o mesmo solvente. A solução foi homogeneizada, obtendo-se uma concentração final de 400 µg/mL de ácido retinóico (SOLUÇÃO ESTOQUE).

Foram preparadas soluções padrões com as seguintes concentrações: 0,5 µg/mL, 1 µg/mL, 2 µg/mL, 4 µg/mL, 8 µg/mL e 16 µg/mL. Cada diluição foi realizada em triplicata.

Para o preparo da solução padrão de concentração **0,5 µg/mL**, foi transferida alíquota de 5,0 mL da solução padrão de concentração 1 µg/mL para um balão volumétrico de 10 mL. Completou-se o volume do balão com fase móvel e homogeneizou-se.

Para o preparo da solução padrão de concentração **1 µg/mL**, foi transferida alíquota de 25,0 mL da solução padrão de concentração 4 µg/mL para um balão volumétrico de 100 mL. Completou-se o volume do balão com fase móvel e homogeneizou-se.

Para o preparo da solução padrão de concentração **2 µg/mL**, foi transferida alíquota de 5,0 mL da solução padrão de concentração 4 µg/mL para um balão volumétrico de 10 mL. Completou-se o volume do balão com fase móvel e homogeneizou-se.

Para o preparo da solução padrão de concentração **4 µg/mL**, foi transferida alíquota de 1,0 mL da solução estoque para um balão volumétrico de 100 mL. Completou-se o volume do balão com fase móvel e homogeneizou-se.

Para o preparo da solução padrão de concentração **8 µg/mL**, foi transferida alíquota de 1,0 mL da solução estoque para um balão volumétrico de 50 mL. Completou-se o volume do balão com fase móvel e homogeneizou-se.

Para o preparo da solução padrão de concentração **16 µg/mL**, foi transferida alíquota de 1,0 mL da solução estoque para um balão volumétrico de 25 mL. Completou-se o volume do balão com fase móvel e homogeneizou-se.

Após estabilização da coluna, nas condições do ensaio, as soluções padrões diluídas foram injetadas no cromatógrafo, em triplicata. As 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 determinação (r^2). 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 0,5 a 16 µg/mL.

2.2 Preparação das nanocápsulas poliméricas

No preparo das nanocápsulas poliméricas foram utilizados os seguintes equipamentos: banho-maria (modelo E-100, Lauda[®], Alemanha); agitador magnético (modelo HTR 8068,

Ika[®], Alemanha); rotavapor (modelo 802, Fisatom[®], Brasil); deionizador (Permutation[®], Brasil); destilador (modelo TE 178, Tecnal[®], Brasil).

2.2.1 Preparação das nanocápsulas brancas

A preparação das nanocápsulas (NC) foi realizada pelo método de deposição interfacial do polímero pré-formado, seguido do deslocamento do solvente, método também conhecido como nanoprecipitação, descrito anteriormente por Fessi e colaboradores (1989).

Nanocápsulas brancas (sem o fármaco) foram preparadas com tensoativos hidrofílicos e também com mistura de tensoativos lipofílicos e hidrofílicos. Os Poloxamers[®] são tensoativos não-iônicos (copolímero de polioxietileno e polioxipropileno) com estrutura geral: $\text{HO}(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_a(\text{C}_3\text{H}_6\text{O})_b(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_a\text{H}$. O segmento polioxietileno é hidrofílico, enquanto o segmento polioxipropileno é lipofílico (EHL = 29,0). O Span[®] 80, o monooleato de sorbitano, é um tensoativo não-iônico que apresenta fórmula mínima $\text{C}_{24}\text{H}_{44}\text{O}_5$ e caráter lipofílico (EHL = 4,3). Os polissorbatos (ésteres de ácidos graxos de sorbitano polioxietileno) contendo 20 unidades de óxido de etileno são tensoativos não iônicos hidrofílicos. O Polissorbato 80 (Tween[®] 80; EHL = 15,0) é o monooleato de sorbitano 20 moles de óxido de etileno. Os éteres alquil polioxietileno são tensoativos não-iônicos e apresentam a fórmula estrutural: $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_x(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_y\text{OH}$, onde $(x + 1)$ é o número de átomos de carbono na cadeia alquila (16: cetil) e y é o número de grupos óxidos de etileno na cadeia hidrofílica. O álcool cetílico 2 moles de óxido de etileno e o álcool cetílico 20 moles de óxido de etileno fazem parte dessa classe de tensoativos, sendo que o primeiro é tensoativo lipofílico (EHL = 5,3) e o segundo é hidrofílico (EHL = 15,7) (WADE & WELLER, 2000).

O LIPOID[®] MCT, triglicerídeo de cadeia média dos ácidos cáprico (C_8) e caprílico (C_{10}), foi utilizado como fase oleosa (núcleo interno) das nanocápsulas. Ele é solúvel em acetona. Triglicérides de cadeia média apresentam um grande número de vantagens em formulações farmacêuticas: melhor propriedade de espalhamento sobre a pele; propriedades de penetração, cosméticas e emolientes aceitáveis; formação de um filme invisível sobre a pele; compatibilidade adequada; boas propriedades de solvência e estabilidade contra oxidação (WADE & WELLER, 2000).

A fase orgânica da preparação foi assim composta: solvente orgânico acetona, polímero poli- ϵ -caprolactona (MM 65000 Da), triglicérides dos ácidos cáprico e caprílico (LIPOID[®] MCT) e tensoativo lipofílico, quando for o caso (Tabela 2). Inicialmente, o polímero poli- ϵ -

caprolactona foi pesado em um béquer, ao qual foram adicionados 25 mL de acetona. Esta fase foi aquecida a 60°C, em banho-maria, até completa solubilização do polímero. Em seguida, foi pesado o Lipoid® MCT e o tensoativo lipofílico, dependendo da formulação da nanocápsula. Esses componentes foram homogeneizados na fase acetônica utilizando-se bastão de vidro.

A fase aquosa apresentou a seguinte composição: tensoativo hidrofílico e água. Em um béquer, foi pesado o tensoativo hidrofílico, ao qual foram adicionados 50 mL de água destilada. A fase aquosa foi submetida à agitação magnética moderada. Esta agitação foi mantida até completa solubilização do tensoativo à temperatura ambiente.

As fases orgânica e aquosa foram aquecidas, separadamente, em banho-maria a 45°C. A mistura orgânica resultante foi adicionada à fase aquosa, sob agitação magnética moderada (Figura 9). Imediatamente a solução se tornou turva e leitosa, como resultado da formação da suspensão de nanocápsulas. A mistura das fases foi feita a 45°C, em banho-maria. A suspensão de nanocápsulas foi mantida sob agitação magnética moderada durante 10 minutos. Em seguida, a suspensão foi concentrada em rotavapor a um volume final de 10 mL, sob pressão reduzida a 40 - 45°C, a fim de se remover todo o solvente orgânico e grande parte da fase aquosa. A suspensão de nanocápsulas brancas foi acondicionada em frasco de vidro âmbar, envolto em papel alumínio e conservada à temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$.

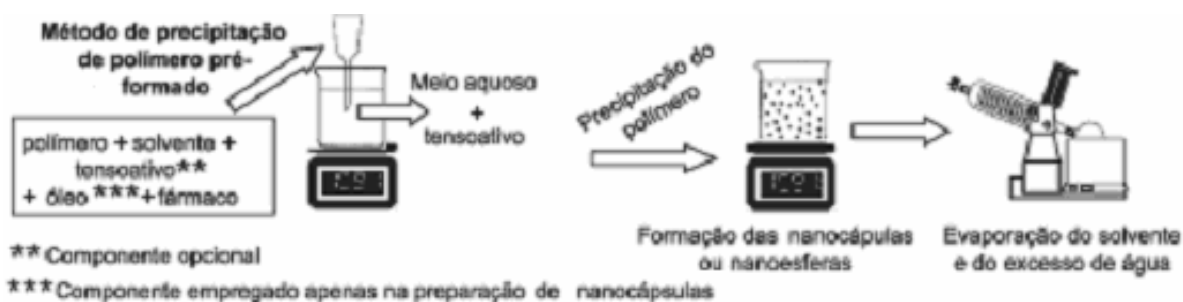


Figura 9: Método usual, empregado na preparação de nanopartículas poliméricas, baseado na precipitação de polímeros pré-formados

Fonte: SCHAFFAZICK e colaboradores (2003)

Tabela 2: Composição (% p/v^a) das formulações das nanocápsulas poliméricas

Componentes	NC 1	NC 2	NC 3	NC 4	NC 5
Poli-ε-caprolactona (65000 Da)	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25
LIPOID [®] MCT	5	5	5	5	5
Span [®] 80	-	0,5	-	-	-
Álcool cetílico 2 moles OE ^b	-	-	-	0,5	-
Poloxamer [®] 188	5	-	-	-	-
Polissorbato 80	-	4,5	5	-	-
Álcool cetílico 20 moles OE ^b	-	-	-	4,5	5
Água destilada	100 mL	100 mL	100 mL	100 mL	100 mL

^aTítulo (porcentagem) peso/volume

^bOE = Óxido de etileno

2.2.2 Preparação das nanocápsulas contendo ácido retinóico a 0,1% p/v

Nanocápsulas contendo AR a 0,1% p/v foram preparadas, conforme descrito anteriormente, com adição do fármaco à fase oleosa, sob a forma de solução acetônica concentrada. Adicionaram-se 10 mL de uma solução acetônica de AR a 1 mg/mL na fase orgânica, previamente à mistura de fases. Sendo assim, o volume restante de acetona adicionado foi de 15 mL, mantendo-se os 25 mL da fase orgânica (proporção do volume da fase orgânica/fase aquosa: 0,5).

A suspensão de nanocápsulas contendo ácido retinóico foi acondicionada em frasco de vidro âmbar, envolto em papel alumínio, sob atmosfera de nitrogênio, e conservada à temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$.

2.2.3 Preparação das nanocápsulas contendo ácido retinóico a 0,1% p/v e antioxidantes a 0,01% p/v

Nanocápsulas contendo AR a 0,1% p/v e antioxidantes a 0,01% p/v foram preparadas conforme descrito anteriormente. O antioxidante butilhidróxitolueno (BHT) a 0,01% p/v foi adicionado à fase oleosa, e o antioxidante EDTA dissódico a 0,01% p/v foi adicionado à fase aquosa. A suspensão de nanocápsulas contendo ácido retinóico e antioxidantes foi acondicionada em frasco de vidro âmbar, envolto em papel alumínio, sob atmosfera de nitrogênio, e conservada à temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$.

2.3 Caracterização físico-química das nanocápsulas poliméricas

2.3.1 Distribuição do Tamanho e Potencial Zeta

A análise do tamanho das partículas, o índice de polidispersão das amostras e o potencial zeta foram determinados por espectroscopia de correlação de fótons e mobilidade eletroforética, respectivamente, utilizando um equipamento Zetasizer 3000 HS (Malvern Instruments, UK).

Para a realização das medidas do tamanho das partículas foram utilizados, aproximadamente, 10 μL das dispersões de nanocápsulas, os quais foram diluídos em 4990 μL de água recém destilada e filtrada em filtro (0,45 μm). As medidas foram efetuadas à temperatura ambiente, utilizando-se um ângulo de incidência do laser em relação à amostra de 90°. Os valores obtidos correspondem à média \pm desvio padrão de dez medidas de cada formulação de nanocápsulas. O índice de polidispersão, calculado pelo equipamento, reflete o perfil de homogeneidade no diâmetro das partículas da amostra. Amostras que apresentaram índice de polidispersão inferior a 0,5 foram consideradas satisfatórias.

Para a realização do Potencial Zeta, 10 μL da suspensão coloidal de nanocápsulas foram diluídos em 4990 μL de uma solução de cloreto de sódio 1 mM, previamente filtrado em filtro (0,45 μm), com o objetivo de se obter suspensões com condutividades constantes. As medidas foram efetuadas à temperatura ambiente, utilizando-se um ângulo de incidência do laser em relação à amostra de 90°. Todas as determinações foram realizadas em triplicata e os resultados apresentados foram expressos como a média \pm desvio padrão.

2.3.2 Teor de Encapsulação

O Teor de Encapsulação do AR na NC foi calculado pela diferença entre a quantidade total de fármaco presente na suspensão coloidal ($AR_{\text{total NC}}$) e o AR livre na fase aquosa externa, seja sob a forma de precipitado ($AR_{\text{precipitado não-encapsulado}}$) ou solúvel ($AR_{\text{solúvel não-encapsulado}}$).

O Teor de encapsulação foi calculado através do balanço de massas, segundo Lboutounne e colaboradores (2002) e Zili e colaboradores (2005):

$$TE (\%) = \frac{[AR_{\text{total NC}} - (AR_{\text{precipitado não-encapsulado}} + AR_{\text{ultrafiltrado (solúvel não encapsulado)}})]}{AR_{\text{total NC}}} \times 100$$

- Determinação da concentração de AR total na suspensão de NC ($AR_{\text{total NC}}$)

Inicialmente, foram pipetados 200 μL (Pipeta automática 200 μL , Gilson[®], França) da suspensão de nanocápsulas contendo AR e transferidos para um balão volumétrico de 50 mL. Acetonitrila grau CLAE foi adicionada para dissolver as nanocápsulas poliméricas e o volume foi completado com o mesmo solvente. A solução foi homogeneizada e uma alíquota de 5,0 mL foi pipetada e transferida para um balão volumétrico de 10 mL. O volume foi completado com Fase Móvel e a solução foi homogeneizada. As amostras obtidas foram filtradas em filtro seringa (0,45 μm) e injetadas no cromatógrafo. Este procedimento foi realizado em triplicata. Para verificar se os componentes da formulação interfeririam na avaliação cromatográfica (seletividade do método), o mesmo procedimento descrito neste item foi realizado para as nanocápsulas brancas.

- Determinação da concentração de AR precipitado não-encapsulado

A determinação da concentração de AR precipitado não-encapsulado corresponde à diferença entre o AR total e o AR no filtrado (nanocápsulas filtradas em membrana de 1,2 μm). Retido neste filtro estarão possíveis cristais de AR precipitado, presentes no meio aquoso externo.

$$AR_{\text{precipitado não-encapsulado}} = [AR_{\text{total NC}} - AR_{\text{filtrado}}]$$

Um volume correspondente a 5 mL da suspensão de nanocápsulas foi filtrado em membrana de éster de celulose, com porosidade de 1,2 μm , através de um sistema de filtração de seringa, e o filtrado foi dosado. O doseamento do AR no filtrado foi realizado conforme descrito acima para o doseamento do AR total na suspensão de nanocápsulas.

- Determinação da concentração de AR no ultrafiltrado ($AR_{\text{solúvel não-encapsulado}}$)

A determinação da concentração de AR no ultrafiltrado (membrana MICROCON, MWCO 10.000 Da, Millipore[®], França) corresponde ao AR livre solúvel no meio externo aquoso. O filtrado obtido na fase anterior foi submetido ao processo de ultrafiltração. No interior do ultrafiltro foram adicionados 400 μL do filtrado e foram centrifugados (Centrífuga Excelsa

Baby II modelo 206-R, Fanem[®], Brasil) por 15 minutos a 14.000 g. O ultrafiltrado foi injetado diretamente no cromatógrafo, após filtração em filtro seringa de 0,45 μm .

A metodologia para determinação da concentração do AR total e livre (solúvel e precipitado) está esquematizada na Figura 10.

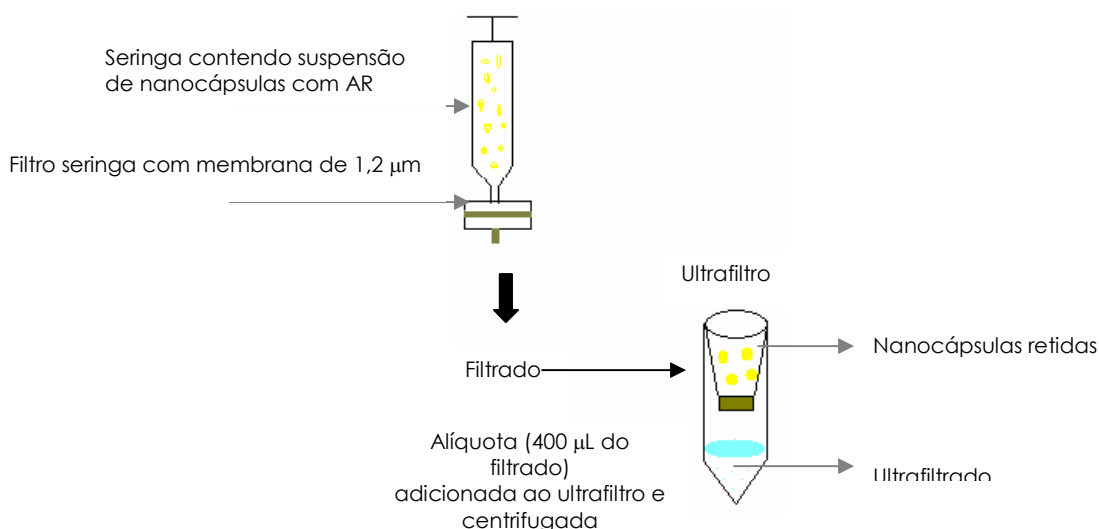


Figura 10: Representação esquemática da metodologia para determinação da concentração de ácido retinóico total, livre solúvel e livre precipitado

2.3.3 Morfologia externa das nanocápsulas poliméricas

A análise morfológica das nanocápsulas foi realizada por Microscopia de Força Atômica (MFA), com varredura por sonda mecânica. Para a realização dessa análise, foram utilizados os equipamentos Multimode e Dimension 3000, ambos monitorados por controlador Nanoscope[®] IIIa (Digital Instruments, EUA) da Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais (CETEC-MG).

As imagens foram obtidas no modo de contato intermitente (*tapping mode*) utilizando sondas de silício de comprimento de 228 μm , com uma frequência de ressonância de 75-98 kHz, força constante de 29-61 N/m e raio de curvatura de 5 a 10 nm.

Aproximadamente 5 μL da suspensão de nanocápsulas 3 (brancas e contendo AR), após serem diluídas 1:100 com água destilada (apenas para NC 3 contendo AR), foram depositados em placas de mica clivadas no momento do uso. A mica foi utilizada como suporte para as amostras, uma vez que se trata de um mineral com plano basal e de fácil

clivagem, apresentando superfície atômica plana. A superfície exposta é hidrofílica e apresenta cargas negativas. Após a deposição das amostras na superfície da mica, essas foram, imediatamente, secas utilizando-se jato de argônio. A varredura foi efetuada com velocidade de 1 Hz e resolução de 512 x 512 pixels. A análise das amostras foi realizada utilizando o programa de análise do sistema (*Section Analysis*).

2.4 Estudo de Estabilidade das nanocápsulas poliméricas

Foram realizados estudos de estabilidade das NC poliméricas brancas. As NC foram acondicionadas em frascos de vidro incolor, envoltos em papel alumínio, armazenados à temperatura ambiente de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e protegidos da luz. Foram avaliadas suas características físico-químicas, como Tamanho, Índice de Polidispersão, Potencial Zeta e pH nos tempos inicial, 15 e 45 dias após o preparo das NC.

As NC 3 (Polissorbato 80) contendo AR sem antioxidante e as NC 5 (Álcool cetílico 20 moles de óxido de etileno) contendo AR e antioxidantes foram acondicionadas em frascos de vidro incolor envoltos em papel alumínio e armazenadas à temperatura ambiente de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, protegidos da luz, sob atmosfera de nitrogênio. Nos tempo inicial, após 15 e 30 dias do preparo foi determinada a concentração do AR total na suspensão de NC.

2.5 Estudos de liberação *in vitro*

Os estudos de liberação *in vitro* visam avaliar a liberação do fármaco a partir dos sistemas desenvolvidos.

2.5.1 Estudo da solubilidade do AR no Líquido Receptor

Os estudos de liberação devem ser conduzidos em condições *sink*. Assim sendo, a solubilidade do AR no líquido receptor, o qual é composto por tampão fosfato salina pH 7,4 (89):álcool oléico 20 moles de óxido de etileno (1):etanol 95% (10), foi previamente avaliada.

A amostra para determinação da solubilidade foi preparada adicionando-se uma quantidade em excesso do AR a um volume definido do líquido receptor (5 mL). Essa suspensão foi mantida sob agitação (agitador magnético Ceramag Midi, Ika[®], Alemanha) durante 24 horas, à temperatura de $37 \pm 1^\circ\text{C}$. Após esse período, a suspensão foi centrifugada (Centrífuga

Excelsa Baby II, modelo 206-R; Fanem[®], Brasil) a 2800 rpm por 10 minutos. Alíquota do sobrenadante foi filtrada (0,45 μm) e diluída com fase móvel para uma faixa de concentração linear. A concentração do AR solúvel no Líquido receptor foi determinada por CLAE e calculada através da Curva Analítica. Este procedimento foi realizado em triplicata.

2.5.2 Obtenção das formulações

O estudo do perfil de liberação *in vitro* foi realizado para uma solução alcoólica de AR (Etanol absoluto : Propilenoglicol 1:1), nanocápsula 3 e nanoemulsão, todas contendo AR a 0,1% p/v. A nanoemulsão (contendo os mesmos componentes da NC 3, inclusive o sistema antioxidante) foi preparada conforme Nanocápsula 3 (método da nanoprecipitação), omitindo-se o polímero. A mistura de fases se deu a $70 \pm 1^\circ\text{C}$. Foi obtida nanoemulsão com tamanho de partícula de $288 \pm 35 \text{ nm}$ ($n = 3$).

2.5.3 Perfil de liberação *in vitro*

Os estudos de liberação *in vitro* do ácido retinóico foram realizados em células de difusão de Franz (Figura 11), constituída por um compartimento doador e um receptor, com volume de $10,0 \text{ cm}^3$ e área de superfície da membrana de $3,14 \text{ cm}^2$ (PermeGear[®], EUA).

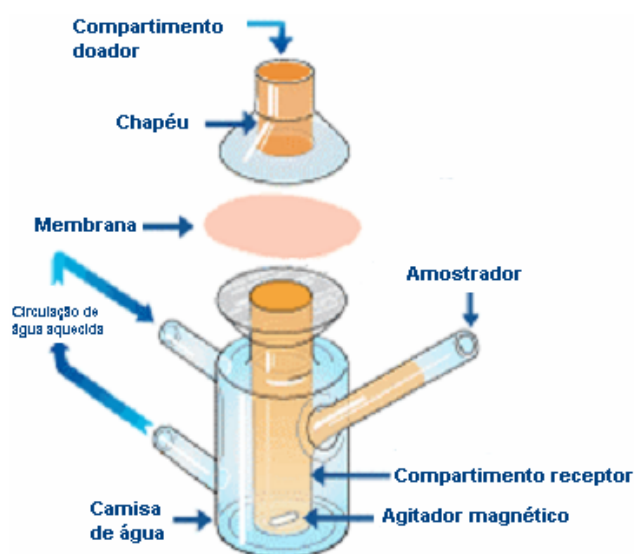


Figura 11: Representação esquemática da Célula de difusão de Franz

Este estudo foi conduzido com membranas de Teflon (diâmetro de poro de 0,45 μm) e membranas de Nylon (diâmetro de poro de 0,22 μm), ambas da Millipore[®] (França). Estas membranas são constituídas de politetrafluoroetileno (PTFE), no entanto, no caso da membrana de Nylon, o PTFE está ligado ao polietileno de alta densidade, conferindo-lhe hidrofobicidade.

A membrana foi hidratada durante 30 minutos com o líquido receptor antes de ser montada na célula. A membrana foi colocada horizontalmente, dividindo a célula em dois compartimentos: o doador e o receptor. Condições *sink* no compartimento receptor foram obtidas com uma solução contendo Tampão fosfato salina pH 7,4 (89), álcool oléico 20 moles de óxido de etileno (1) e etanol 95% (10). O fluido receptor foi mantido a $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ e agitado continuamente com uma barra magnética, visando assegurar sua homogeneidade.

Os experimentos foram conduzidos em dose finita, que imita as condições normais de aplicação. Nestes experimentos, o compartimento doador foi mantido aberto, permitindo a evaporação da fase aquosa volátil das preparações. As células de difusão foram revestidas com papel alumínio para prevenir a fotodegradação do AR. Amostras de 100 μL das preparações foram aplicadas sobre as membranas. Estes experimentos foram realizados em triplicata para cada formulação testada.

As amostras foram coletadas em intervalos de tempo pré-determinados (1, 2, 3, 4 e 5 horas), através da remoção total do fluido receptor e preenchimento com nova solução. As amostras foram filtradas em filtro seringa de 0,45 μm e injetadas no cromatógrafo. A concentração do AR no fluido receptor foi determinada através da Curva Analítica. O líquido receptor (branco) foi injetado no cromatógrafo, para se verificar a seletividade do método.

Foi realizada a determinação do tamanho das possíveis partículas presentes no líquido receptor, coletado a partir da célula na qual foi aplicada a nanocápsula, após 1 hora de experimento. Este procedimento foi realizado a fim de se garantir que nenhuma partícula intacta seria capaz de ultrapassar a barreira constituída pela membrana sintética, interferindo no resultado do estudo de liberação da formulação proposta. O resultado obtido comprovou que nenhuma partícula intacta permeou a membrana.

A comparação entre as médias dos valores dos estudos de liberação *in vitro* foi realizada pela análise de variância (ANOVA). As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas ao nível de $p < 0,05$.

2.6 Permeação cutânea *in vitro*

Os estudos de permeação cutânea *in vitro* do AR através da pele de orelha de porco foram realizados em células de difusão de Franz conforme descrito anteriormente. Procedeu-se da seguinte maneira para o preparo da pele: após a retirada das orelhas dos animais elas foram submetidas à limpeza sob água corrente. As orelhas foram secas com papel toalha e a região externa das orelhas foi depilada com auxílio de um depilador elétrico. Posteriormente, a pele foi removida cuidadosamente da cartilagem, utilizando-se bisturi. Em seguida, o tecido adiposo subcutâneo foi retirado com auxílio de pinça e bisturi, as peles foram inspecionadas visualmente para detecção de possíveis danos e montadas imediatamente nas células de Franz ou acondicionadas em sacos plásticos e estocadas a -15°C até o dia do experimento, por um período máximo de 4 semanas. Duas horas antes de serem montadas nas células de difusão foram mantidas à temperatura ambiente.

2.6.1 Estudo da solubilidade do AR no Líquido Receptor

A solubilidade do AR foi determinada no líquido receptor, o qual é composto por tampão fosfato salina pH 7,4 (86) : álcool oléico 20 moles de óxido de etileno (4) : etanol 95% (10). A amostra para determinação da solubilidade foi preparada adicionando-se uma quantidade em excesso do AR a um volume definido do líquido receptor (5 mL). Essa suspensão foi mantida sob agitação (Agitador magnético Ceramag Midi, Ika[®], Alemanha) durante 24 horas, à temperatura de $37 \pm 1^\circ\text{C}$. Após esse período, a suspensão foi centrifugada (Centrífuga Excelsa Baby II, modelo 206-R; Fanem[®], Brasil) a 2800 rpm por 10 minutos. Alíquota do sobrenadante foi filtrada ($0,45 \mu\text{m}$) e diluída com fase móvel para uma faixa de concentração linear. A concentração do AR solúvel no Líquido Receptor foi determinada por CLAE e calculada através da Curva Analítica. Este procedimento foi realizado em triplicata.

2.6.2 Montagem das células

A pele foi colocada horizontalmente na célula de Franz, dividindo-a em dois compartimentos: o doador, no qual a formulação é aplicada, e o receptor. O compartimento receptor foi preenchido com o Líquido receptor e, durante o experimento, este foi agitado continuamente com uma barra magnética, visando assegurar a sua homogeneidade, sendo mantido a $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$.

2.6.3 Aplicação das formulações

Os fragmentos de pele foram montados nas células de Franz, permanecendo em contato com o tampão fosfato salina pH 7,4 por 1 hora antes da aplicação das formulações, com o objetivo de hidratar a pele. Após 1 hora, o tampão foi retirado completamente e substituído por Líquido Receptor. Amostras de 200 μ L (Pipetador automático 200 μ L, Gilson[®], França) das formulações de AR foram aplicadas sobre as peles. Os experimentos foram conduzidos em dose finita e o compartimento doador foi mantido aberto, permitindo a evaporação da fase aquosa volátil das formulações, simulando as condições normais de uso.

2.6.4 Determinação da difusão

Ao final de 8 horas, amostras foram coletadas através da remoção total do fluido receptor, filtradas (0,45 μ m) e injetadas no cromatógrafo. O líquido receptor (branco) foi injetado no cromatógrafo, a fim de se verificar a seletividade do método. A quantidade de AR que não penetrou na pele foi removida com 0,5 mL de líquido receptor, seguido da aplicação de 0,5 mL de água destilada. Este procedimento foi realizado em duplicata. O chapéu da célula de Franz foi retirado e a superfície da pele foi lavada com um cotonete umedecido em líquido receptor e o resíduo foi removido com um cotonete seco.

Em seguida, o fragmento de pele foi retirado da célula de Franz e o estrato córneo foi removido após 10 *strippings*. As fitas foram colocadas em um béquer contendo fase móvel e levadas ao ultra-som por 20 minutos. O líquido extrator foi recolhido em balão volumétrico. A solução foi filtrada (0,45 μ m) e injetada no cromatógrafo para determinação da concentração de AR que penetrou no estrato córneo.

O fragmento de pele sem estrato córneo foi cortado com um bisturi na porção externa ao diâmetro do chapéu e colocado em um frasco de vidro incolor, envolto em papel alumínio, ao qual foram adicionados 2 mL de metanol grau CLAE. O frasco foi vortexado (Termolyne[®], tipo 37600, Dubuque, EUA) durante 5 minutos e, em seguida, mantido em repouso por 1 hora. Após este período, ele foi submetido a vórtex por mais 5 minutos, levado ao ultra-som por 2 minutos e mantido em repouso por 1 hora. Ao final deste tempo, o frasco foi agitado em vórtex por 5 minutos e a amostra foi filtrada (0,45 μ m) e injetada no cromatógrafo para determinação da concentração do AR que penetrou na pele (epiderme + derme). No doseamento do branco, o líquido extrator não apresentou nenhum pico de absorção no

mesmo tempo de retenção do AR, confirmando que os retinóides endógenos não se encontravam em concentração suficiente para interferir no resultado do experimento.

Experimentos de permeação, utilizando-se pele dermatomada (Dermatômetro 50 mm, NOUVAG® AG TCM 3000, Suíça) foram também conduzidos (pele com espessura média de 500 μm).

2.6.5 Validação da remoção do AR não absorvido

O AR não absorvido, que permaneceu na superfície da pele, não penetrando no tecido cutâneo, foi determinado. A validação consistiu na aplicação de 100 μL de nanoemulsão contendo AR a 0,1% p/v sobre a pele de orelha de porco, montada na célula de Franz. Após secagem total da formulação com formação de resíduo (aproximadamente 2 horas), a preparação foi removida da superfície da pele utilizando-se 0,5 mL de líquido receptor, seguido da aplicação de 0,5 mL de água destilada. Este procedimento foi realizado em duplicata. O chapéu da célula de Franz foi retirado e a superfície da pele foi lavada com um cotonete umedecido em líquido receptor e, em seguida, o resíduo foi removido com um cotonete seco. O líquido de lavagem da pele, o chapéu e os cotonetes foram colocados em um frasco hermeticamente fechado contendo 50 mL de metanol grau CLAE. Após um período de contato de 1 hora à temperatura ambiente e agitação em um vórtex (Termolyne®, tipo 37600, Dubuque, EUA) por 10 minutos, o líquido extrator foi homogeneizado em ultra-som por 2 minutos. Em seguida, a concentração do AR neste líquido extrator foi determinada através de CLAE. A concentração do AR na nanoemulsão foi também avaliada.

2.6.6 Validação da extração do AR retido na fita *stripping*

A fita utilizada no *stripping* (Fita adesiva Scotch® 845 Book Tape) foi cortada no diâmetro do chapéu (\varnothing interno de 20 mm) e foi retirado o estrato córneo de voluntário *in vivo*. 10 fitas foram colocadas sobre um suporte e foram adicionados 5 μL de uma solução acetônica de AR a 1 mg/mL. Após secagem da solução, foi adicionada uma fita em um béquer âmbar envolto em papel alumínio contendo 10 mL de fase móvel. O béquer foi mantido em banho de ultra-som por 2 minutos. Em seguida, foi adicionada mais uma fita e repetido o processo de ultra-som. Este procedimento foi realizado até a 5ª fita. O líquido extrator foi vertido em um balão volumétrico de 50 mL e foram adicionados mais 10 mL de fase móvel sobre as

cinco fitas. Manteve-se o béquer por mais 2 minutos no banho de ultra-som. O líquido extrator foi vertido no mesmo balão volumétrico de 50 mL. As cinco primeiras fitas foram retiradas do béquer e descartadas. A 6ª fita foi colocada no béquer contendo 10 mL de fase móvel. O mesmo procedimento descrito para as cinco primeiras fitas foi repetido. O volume do balão volumétrico foi completado com fase móvel e a solução foi filtrada em filtro seringa de 0,45 μm e injetada no cromatógrafo. A concentração de AR presente na solução extratora foi calculada através da Curva Analítica. A solução acetônica de AR foi dosada a fim de se estabelecer a concentração de AR como 100%.

2.6.7 Validação da extração do AR retido na pele

A pele foi submetida à retirada do estrato córneo com 10 *strippings*. Em seguida, foi montada na célula de Franz contendo líquido receptor. Foram aplicados 20 μL de solução acetônica de AR a 1 mg/mL. O líquido receptor foi mantido sob agitação por 1 hora. Posteriormente, a pele foi retirada da célula de Franz e o fragmento de pele foi cortado com um bisturi ao redor do diâmetro externo do chapéu. O fragmento foi colocado em um frasco de vidro incolor, envolto em papel alumínio, ao qual foram adicionados 10 mL de metanol grau CLAE. O frasco foi submetido a vórtex (Termolyne[®], tipo 37600, Dubuque, EUA) durante 5 minutos e mantido em repouso por 1 hora. Após este período, ele foi submetido a vórtex por mais 5 minutos, levado ao ultra-som por 2 minutos e novamente submetido a vórtex por 5 minutos. A amostra foi filtrada (0,45 μm) e injetada no cromatógrafo. A concentração de AR presente na solução extratora foi calculada através da Curva Analítica. Foi realizado o mesmo experimento de validação para o branco, no qual foram adicionados sobre a pele 20 μL de acetona, a fim de se verificar possíveis interferentes decorrentes da presença de retinóides endógenos na pele.

A comparação entre as médias dos valores dos experimentos de permeação cutânea foi realizada pela análise de variância (ANOVA). As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas ao nível de $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1 LINEARIDADE DA CURVA ANALÍTICA

A Figura 12 apresenta a Curva Analítica obtida para o ácido retinóico (AR), com a respectiva equação da reta e o coeficiente de determinação (r^2).

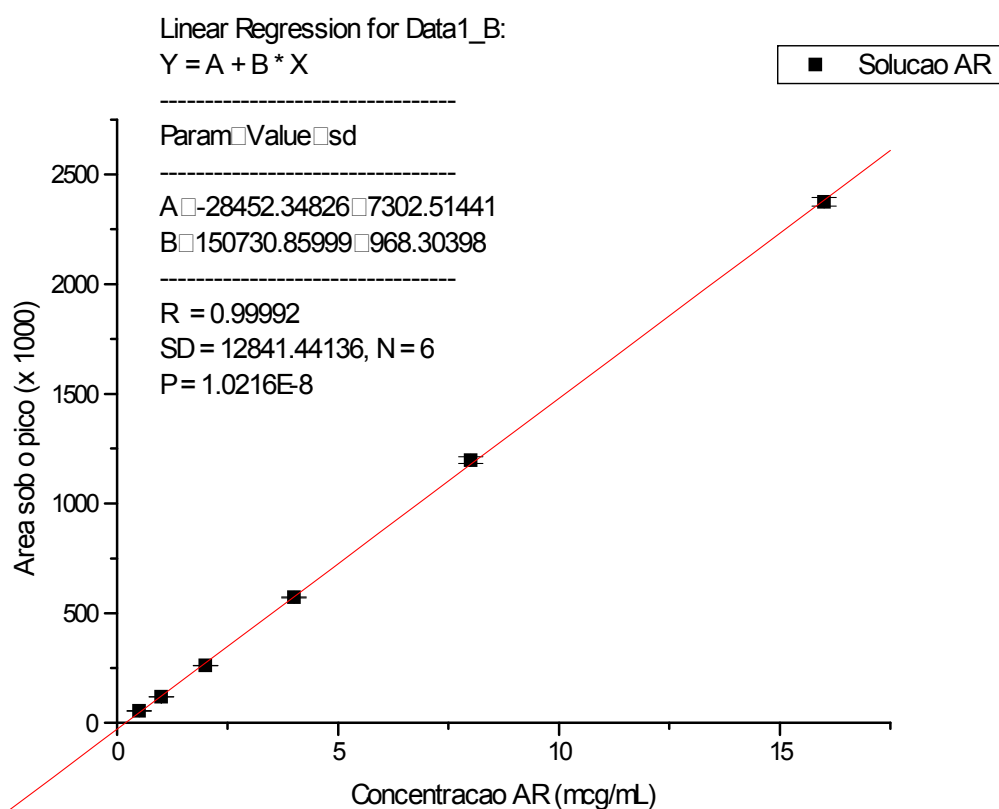


Figura 12: Representação gráfica da Curva Analítica do ácido retinóico, obtida por CLAE

Pode-se observar, pela curva construída e pela análise de regressão, a relação linear entre as áreas sob os picos e as concentrações de AR, no intervalo proposto de 0,5 a 16 $\mu\text{g/mL}$. Através do método dos mínimos quadrados, foi possível determinar a equação representativa da linearidade ($y = 150730,9 x - 28452,4$) e pelo estudo da regressão linear, o coeficiente de correlação ($r = 0,99992$). O coeficiente de determinação (r^2) obtido foi 0,99984, indicando que 99,98% da variação no eixo de y é explicada pela variação no eixo de x, e, conseqüentemente, há uma boa correlação ou linearidade na curva dentro da faixa de concentração proposta.

A Tabela 3 apresenta a média dos valores das áreas absolutas, o desvio padrão das médias (média \pm DP) e os fatores de resposta (Área/Concentração) obtidos para cada ponto da curva. Esses dados foram utilizados para a construção da Curva Analítica e para os cálculos do coeficiente de variação (desvio padrão relativo) e do fator de resposta. Nota-se que a menor concentração da curva apresentou maior Coeficiente de Variação, fato normal para concentrações muito baixas.

Tabela 3: Resultados estatísticos obtidos para as soluções padrões de AR em fase móvel, para as diferentes concentrações utilizadas na construção da Curva Analítica

Concentração (µg/mL)	Média das áreas \pm DP ^a	Fator de Resposta	CV ^b (%)
0,5	53504 \pm 1619	107008	3,02
1	117353 \pm 73	117353	0,06
2	261620 \pm 1009	130810	0,39
4	572146 \pm 1785	143037	0,31
8	1197279 \pm 15833	149660	1,32
16	2375406 \pm 19340	148463	0,81

^aDesvio Padrão

^bCoeficiente de Variação

2 PREPARAÇÃO DAS NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS

Nanocápsulas brancas e contendo AR foram preparadas pelo método de deposição interfacial do polímero pré-formado, seguido da evaporação do solvente (FESSI et al., 1989), um método simples e rápido para obter NC adequadas à liberação tópica. Durante o preparo das formulações foi utilizado papel alumínio para evitar fotodegradação do AR. Todas as formulações de nanocápsulas brancas foram obtidas como suspensões coloidais e apresentaram aspecto leitoso característico das nanocápsulas; as nanocápsulas contendo AR também foram obtidas como suspensões coloidais, mas apresentaram coloração levemente amarelada, devido à presença de AR na formulação.

3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS

Embora vários sistemas coloidais, tais como nanoemulsões, lipossomas e nanoesferas possam ser utilizados como carreadores para o AR, as nanocápsulas foram utilizadas no

presente trabalho, com o objetivo de obter alta taxa de encapsulação e proteção do fármaco. As nanocápsulas são os vetores de escolha para fármacos solúveis na fase oleosa interna e altamente lipofílicos, característica marcante do AR. As NC são também interessantes carreadores em função de sua biodegradabilidade, da estabilidade em meio biológico e da baixa toxicidade dos polímeros, como a poli- ϵ -caprolactona, utilizada neste estudo. A escolha de um determinado carreador, bem como dos constituintes de uma formulação, deve ser bastante criteriosa, pois a retenção de um fármaco na NC é amplamente determinada por sua lipofilicidade e sua capacidade de se difundir entre o sistema e o meio biológico.

3.1 Caracterização físico-química das nanocápsulas brancas

O diâmetro médio, índice de polidispersão, potencial zeta e pH das NC brancas estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4: Características físico-químicas das nanocápsulas brancas

Formulações NC ^a	Diâmetro \pm DP ^b (nm) (IP) ^c	Potencial Zeta \pm DP ^b (mV)	pH ^d \pm DP ^b
NC 1	270 \pm 3 (0,273)	- 44,0 \pm 1,4	6,09 \pm 0,24
NC 2	278 \pm 4 (0,397)	- 37,0 \pm 7,1	6,13 \pm 0,21
NC 3	218 \pm 5 (0,156)	- 31,5 \pm 6,4	6,13 \pm 0,19
NC 4	316 \pm 61 (0,327)	- 41,5 \pm 0,7	6,14 \pm 0,18
NC 5	318 \pm 30 (0,521)	- 41,0 \pm 2,8	6,07 \pm 0,26

^aNC: Nanocápsula

^bDesvio Padrão

^cIP: Índice de Polidispersão

^dpH: Potencial hidrogeniônico

O tamanho médio das NC brancas variou de 218 a 318 nm. Esses dados estão de acordo com dados obtidos por outros autores (MOSQUEIRA et al., 2006; ASSIS et al., 2007). Entre todos os tensoativos testados, o Polissorbato 80 (NC 3) proporcionou o menor tamanho de partícula. O índice de polidispersão é indicativo da distribuição de tamanho e ele mostrou

que as diferentes formulações de NC preparadas pelo método da nanoprecipitação estavam homogêneas ($IP < 0,5$).

Os valores do Potencial Zeta exibiram carga negativa com valores na faixa de $-31,5$ a $-44,0$ mV, estando em consonância com dados previamente publicados, os quais mostram valores próximos a $-26,7$ mV (LEITE et al., 2007). Esses valores de Potencial Zeta podem ser atribuídos à ionização dos grupos carboxílicos presentes no polímero PCL (LBOUTOUNNE et al., 2002; LAMPRECHT et al., 2002). No entanto, a variação do Potencial Zeta observada entre as diferentes formulações de nanocápsulas pode ser explicada pelo tipo de tensoativo. A diferença entre os valores de Potencial Zeta obtidos para NC 2 e NC 3 foi estatisticamente significativa ($P < 0,05$). O maior valor obtido para a NC 2 pode ser explicado pelo caráter ácido do Span[®] 80, que apresenta índice de acidez ($IA \leq 8$) superior ao do Polissorbato 80 ($IA \leq 2$). Desta forma, o grupamento ácido carboxílico, ionizado no pH da formulação, proporciona aumento do Potencial Zeta desta NC. Além dos tensoativos, a fase oleosa pode influenciar o Potencial Zeta das nanocápsulas. Schaffazick e colaboradores (2003) observaram os efeitos da composição das diferentes formulações sobre os valores do Potencial Zeta. Estes autores observaram que o Potencial Zeta de nanocápsulas ($-41,94$ mV) e nanoemulsões ($-42,32$ mV) foi maior do que para nanoesferas ($-16,33$ mV). A presença da fase oleosa nas nanocápsulas e nas nanoemulsões pode explicar este aumento do valor absoluto do Potencial Zeta em relação às nanoesferas, as quais não apresentam fase oleosa em sua constituição. O pH das cinco formulações se manteve próximo à neutralidade (de 6,0 a 6,2).

3.2 Caracterização físico-química das NC contendo AR a 0,1% p/v

As NC contendo AR a 0,1% p/v foram caracterizadas quanto ao Tamanho das nanopartículas, Índice de Polidispersão, Potencial Zeta, pH, concentração de AR total (Recuperação) e Teor de Encapsulação (Tabela 5). As determinações de tamanho, índice de polidispersão, potencial zeta e pH foram realizadas após filtração das nanocápsulas em membrana de $1,2 \mu\text{m}$, para remoção de cristais de AR da fase aquosa da formulação, que poderiam interferir nas determinações. O tamanho das partículas de NC carregadas com AR variou de 219 a 281 nm. Quando comparamos o tamanho das NC brancas com aquelas carregadas com AR, não se observa diferença significativa ($P > 0,05$). Assim, a incorporação do AR não modifica o tamanho das NC. Isso pode ser devido à quantidade extremamente

baixa do fármaco adicionada às nanocápsulas. NC carregadas com AR foram homogêneas ($IP < 0,5$).

Os valores do Potencial Zeta variaram de $-26,0$ a $-50,0$ mV. Quando comparamos os valores de Potencial Zeta das NC brancas com aquelas carregadas com AR, observa-se diferença estatisticamente significativa apenas para NC 1, NC 4 e NC 5 ($P < 0,05$). No caso desses tensoativos etoxilados e que apresentam uma estrutura linear, a presença do AR na formulação, provavelmente, levou à uma menor exposição dos grupamentos negativos do PCL e dos ácidos graxos livres residuais presentes na fase oleosa, dessa forma, caracterizando a localização do AR também na superfície dessas partículas, além do núcleo oleoso. Para NC 2 e NC 3 não se observa diferença significativa ($P > 0,05$). A incorporação do AR não modifica o Potencial Zeta dessas NC, indicando que, provavelmente, o AR foi principalmente associado ao núcleo oleoso das NC, permanecendo encapsulado. No pH das cinco formulações, o AR encontra-se em grande parte na forma não ionizada ($pK_a = 7,85$; SINICO et al., 2005). Assim, possivelmente, o AR adsorvido à interface óleo/água da NC não interferiria significativamente no valor do potencial de superfície das partículas. O pH obtido para as NC contendo AR foi de 4,6. Isto pode ser atribuído ao ácido fraco (AR) presente em pequena extensão na fase aquosa da formulação, mas suficiente para reduzir o valor do pH, quando comparada às NC brancas.

Tabela 5: Características físico-químicas das nanocápsulas contendo AR a 0,1% p/v

Form. NC ^a	Diâmetro \pm DP ^b (nm) (IP ^c)	Potencial Zeta \pm DP ^b (mV)	pH ^d \pm DP ^b	Recuperação \pm DP ^b (% p/v)	Encapsulação \pm DP ^b (% p/v)
NC 1	281 \pm 13 (0,107)	- 50,0 \pm 1,3	4,65 \pm 0,01	80,7 \pm 2,5	94,1 \pm 3,1
NC 2	219 \pm 5 (0,125)	- 32,2 \pm 0,3	4,66 \pm 0,01	93,2 \pm 15,9	87,6 \pm 4,5
NC 3	228 \pm 5 (0,114)	- 26,0 \pm 0,5	4,66 \pm 0,01	93,2 \pm 0,7	87,8 \pm 4,9
NC 4	249 \pm 1 (0,113)	- 30,8 \pm 0,5	4,67 \pm 0,00	80,1 \pm 6,2	104,8 \pm 2,1
NC 5	263 \pm 4 (0,130)	- 33,0 \pm 0,5	4,67 \pm 0,01	83,6 \pm 6,9	107,3 \pm 13,9

^aNC: Nanocápsula

^bDesvio Padrão

^cIP: Índice de Polidispersão

^dpH: Potencial hidrogeniônico

O Teor de Encapsulação do AR nas NC foi elevado e os valores obtidos encontram-se entre 87% e 107%. Esses elevados teores podem ser explicados pelo caráter altamente lipofílico do AR ($\log P = 4,6$). O Teor de Encapsulação está, geralmente, relacionado à solubilidade do fármaco no núcleo interno oleoso da formulação. Lipoid[®] MCT foi usado porque possui algumas propriedades físico-químicas que o tornam adequado à preparação de NC, tais como baixa viscosidade e tensão interfacial que reduz o tamanho e aumenta a estabilidade da NC, quando comparada com outros óleos usados em preparações farmacêuticas (MOSQUEIRA et al., 2006). Esses resultados obtidos são consistentes com outros estudos, nos quais teores elevados foram obtidos após encapsulação de fármacos lipofílicos em NC, por exemplo: > 98% para metoxicinamato de octila (ALVAREZ-ROMÁN et al, 2004b), > 96% para espironolactona (BLOUZA et al., 2006). A encapsulação está relacionada à redução do contato da função ácida (grupamento – COOH) do AR (fator disparador de eventos eritemáticos) com o estrato córneo, desta maneira resultando na redução dos episódios de eritema (SHAH et al., 2007).

3.3 Morfologia externa das nanocápsulas poliméricas

A morfologia externa das NC brancas e contendo AR (NC 3) foi avaliada por Microscopia de Força Atômica (MFA). As imagens produzidas pela técnica MFA são tridimensionais, com elevada resolução em escala nanométrica. Nesta técnica, a preparação da amostra é muito simples. Ela é depositada em um estado parcialmente seco sobre placas de mica clivadas recentemente, um fato que permite a caracterização simultânea do contorno da partícula, estrutura e organização entre partículas.

NC brancas apresentaram uma forma esférica nas imagens de MFA (Figura 13). As NC brancas foram aplicadas sobre a mica sem serem submetidas à diluição prévia. Desta forma, pode-se atribuir o tamanho elevado das partículas visualizadas a uma possível agregação das mesmas na superfície da mica, quando da desidratação do sistema com jato de argônio, uma vez que a concentração de nanopartículas no sistema é alta. Na imagem da Figura 13, podemos observar aglomerados em processo de ruptura, liberando o núcleo oleoso na superfície da mica. Em todos os experimentos realizados por MFA, a amostra foi submetida a um processo de secagem com jato de argônio. Foi observado que, apesar do processo de secagem manter a amostra recoberta com uma camada de água, a secagem levou a uma alteração das partículas, resultando em um possível fenômeno de agregação ou ruptura.

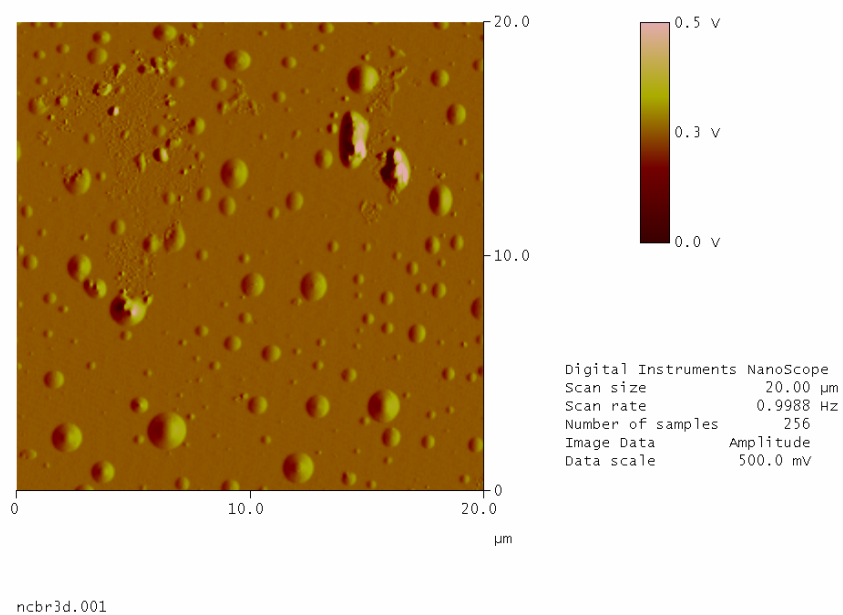
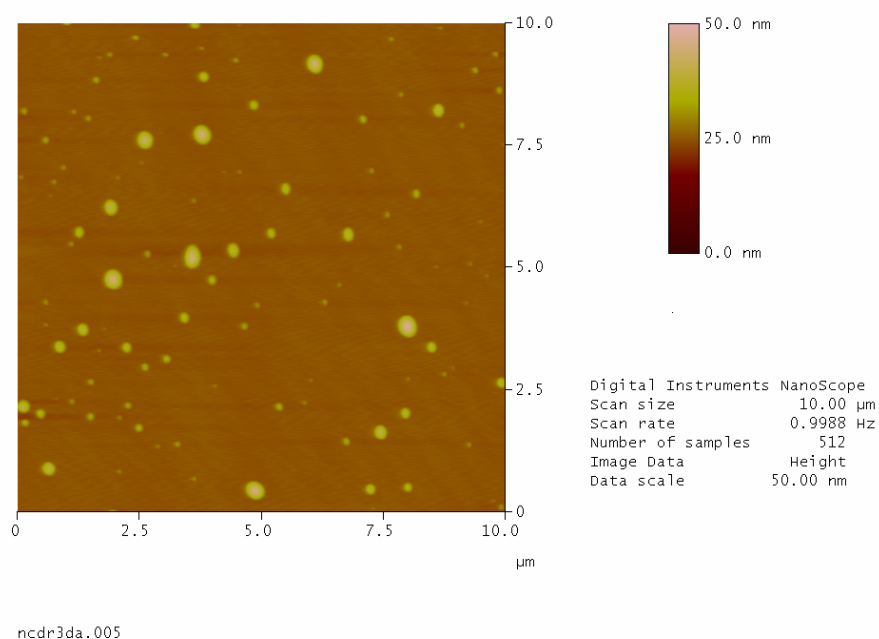


Figura 13: Imagens de nanocápsulas brancas obtidas por MFA (vista do topo) (Varredura de 20 x 20 μm)

Amostras das NC contendo AR foram analisadas após diluição 1:100 com água destilada, e foi observada uma homogeneidade em relação ao formato e estruturas, apresentando partículas com estruturas esféricas e formato regular, como pode ser visualizado nas figuras 14 A e 14 B.

A



B

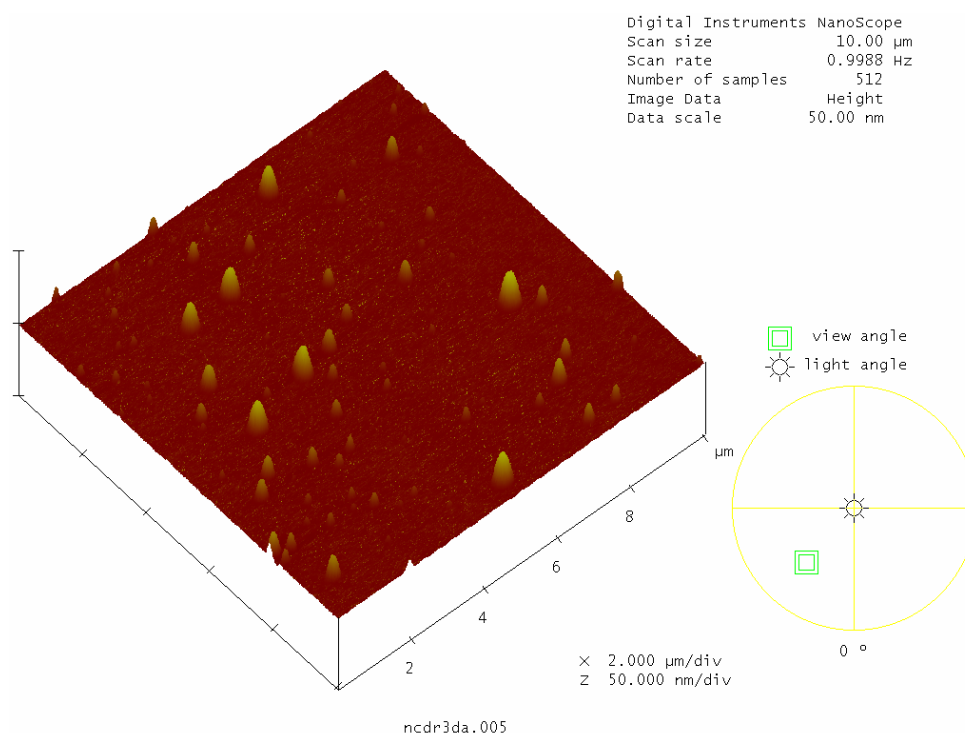


Figura 14: Imagens de nanocápsulas carregadas com ácido retinóico obtidas por MFA. Em (A) vista do topo e em (B) visão tridimensional das partículas (Varredura de 10 x 10 μm)

As NC contendo AR apresentaram formato esférico nas imagens obtidas por MFA (Figura 14 A). As NC apresentaram uma distribuição heterogênea no tamanho e altura em imagens tridimensionais (Figura 14 B). Esta observação pode ser explicada como um possível achatamento das NC e um processo de agregação que ocorre após secagem sobre a superfície da mica. De fato, o fenômeno do achatamento era provavelmente relacionado a variações na espessura da parede polimérica e sua homogeneidade (LEITE et al., 2005). Análises realizadas com NC contendo AR mostraram que a associação do fármaco não alterou a estrutura arredondada das nanopartículas.

Nanopartículas de poliamida (nanocápsulas e nanoesferas) foram analisadas por MFA e, através dos resultados obtidos, foi possível postular a natureza estrutural dos nanosistemas. Se o diâmetro fosse aproximadamente igual à altura ou razão $d/h=4$, os objetos poderiam ser estruturas com nanomatriz sólida (nanoesferas). Contudo, se o sistema não fosse baseado em uma matriz contínua, o colapso do líquido encapsulado pela membrana polimérica ocorreria e o objeto teria altura de duas vezes a parede polimérica. Então, seria possível definir as estruturas produzidas como nanovesiculares (nanocápsulas) (Figura 15) (MONTASSER et al., 2002).

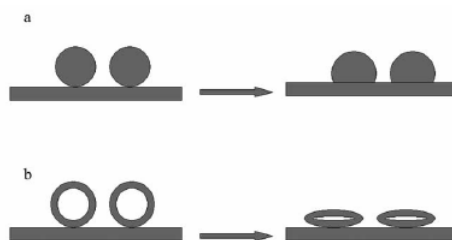


Figura 15: Representação esquemática da evolução de: (a) sistema nanomatriz (nanoesfera) e (b) sistema nanovesicular (nanocápsula) depositados e secos sobre uma superfície

Fonte: MONTASSER e colaboradores (2002)

A razão diâmetro/altura foi calculada a partir do perfil topográfico (Figura 16). Os valores mostraram uma razão de aproximadamente 12 ± 3 para NC contendo AR. Este resultado confirma a existência de formas achatadas que foram também sugeridas por Montasser e colaboradores (2002) que trabalharam com NC preparadas com co-polímero dicloroftaloil-co-dietilenotriamina e observaram uma relação diâmetro/altura de 12. Similarmente, Leite e colaboradores (2005) observaram uma razão de aproximadamente 10 para NC de poli- ϵ -caprolactona. A razão diâmetro/altura observada no presente estudo foi muito similar, confirmando o processo de achatamento da NC durante análise por MFA.

A partir dos dados obtidos, é possível postular que a capacidade de deformação das nanocápsulas, propriedade relevante destes sistemas, é uma evidência física da presença de um núcleo oleoso fluido, envolvido por uma membrana polimérica, conforme observado por Montasser e colaboradores (2002).

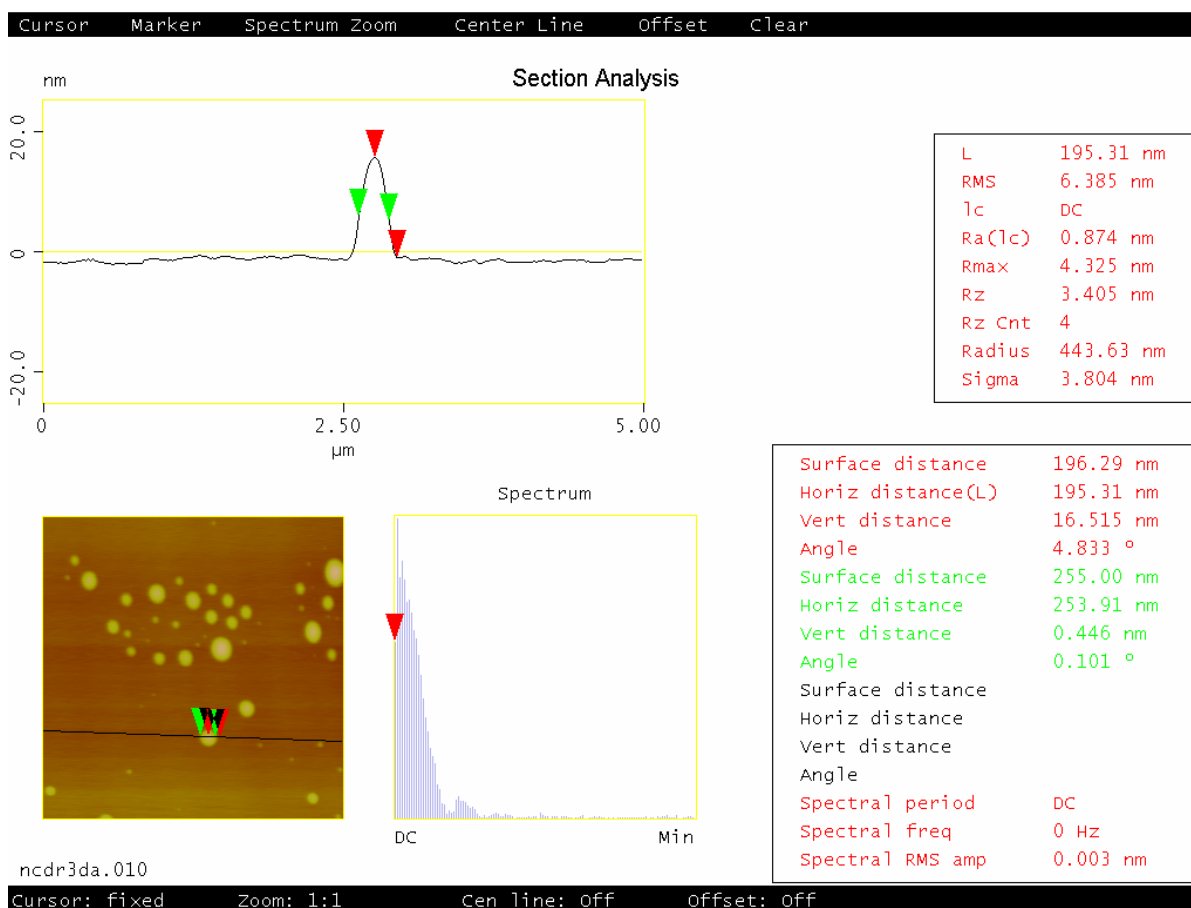


Figura 16: Imagem topográfica e perfil topográfico de nanocápsulas carregadas com ácido retinóico, apresentando a relação diâmetro/altura das partículas

4 ESTUDO DE ESTABILIDADE DAS NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS

4.1 Estudo de estabilidade das NC brancas

As características físico-químicas das NC brancas foram avaliadas, como Tamanho (diâmetro médio), Índice de Polidispersão, Potencial Zeta e pH nos tempos inicial, 15 e 45 dias após o preparo das nanocápsulas (Tabela 6).

Tabela 6: Estudo de estabilidade das nanocápsulas brancas

Form.	Tempo (dias)	0	15	45
NC 1	Diâmetro médio (nm)	274	269	268
	Índice Polidispersão	0,301	0,249	0,270
	Potencial Zeta (mV)	- 45	nd	- 43
	pH	6,26	nd	5,92
NC 2	Diâmetro médio (nm)	278	275	282
	Índice Polidispersão	0,404	0,406	0,381
	Potencial Zeta (mV)	- 42	nd	- 32
	pH	6,27	nd	5,98
NC 3	Diâmetro médio (nm)	217	213	223
	Índice Polidispersão	0,195	0,128	0,146
	Potencial Zeta (mV)	- 36	nd	- 27
	pH	6,26	nd	5,99
NC 4	Diâmetro médio (nm)	286	289	274
	Índice Polidispersão	0,285	0,407	0,290
	Potencial Zeta (mV)	- 42	nd	- 41
	pH	6,26	nd	6,01
NC 5	Diâmetro médio (nm)	284	331	339
	Índice Polidispersão	0,439	0,533	0,593
	Potencial Zeta (mV)	- 43	nd	- 39
	pH	6,25	nd	5,88

nd: não determinado

Todas as formulações estudadas foram obtidas como suspensões coloidais e apresentaram um aspecto leitoso característico das nanocápsulas. Essas preparações apresentaram boa estabilidade físico-química e nenhuma alteração macroscópica foi observada durante o período avaliado, tais como cremagem, sedimentação ou floculação. Os dados obtidos mostram que o tamanho, IP e Potencial Zeta das NC brancas permaneceram constantes durante o período de avaliação. No entanto, em relação aos valores de pH das cinco formulações de nanocápsulas observa-se uma diminuição discreta (aproximadamente 0,2 unidade de pH).

Informações relevantes sobre a estabilidade das suspensões nanoparticuladas podem ser obtidas mediante o monitoramento do pH, em função do tempo. Por exemplo, a alteração do pH pode ser indício de degradação do polímero. A diminuição dos valores de pH das suspensões coloidais poliméricas, em um curto período de tempo, pode ser atribuída tanto à

ionização de grupos carboxílicos presentes no polímero, quanto à hidrólise, dependendo da hidrofobicidade do poliéster. Suspensões de nanocápsulas de poli-ε-caprolactona apresentaram redução nos valores de pH num período de 3,5 meses. Esse fato foi atribuído à exposição de maior número de grupos ácidos carboxílicos terminais, em função do tempo (SCHAFFAZICK et al., 2003).

4.2 Estudo de estabilidade das NC contendo AR a 0,1% p/v

Foi avaliada a estabilidade das NC contendo AR quanto à concentração do AR total (Recuperação) no tempo inicial e após 15 e 30 dias da preparação das NC (Tabela 7).

Tabela 7: Estudo de estabilidade das NC contendo AR a 0,1% p/v sem antioxidantes (NC 3) e com antioxidantes (NC 5)

Nanocápsulas	Concentração do AR total (% p/v ^a) ± DP ^b		
	0 dia	15 dias	30 dias
NC 3	98,4 ± 1,2	39,5 ± 1,9	31,6 ± 1,1
NC 5	90,3 ± 0,8	82,9 ± 2,1	49,1 ± 3,5

^aTítulo (porcentagem) peso/volume

^bDP: Desvio Padrão

A concentração do AR na NC 3 sem antioxidante decresceu, consideravelmente, no período estudado, tendo sido degradado aproximadamente 70% do total do fármaco. A menor taxa de degradação do fármaco na NC 5 pode ser atribuída à presença do sistema antioxidante na formulação. A concentração do AR na NC 5 diminuiu, aproximadamente, em 41% no período de 30 dias. Estes dados mostram que, apesar do aumento da estabilidade na presença dos antioxidantes, as NC contendo AR apresentaram uma baixa estabilidade e isto deve ser reavaliado em estudos posteriores.

5 ESTUDO DE LIBERAÇÃO *IN VITRO*

5.1 Solubilidade do AR no Líquido Receptor

A solubilidade do AR no líquido receptor (Tampão fosfato salina pH 7,4 (89), álcool oléico 20 moles de óxido de etileno (1) e etanol 95%(10)) utilizado no estudo de liberação *in vitro* foi determinada previamente. A solubilidade do AR foi de 69,4 ± 0,01 µg/mL.

5.2 Perfil de liberação *in vitro*

Para obter mais informações a cerca da estabilidade e atividade termodinâmica do AR nas formulações de NC, foi estudada a difusão do AR através de duas membranas poliméricas. Este estudo foi conduzido com membranas inertes de Teflon (diâmetro de poro de $0,45 \mu\text{m}$) e de Nylon (diâmetro de poro de $0,22 \mu\text{m}$). A fim de imitar as condições de uso, todas as formulações foram aplicadas sem oclusão e a evaporação da água foi considerada.

O perfil de liberação do AR através da membrana de teflon, a partir de três formulações, pode ser observado na Figura 17. A liberação do AR (% dose aplicada) após 5 horas foi de $73 \pm 1\%$, $76 \pm 5\%$ e $60 \pm 1\%$ para NC, nanoemulsão e solução alcoólica, respectivamente.

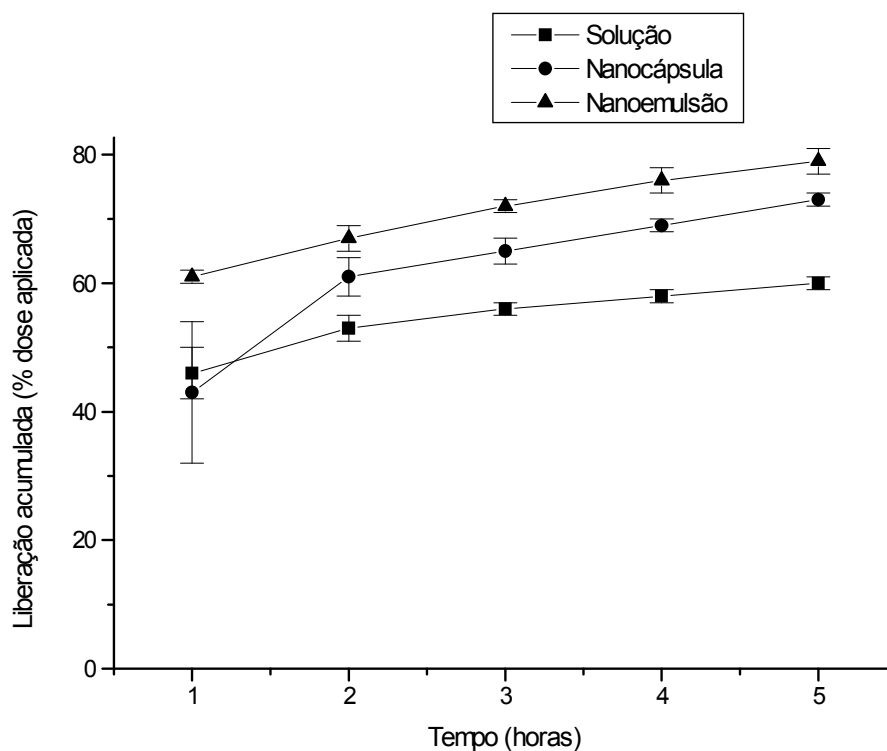


Figura 17: Perfil de liberação *in vitro* do AR a partir de nanocápsula, nanoemulsão e solução etanólica, através da membrana de teflon ($0,45 \mu\text{m}$)

O comportamento de liberação do AR através da membrana de Nylon, a partir de três formulações, está mostrado na Figura 18. A liberação do AR (% dose aplicada) após 5 horas foi de $34 \pm 2\%$, $41 \pm 3\%$ e 21% para a NC, NE e solução alcoólica, respectivamente.

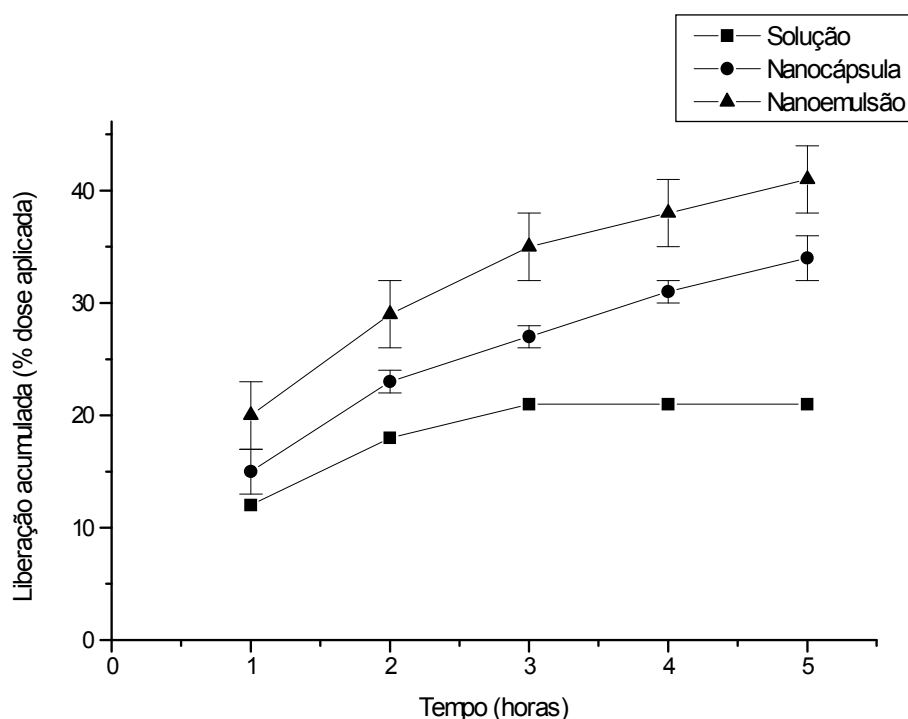


Figura 18: Perfil de liberação *in vitro* do AR a partir de nanocápsula, nanoemulsão e solução etanólica, através da membrana de nylon (0,22 μm)

A despeito das diferenças na matriz polimérica e porosidade das membranas, o perfil de liberação seguiu a mesma ordem: NE > NC > solução. A solução foi avaliada neste experimento a fim de se investigar a resistência oferecida pela membrana à difusão do AR. Assim, considerando que a solução representa a forma livre do fármaco, uma liberação rápida seria esperada se as membranas não fossem capazes de conferir resistência à sua difusão. No entanto, de forma inesperada, a liberação a partir da solução foi mais lenta do que aquela observada para a NE e NC. Isto pode ser atribuído à evaporação do etanol e, conseqüentemente, precipitação do AR. A presença de cristais de AR foi claramente observada no compartimento doador desta preparação. Esses estudos mostraram que a encapsulação do AR em NC e NE aumentou a difusão do fármaco lipofílico, se comparada com a solução alcoólica do AR livre. Alvarez-Román e colaboradores (2004b) encapsularam corante Nile Red (altamente lipofílico) em NC de PCL e compararam a liberação *in vitro* do corante com uma solução não-saturada do mesmo corante em propilenoglicol. Foi observada maior liberação do corante a partir da NC do que da solução em propilenoglicol. Esta diferença pode ser atribuída a uma combinação de fatores: a liberação do Nile Red a partir da NC é influenciada pelo particionamento do corante entre polímero-água e água-líquido receptor; diferenças na atividade termodinâmica do corante, a diferentes graus de saturação em cada formulação. Segundo esses autores, a atividade termodinâmica superior

do corante na NC aumenta o particionamento, uma vez que a NC poderia ser considerada como um sistema saturado.

Comparando-se as duas formulações (NE e NC), a liberação do AR a partir da NC foi mais lenta e sustentada do que aquela observada para a NE. A liberação do fármaco a partir da NC ocorre em duas fases: uma liberação rápida inicial seguida por um perfil de liberação sustentada. O primeiro estágio de liberação do AR mostrou um efeito de explosão inicial significativa, envolvendo a liberação de 61% e 21% da dose aplicada nas duas primeiras horas, para as membranas de Teflon e Nylon, respectivamente. Conforme Lamprecht e colaboradores (2002), esta liberação rápida pode ser descrita como uma dissolução imediata do fármaco adsorvido na superfície da partícula ou baseado no fato da acumulação do fármaco próximo à superfície da partícula, favorecendo sua liberação.

O polímero presente na interface óleo/água das NC (conforme Figura 19) proporcionou uma liberação controlada, quando comparada à NE. Portanto, a parede polimérica influenciou significativamente na liberação do fármaco a partir da NC, sugerindo que este é o passo limitante do processo de liberação do fármaco. Neste caso, a partição do AR entre as fases oleosa e aquosa e o volume relativo destas fases é menos determinante. A velocidade de dissolução do fármaco a partir de um sistema também é influenciada pelo tamanho da partícula, ou seja, a velocidade aumenta quando o tamanho da partícula diminui, devido ao aumento da área de superfície das partículas contendo fármaco (ZILI et al., 2005).

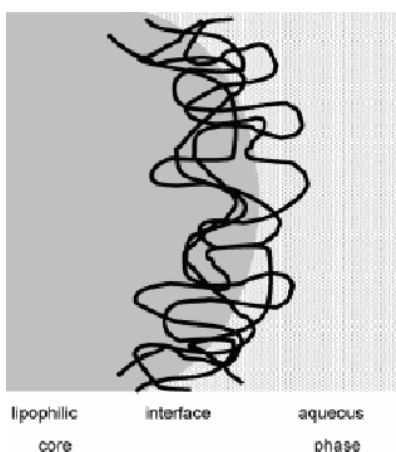


Figura 19: Modelo esquemático da interface da nanocápsula, mostrando a localização do polímero na interface entre o núcleo oleoso e a fase aquosa

Fonte: JÄGUER e colaboradores (2007)

Está descrito na literatura que fármacos são liberados por vários processos, tais como: difusão através da matriz da partícula, liberação por degradação polimérica e difusão do

fármaco através de microcanais que são formados por erosão. Nanocápsulas de poli- ϵ -caprolactona são afetadas pela degradação polimérica em 10 a 15 semanas, dependendo da presença e tipo de tensoativo (LAMPRECHT et al., 2002). Contudo, pode-se concluir que degradação polimérica não influencia a liberação do AR neste caso, uma vez que este estudo foi realizado com NC recentemente preparadas.

6 PERMEAÇÃO CUTÂNEA *IN VITRO*

6.1 Solubilidade do ácido retinóico no Líquido receptor

A solubilidade do AR no líquido receptor (tampão fosfato salina pH 7,4 (86) : álcool oléico 20 moles de óxido de etileno (4) : etanol 95% (10)) utilizado no estudo de permeação cutânea foi determinada previamente. A solubilidade do AR foi $379,4 \pm 0,2$ $\mu\text{g/mL}$.

6.2 Validação da remoção do AR não absorvido

A remoção do AR não absorvido, que não penetrou a pele, foi adequadamente realizada com a alternância do líquido receptor e água destilada, com posterior auxílio de cotonete umedecido e cotonete seco e extraído com metanol grau CLAE. A recuperação do AR foi $84,0 \pm 1,2\%$ ($n = 3$).

6.3 Validação da extração do AR retido na fita stripping

A extração do AR a partir da fita usada para fazer a remoção do estrato córneo (*stripping*) foi adequadamente realizada com a fase móvel. A recuperação do AR foi $83,4 \pm 1,2\%$ ($n = 3$).

6.4 Validação da extração do AR retido na pele

Os resultados obtidos revelam que a metodologia utilizada foi satisfatória para extrair o AR retido na pele sem estrato córneo. A recuperação foi $97,4 \pm 2,9\%$ ($n = 3$). Foi realizado o mesmo experimento de validação para o branco, a fim de se eliminar possíveis interferentes decorrentes da presença de retinóides endógenos na pele. No doseamento do branco, o líquido extrator não apresentou nenhum pico de absorção no mesmo tempo de retenção do

AR, confirmando que os retinóides endógenos não se encontravam em concentração suficiente para interferir no resultado do experimento.

6.5 Permeação cutânea *in vitro*

A habilidade de diferentes formulações contendo AR em liberar o fármaco dentro da pele foi investigada em condições não oclusivas, utilizando-se células de Franz. Esses estudos foram realizados com o objetivo de se avaliar a influência de diferentes nanocarreadores sobre a penetração cutânea do AR.

A permeação cutânea do AR não foi detectada para nenhuma das formulações (solução e NC) (Tabela 8). Em contraste, penetração cutânea do AR foi observada. A penetração do AR no estrato córneo e na pele (epiderme + derme) a partir da solução etanólica foi cerca de 8 vezes maior que aquela observada para NC. Isto pode ser explicado pelo efeito acelerador de penetração do etanol. Primeiramente, como solvente, ele pode aumentar a solubilidade do fármaco no veículo. Além disso, a permeação do etanol no estrato córneo pode alterar as propriedades de solubilidade no tecido, com um conseqüente aumento da partição do fármaco dentro da membrana. Ainda, durante os estudos de permeação, a perda de etanol, através de sua rápida permeação ou evaporação do solvente volátil, aumenta a concentração do fármaco, conduzindo a um estado supersaturado, modificando a atividade termodinâmica do fármaco na formulação (WILLIAMS & BARRY, 2004). O propilenoglicol utilizado na solução de AR também atua como acelerador de penetração.

Tabela 8: Penetração e permeação cutânea do AR (% dose aplicada e $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) a partir de nanocápsula e solução, através da pele intacta de orelha de porco, após 8 horas

Formulações ^a	Permeação	Penetração			
		Estrato córneo ^b		Epiderme + Derme	
		% dose aplicada	$\mu\text{g}/\text{cm}^2$	% dose aplicada	$\mu\text{g}/\text{cm}^2$
Solução	ND	$1,8 \pm 0,3$	$1,2 \pm 0,2$	$0,9 \pm 0,3$	$0,6 \pm 0,3$
Nanocápsula	ND	$0,2 \pm 0,1$	$0,12 \pm 0,0$	$0,12 \pm 0,1$	$0,1 \pm 0,0$

^aConcentração do AR foi de 1 e 0,84 mg/mL para Solução e Nanocápsula, respectivamente; formulações foram aplicadas sobre pele intacta de orelha de porco montadas em células de Franz;

^bEstrato córneo foi removido através de 10 *strippings*, utilizando-se fita adesiva (Book Tape nº 845, Scotch^{3M});

Cada valor representa média \pm DP (n = 3)

ND: abaixo do limite de detecção

Os resultados obtidos neste experimento estão de acordo com outros estudos previamente realizados. Montenegro e colaboradores (1996) observaram que a quantidade de AR

permeada através de membrana epidérmica (estrato córneo + epiderme) a partir de formulações lipossomais foi significativamente menor em relação à solução hidroalcoólica. Sinico e colaboradores (2005) observaram que a permeação do AR, através de pele de porco recém-nascido, a partir de solução hidroalcoólica foi maior do que aquela observada para lipossomas contendo AR. O maior transporte do AR através da pele foi obtido com a solução de etanol/água (1:1), como conseqüência da propriedade aceleradora de penetração do etanol. Liu e colaboradores (2007) obtiveram permeação apenas para a tintura de isotretinoína (isômero *cis* do AR), sendo que as nanopartículas lipídicas sólidas contendo isotretinoína, preparadas com diferentes concentrações de tensoativos, não permearam através da pele abdominal de ratos.

A permeação *in vitro* de fármacos de caráter lipofílico acentuado, que apresentam log do coeficiente de partição octanol/água ($\log P$) maiores do que 3, através da pele com espessura normal é significativamente diminuída (MOSER et al., 2001). Isto pode ser atribuído a barreira proporcionada pela camada hidrofílica representada pela derme. Considerando que o AR é um fármaco lipofílico ($\log P = 4,6$) (ABDULMAJED & HEARD, 2004), a ausência de permeação pode ser explicada por este fenômeno. Assim sendo, novos estudos de permeação foram conduzidos com pele dermatomada. A fim de se certificar que a barreira à permeação não é o estrato córneo, estudos com pele de espessura normal, mas sem estrato córneo (10 *strippings*), foram também conduzidos. Os dados podem ser observados na Tabela 9 e mostram claramente que a permeação do AR a partir da solução etanólica foi observada na pele dermatomada, mas não com a pele com espessura normal e sem estrato córneo, evidenciando a derme como barreira à permeação do AR.

Tabela 9: Permeação cutânea do AR (% dose aplicada e $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) a partir de solução etanólica^a, através da pele intacta sem estrato córneo^b (EC) e pele dermatomada^c, após 8h

Pele	Permeação	
	% dose aplicada	$\mu\text{g}/\text{cm}^2$
Pele intacta sem EC	ND	ND
Pele dermatomada	3,4	2,2

^aConcentração do AR foi de 1 mg/mL para solução; Solução foi aplicada sobre pele de orelha de porco espessura normal sem estrato córneo e pele dermatomada, montadas em células de Franz;

^bPele espessura normal, mas sem estrato córneo (removido através de 10 *strippings*, utilizando-se fita adesiva (Book Tape nº 845, Scotch^{3M});

^cDermatômetro 50 mm (NOUVAG AG TCM 3000, Suíça)

ND: abaixo do limite de detecção

Assim sendo, novos estudos de permeação foram conduzidos com pele dermatomada para comparar as diferentes formulações (solução, NC e NE). A permeação a partir da solução

(0,64 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) foi maior do que aquela observada para as duas outras formulações (NC e NE), nas quais a quantidade permeada foi abaixo do limite de detecção (Tabela 10). A penetração cutânea do AR (estrato córneo + epiderme + derme) a partir da NC (1,25 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) e NE (1,37 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) foi ligeiramente maior do que aquela observada para a solução (1,21 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). No entanto, as diferenças não foram estatisticamente significativas ($P > 0,05$).

Tabela 10: Penetração e permeação cutânea do AR (% dose aplicada e $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) a partir de solução, nanocápsula (NC) e nanoemulsão (NE) através de pele de orelha de porco dermatomada^b, após 8h

Formulações ^a	Permeação		Penetração	
	% dose aplicada	$\mu\text{g}/\text{cm}^2$	% dose aplicada	$\mu\text{g}/\text{cm}^2$
Solução	1,01 \pm 0,00	0,64 \pm 0,00	1,21 \pm 0,06	0,77 \pm 0,04
NC	ND	ND	1,25 \pm 0,33	0,75 \pm 0,20
NE	ND	ND	1,37 \pm 0,15	0,59 \pm 0,07

^aConcentração do AR foi de 1, 0,94 e 0,68 mg/mL para Solução, Nanocápsula e Nanoemulsão, respectivamente; formulações foram aplicadas sobre pele de orelha de porco dermatomada e montadas em células de Franz;

^bDermatômetro 50 mm (NOUVAG AG TCM 3000, Suíça)

Cada valor representa media \pm DP (n = 3)

ND: abaixo do limite de detecção

A ausência de permeação detectável com nanopartículas contendo AR neste estudo sugere que a encapsulação não facilita o transporte através da pele. Esses resultados estão de acordo com estudos prévios, que relataram que carreadores particulados de fármacos (micropartículas e nanopartículas) aumentam a residência do fármaco na pele sem aumentar o transporte transdérmico (ALVARÉZ-ROMÁN et al., 2004b). Alves e colaboradores (2007) mostraram que a nimesulida não foi detectada no compartimento receptor quando encapsulada em nanoesferas, nanocápsulas e nanoemulsão. Estes resultados estão de acordo com outros estudos, sugerindo que os nanocarreadores não favorecem o transporte transdérmico. Por outro lado, pode ser postulado que as reações adversas decorrentes da aplicação tópica do AR sejam menores no caso das formulações de NC e NE do que aquelas observadas para uma solução do fármaco.

Este comportamento também tem sido observado com outros sistemas carreadores. Jennings e colaboradores (2000) demonstraram que nanopartículas lipídicas sólidas contendo vitamina A efetivamente liberaram a vitamina em camadas superiores da pele, mas não favoreceram o aumento da concentração da vitamina A em camadas mais profundas da pele. Como discutido anteriormente, nanopartículas lipídicas sólidas contendo isotretinoína não permearam a pele abdominal de rato (LIU et. al., 2007).

Os carreadores coloidais apresentam vantagens para aplicação tópica, uma vez que a liberação sustentada é importante para suprir a pele com o fármaco por um período prolongado. O mecanismo de ação das nanopartículas pode ser atribuído à associação com a superfície da pele. O pequeno tamanho da partícula e a elevada área de superfície asseguram um maior contato com o estrato córneo. O agente encapsulado penetrando na pele viável facilita o transporte do fármaco por alterar o coeficiente de partição veículo/estrato córneo. A habilidade do fármaco em uma formulação tópica de permear a pele e exercer seu efeito depende de dois eventos consecutivos: o fármaco deve primeiro difundir do veículo para a superfície da pele e então deve permear essa barreira. A função dessas partículas é liberar um ingrediente ativo nas camadas superiores da pele e, em aplicações ótimas, prolongar o tempo no qual este fármaco permanece sobre a pele (ALVES et al., 2007).

CONCLUSÃO

CONCLUSÃO

O encapsulamento do ácido retinóico em nanocápsulas seria uma alternativa interessante para o tratamento tópico da acne vulgaris. Assim sendo, o objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento e a caracterização de nanocápsulas contendo AR e a avaliação da sua permeação cutânea *in vitro* através da pele de orelha de porco, comparada com sistemas convencionais.

A vetorização do AR em nanocápsulas poderia evitar o contato direto do fármaco com a pele, reduzindo processos de irritação no local da aplicação, além de controlar a liberação do fármaco, garantindo eficácia em tempo prolongado com menos reações adversas, e direcionar o fármaco no alvo específico da doença, o folículo piloso. A nanoencapsulação também poderia minimizar a degradação do AR pela luz, ar e calor.

NC brancas e contendo AR foram obtidas e caracterizadas. A preparação da NC foi conduzida por um método simples e de fácil execução. Estas preparações apresentaram aspecto leitoso, característico de suspensão coloidal. O diâmetro médio obtido das partículas se manteve na faixa de 200 a 300 nm. As formulações de NC também foram caracterizadas através da determinação do Potencial Zeta. Os valores obtidos foram similares aqueles previamente relatados para NC preparadas com o mesmo polímero. A morfologia externa das nanocápsulas foi visualizada por microscopia de força atômica, comprovando a existência de um núcleo oleoso central, envolto por uma membrana polimérica, que é capaz de se deformar quando depositado sobre uma superfície. A taxa de encapsulação do AR em NC foi alta (~90%) e foi independente do tensoativo usado para o preparo destes sistemas. Estes dados confirmam que o sistema de vetorização escolhido, nanocápsula, é indicado para fármacos extremamente lipofílicos, tais como o AR, que apresentam boa solubilidade no núcleo oleoso. As NC brancas e contendo AR se mostraram estáveis, quanto ao tamanho, potencial zeta e índice de polidispersão, quando armazenadas por até 45 dias a temperatura ambiente. O teor de AR decaiu até 40% em 30 dias, na presença de sistema antioxidante. Desta forma, uma abordagem mais profunda a cerca da estabilidade do AR em NC deve ser proposta, com o intuito de se solucionar problemas de degradação do fármaco, viabilizando a possível utilização futura da nanocápsula desenvolvida no campo farmacêutico.

O estudo de liberação *in vitro* obtido para as nanocápsulas delineou um perfil de liberação sustentada. A liberação do AR a partir da NC foi menor do que aquela observada a partir de uma nanoemulsão e foi independente da matriz polimérica e porosidade das membranas utilizadas nestes estudos de liberação.

Os experimentos de permeação foram conduzidos com pele intacta, sem estrato córneo e dermatomada. Na pele intacta, não foi observada permeação do AR a partir da solução alcoólica e da NC. Em contraste, a penetração cutânea (estrato córneo e epiderme + derme) a partir da solução etanólica foi cerca de 8 vezes maior que aquela observada para NC. Isto pode ser explicado pelo efeito acelerador de penetração do etanol. Em pele dermatomada, a permeação a partir da solução foi maior do que aquela observada a partir da NC e NE, enquanto que penetração cutânea (epiderme + derme) foi similar para todas as formulações avaliadas (NC, NE e solução).

O conjunto dos dados obtidos mostrou que a encapsulação do AR em NC permitiu penetração do fármaco na pele com ausência de permeação através da pele intacta e dermatomada, o que sugere que a encapsulação não facilita o transporte do fármaco através da pele. Sendo assim, a NC garante a biodisponibilidade local e tem potencial para reduzir reações adversas ocorridas com a entrada do fármaco na derme. As nanocápsulas representam uma alternativa interessante para aumento da penetração do AR em camadas superiores da pele, impedindo a permeação cutânea indesejável.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

^aABDELWAHED, W.; DEGOBERT, G.; FESSI, H. A pilot of freeze drying of poly(epsilon-caprolactone) nanocapsules stabilized by poly(vinyl alcohol): Formulation and process optimization. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 309, p. 178-188, 2006.

^bABDELWAHED, W.; DEGOBERT, G.; STAINMESSE, S.; FESSI, H. Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process and storage considerations. *Advanced Drug delivery Reviews*, v. 58, p. 1688-1713, 2006.

^cABDELWAHED, W.; DEGOBERT, G.; FESSI, H. Investigation of nanocapsules stabilization by amorphous excipients during freeze-drying and storage. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 63, p. 87-94, 2006.

ABDULMAJED K.; HEARD C. M. Topical delivery of retinyl ascorbate co-drug 1. Synthesis, penetration into and permeation across human skin. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 280, p. 113-124, 2004.

ALONSO, M. J. Nanoparticulate drug carrier technology. In: COHEN, S. BERNSTEIN, H. Microparticulate systems for the delivery of proteins and vaccines. New York: Marcel Dekker, c1996. Cap. 7, p. 203-242.

ALVAREZ-ROMÁN, R.; BARRÉ, G.; GUY, R. H.; FESSI, H. Biodegradable polymer nanocapsules containing a sunscreen agent: preparation and photoprotection. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 52, p. 191-195, 2001.

^aALVAREZ-ROMÁN, R.; NAIK, A.; KALIA, Y. N.; GUY, R. H.; FESSI, H. Skin penetration and distribution of polymeric nanoparticles. *Journal of Controlled Release*, v. 99, p. 53-62, 2004.

^bALVAREZ-ROMÁN, R.; NAIK, A.; KALIA, Y. N.; GUY, R. H.; FESSI, H. Enhancement of topical delivery from biodegradable nanoparticles. *Pharmaceutical Research*, v. 21 (10), p. 1818-1825, 2004.

ALVES, M. P.; SCARRONE A. L.; SANTOS M.; POHLMANN A. R.; GUTERRES S. S. Human skin penetration and distribution of nimesulide from hydrophilic gels containing nanocarriers. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 341, p. 215-220, 2007.

ASSIS, D. N.; MOSQUEIRA, V. C. F.; VILELA, J. M. C.; ANDRADE, M. S.; CARDOSO, V. N. Release profiles and morphological characterization by atomic force microscopy and photon correlation spectroscopy of ^{99m}Tc -Technetium-fluconazole nanocapsules. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 349, p. 152-160, 2007.

BARRATT, G. Colloidal drug carriers: achievements and perspectives. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 60, p. 21-37, 2003.

BARRY, B. W. Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 14, p. 101-114, 2001.

BERSHAD, S. Development in topical retinoid therapy for acne. *Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery*, v. 20, n. 3, p. 154-161, 2001.

BILLOW, J. A. Acne products. In: *Handbook of non prescription drugs*, 11a edition, Washington, p. 569-578, 1996.

BLOUZA, I. L.; CHARCOSSET, C.; SFAR, S.; FESSI, H. Preparation and characterization of spironolactone-loaded nanocapsules for pediatric use. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 325, p. 124-131, 2006.

BRITISH pharmacopeia: 2005. London: The Stationary Office, 2005. 5 v.

BROWN, S. K.; SHALITA, A. R. Acne vulgaris. *The Lancet*, v. 351, p. 1871-1876, 1998.

CHANDRA, R.; RUSTGI, R. Biodegradable polymers. *Progress in Polymer Science*, v. 23, p. 1273-1335, 1998.

CHIEN, Y. W. Controlled- and modulated-release drug delivery systems. In: SWARBRICK, J.; BOYLAN, J. C. *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*. New York: Marcel Dekker, INC. 1994, v.3, p. 281-313.

CONTRERAS, M. J. F.; SORIANO, M. M. J.; DIÉGUEZ, A. R. In vitro percutaneous absorption of all-*trans* retinoic acid applied in free form or encapsulated in stratum corneum lipid liposomes. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 297, p. 134-145, 2005.

COUVREUR, P. et al. Nanoparticles: preparation and characterization. In: BENITA, S. *Microencapsulation: methods and industrial applications*, New York: Marcel Dekker, 1996. 640 p.

CUNLIFFE, W. J.; HOLLAND, D. B.; CLARK, S. M. STABLES, G. I. Comedogenesis: some aetiological, clinical and therapeutic strategies. *Dermatology*, v. 206, p. 11-16, 2003.

DEL ROSSO, J. Q. The role of the vehicle in combination acne therapy. *Cutis*, v. 76, p. 15-18, 2005.

ENGLERT, G. E.; LEON, A.; TESSELE, F.; LOCATELLI, C. Atomic Force Microscopy – Scanning Electron Microscopy: comparative evaluation o solid surfaces. *Acta Microscopica*, v. 12. n. 1, p. 107-110, 2003.

FEDERMAN, D. G.; KIRSNER, R. S. Acne Vulgaris: pathogenesis and therapeutic approach. *The American Journal of Managed Care*, v. 6. n.1, p. 78-89, 2000.

FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J. P. AMMOURY, N.; BENITA, S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *International Journal of Pharmaceutical*, v. 55, p. R1-R4, 1989.

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

GOLLNICK, H.; CUNLIFFE, W.; DIANE, B.; DRENO, B.; FINLAY, ^a; LEYDEN, J. J.; SHALITA, A. R.; THIBOUTOT, D. Management of acne: a report from a global alliance to improve outcomes in acne. *Journal of American Academy of Dermatology*, v. 49, p. 1-38, 2003.

JÄGER, A.; STEFANI, V.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R. Physico-chemical characterization of nanocapsules polymeric wall using fluorescent benzazole probes. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 338, p. 297-305, 2007.

JAIN, S. Topical tretinoin or adapalene in acne vulgaris: an overview. *Journal of Dermatological Treatment*, v. 15, p. 200-207, 2004.

JAIN, R.; SHAH, H. N.; MALIK, A. W.; RHODES, T. C. Controlled drug delivery by biodegradable poly(ester) devices: different preparative approaches. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 124 (8), p. 703-727, 1998.

JENNING, V.; GYSLER, A.; SCHÄFER-KORTING, M.; GOHLA, S. H. 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, 2000.

JIMENEZ, M. M.; PELLETIER, J.; BOBIN, M. F.; MARTÍN, M. C. Influence of encapsulation on the in vitro percutaneous absorption of octyl methoxymate. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 272, p. 45-55, 2004.

KANG, S. The mechanism of action of topical retinoids. *Cutis*, v. 75, p. 10-13, 2006.

KORECK, A.; PIVARCSI, A.; DOBOZY, A.; KEMÉNY, L. The role of innate immunity in the pathogenesis of acne. *Dermatology*, Basel, v. 206, p. 96-105, 2003.

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

LADEMANN J.; OTBERG N.; RICHTER H.; WEIGMANN H. J.; LINDEMANN U.; SCHAEFER H.; STERRY W. Investigation of follicular penetration of topically applied substances. *Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology*, v. 14, p. 17-22, 2001.

LADEMANN J.; RICHTER H.; TEICHMANN A.; OTBERG N.; BLUME-PEYTAVI U.; LUENGO J.; WEIB B.; SCHAEFER U. F.; LEHR C. M.; WEPF R.; STERRY W. Nanoparticles – An efficient carrier for drug delivery into the hair follicles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 66, p. 159-164, 2007.

LADEMANN J.; WEIGMANN H. J.; RICKMEIER C.; BARTHELMES H.; SCHAEFER H.; MUELLER G.; STERRY W. Penetration of titanium dioxide microparticles in a sunscreen formulation into the horny layer and the follicular orifice. *Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology*, v. 12, p. 247-256, 1999.

LAMPRECHT, A.; BOULIGAND, Y.; BENOIT, J. P. New lipid nanocapsules exhibit sustained release properties for amiodarone. *Journal of Controlled Release*, v. 84, p. 59-68, 2002.

LANGER, R. Drug delivery and targeting. *Nature*, v. 392, supp., p. 5-10, 1998.

LBOUTOUNNE, H.; CHAULET, J. F.; PLOTON, C.; FALSON, F.; PIROT, F. Sustained ex vivo skin antiseptic activity of chlorhexidine in poly-(ϵ -caprolactone) nanocapsule encapsulated form and as a digluconate. *Journal of Controlled Release*, v. 82, p. 319-334, 2002.

LBOUTOUNNE, H.; FAIVRE, V.; FALSON, F.; PIROT, F. Characterization of transport of chlorhexidine-loaded nanocapsules through hairless and wistar rat skin. *Skin Pharmacology and Physiology*, v.17, p. 176-182, 2004.

LEGRAND, P.; BARRATT, G.; MOSQUEIRA, V.; FESS-I, H.; DEVISSAGUET, J. P. Polymeric nanocapsules as drug delivery systems. *S.T.P. Pharma Sciences*, v. 9, n. 5, p. 411-418, 1999.

LEITE, E. A. Nanocápsulas de Poli- ϵ -Caprolactona contendo Halofantrino: Desenvolvimento, caracterização e estudo de cardiotoxicidade. 2006. (Dissertação de Mestrado em Ciências Biológicas) – Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas – Universidade Federal de Ouro Preto. 2006.

LEITE, E. A.; GRABE-GUIMARÃES, A.; GUIMARÃES, H. N.; MACHADO-COELHO, G. L. L.; BARRAT, G.; MOSQUEIRA, V. C. F. Cardiotoxicity reduction induced by halofantrine entrapped in nanocapsule devices. *Life Sciences*, v. 80, p. 1327-1334, 2007.

LEITE, E. A.; VILELA, J. M. C.; ANDRADE, M. S. Poly-caprolactone nanocapsules morphological features bu atomic force microscopy. *Microscopy and Microanalysis*, v. 11, p. 48-51, 2005.

LEMOINE, D.; FRANÇOIS, C.; KEDZIEREWICZ, F.; PREAT, V.; HOFFMAN, M.; MAINCET, P. Stability study of nanoparticles of poly(ϵ -caprolactone), poly(D,L-lactide) and poly(D,L-lactide-co-glycolide). *Biomaterials*, v. 17, p. 2191-2197, 1996.

LETCHEFORD, K.; BURT, H. A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 65, p. 259-69, 2007.

LEYDEN, J. J. A review of the use of combination therapies for the treatment of acne vulgaris. *Journal of American Academy of Dermatology*, v. 49, p. 200-210, 2003.

LIMA, K. M. Encapsulamento de antígenos de *Leishmania major* em microesfera de ácido láctico e co-polímeros: caracterização e estudo da resposta imune. Belo Horizonte: FAFAR-UFMG, 1998, 160p (Dissertação, Mestrado em Ciências Farmacêuticas)

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.

MAGENHEIM, B.; BENITA, S. Nanoparticle characterization: a comprehensive physicochemical approach. *STP Pharma Sciences*, v. 4, p. 221-241, 1991.

MANCONI, M.; SINICO, C.; VALENTI, D.; LAI, F.; FADDA, A. M. Niosomes as carriers for tretinoin III. A study into the in vitro cutaneous delivery of vesicle-incorporated tretinoin. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 311, p. 11-19, 2006.

MERKLI, A.; TABATABAY, C.; GURNY, R.; SÉLLER, J. Biodegradable polymers for the controlled release of ocular drugs. *Progress in Polymer Science*, v. 23, p. 563-580, 1998.

MILLIKAN, L. E. Adapalene: an update on newer comparative studies between the various retinoids. *International Journal of Dermatology*, v. 39, p. 784-788, 2000.

MONTASSER, I.; FESSI, H.; COLEMAN, A. W. Atomic force microscopy imaging of novel type of polymeric colloidal nanostructures. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 54, p. 281-284, 2002.

MONTENEGRO, L.; PANICO, A. M.; VENTIMIGLIA, A.; BONINA, F. P. In vitro retinoic acid release and skin permeation from different liposome formulations. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 133, p. 89-96, 1996.

MORDON S.; SUMIAN C.; DEVOISSELLE J. M. Site-specific methylene blue delivery to pilosebaceous structures using highly porous nylon microspheres: an experimental evaluation. *Lasers in Surgery and Medicine*, v. 33, p. 119-125, 2003.

MOSER, K.; KRIWET, K.; NAIK, A.; KALIA, Y. N.; GUY, R. H. Passive skin penetration enhancement and its quantification in vitro. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 52, p. 103-112, 2001.

MOSQUEIRA, V. C. F.; LEGRAND, P.; BARRATT, G. Surface-modified and conventional nanocapsules as novel formulations for parenteral delivery of halofantrine. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, v.6, p. 1-10, 2006.

MOSQUEIRA, V. C. F.; LEGRAND, P. PINTO-ALPHANDARY, H. PUISIEUX, F.; BARRAT, G. Poly-(D,L-lactide) nanocapsules prepared by a solvent displacement process: influence of the composition on physicochemical and structural properties. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 89, n. 5, p. 614-626, 2000.

MÜLLER-GOYMANN, C. C. Physicochemical characterization of colloidal drug delivery systems such as reverse micelles, vesicles, liquid crystals and nanoparticles for topical administration. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 58, p. 343-356, 2004.

NAIK, A.; KALIA, Y. N.; GUY, R. H. Transdermal drug delivery: overcoming the skin's barrier function. *Pharmaceutical Science and Technology Today*, v. 3, p. 318-326, 2000.

NEVES, B. R. A.; VILELA, J. M. C.; ANDRADE, M. S. Microscopia de varredura por sonda mecânica: uma introdução. *Cerâmica*, v. 44, n. 290, p. 212-219, 1998.

NG, M.; GILL, C. L.; GILL, M. A. Treatment of acne. *Journal Ce*. p. 1-13. 2003.

PIRES, M. A. S. Utilização de sistemas poliméricos nanodispersos para obtenção de matrizes de comprimidos de liberação prolongada contendo pirazinamida: preparo, caracterização e cinética de liberação. 1998. (Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Minas Gerais. 1998.

QUIGLEY, J. W.; BUCKS, D. A. W. Reduced skin irritation with tretinoin containing polyolprepolymer-2, a new topical tretinoin delivery system: A summary of preclinical and clinical investigations. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 35, n. 4, p. S5-S10, 1998.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RIGOPOULOS, D.; IOANNIDES, D.; KALOGEROMITROS, D.; KATSAMAS, A. D. Comparison of topical retinoids in the treatment of acne. *Clinics in Dermatology*, v. 22, p. 408-411, 2004.

ROBERTS, M. Targeted drug delivery to the skin and deeper tissues: role of physiology, solute structure and disease. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, v. 24, p. 874-879, 1997.

RUBE, A.; HAUSE, G.; MADER, K.; KOHLBRECHER, J. Core-shell structure of Miglyol/poly(D,L-lactide)/Poloxamer nanocapsules studied by small-angle neutron scattering. *Journal of Controlled Release*, v. 107, p. 244-252, 2005.

SCHAFFER-KORTING, M.; MEHNERT, W.; KORTING, H. Lipid nanoparticles for improved topical application of drugs for skin diseases. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 59, p. 427-443, 2007.

SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S.; FREITAS, L. L. POHLMANN, A. R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Química Nova*, v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003.

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.

SHALITA, R. A. Clinical aspects of acne. *Dermatology*, v. 196, p. 93-94. 1998.

SHIM, J.; KANG, H. S. K.; PARK, W. S.; HAN, S. H.; KIM, J.; CHANG, I. S. Transdermal delivery of minoxidil with block copolymer nanoparticles, *Journal of Controlled Release*, v. 97, p. 477-484, 2004.

SINICO, C.; MARCONI, M.; PEPPI, M.; LAI, F.; VALENTINI, D.; FADDA, A. M. Liposomes as carriers for dermal delivery of tretinoin: in vitro evaluation of drug permeation and vesicle-skin interaction. *Journal of Controlled Release*, v. 103, p. 123-136, 2005.

SORG, O.; ANTILLE, C.; KAYA, G.; SAURAT, J. H. Retinoids in cosmeceuticals. *Dermatologic Therapy*, v. 19, p. 289-296, 2006.

SUMIAN C. C.; PITRE F. B.; GAUTHIER B. E.; BOUCLIER M.; MORDON S. R.; A new method to improve penetration depth of dyes into follicular duct: potential application for laser hair removal. *Journal of American Academy of Dermatology*, v. 41, p. 172-5, 1999.

SWEETMAN, Sean C. Martindale: the complete drug reference. 34th ed. London: 2005, 2756 p.

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

TEWA-TAGNE, P.; BRIAÇON, S.; FESSI, H. Preparation of redispersible dry nanocapsules by means of spray-drying: development and characterization. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 30, p. 124-135, 2007.

THIELITZ, A.; KRAUTHEIM, A.; GOLLNICK, H. Update in retinoid therapy of acne. *Dermatologic Therapy*, v. 19, p. 272-279, 2006.

TOLL R.; JACOBI U.; RICHTER H.; LADEMANN J.; SCHAEFER H.; BLUME-PEYTAVI. Penetration profile of microspheres in follicular targeting of terminal hair follicles. *The Journal of Investigative Dermatology*, v. 123, p. 168-176, 2004.

WADE, A.; WELLER, P. J. Handbook of Pharmaceutical Excipients. 3. ed. Washington: American Pharmaceutical Association, 2000, 665 p.

WEBSTER, G. H. Topical tretinoin in acne therapy. *Journal of the Academy of Dermatology*, v.39, p. S38-S44, 1998.

WEBSTER, G. Mechanism-based treatment of acne vulgaris: the value of combination therapy. *Journal of Drugs in Dermatology*, v 4, n. 3, p. 281-288, 2005.

WILLIAMS, A. C.; BARRY, B. W. Penetration enhancers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 56, p. 603-618, 2004.

YAMAGUCHI, Y. et al. Successful treatment of photo-damaged skin of nano-scale atRA particles using a novel transdermal delivery. *Journal of Controlled Release*, v. 104, p. 29-40, 2005.

YIH, T. C.; AL-FANDI, M. Engineered nanoparticles as precise drug delivery systems. *Journal of Cellular Biochemistry*, v. 97, p. 1184-1190, 2006.

ZILI, Z.; SFAR, S.; FESSI, H. Preparation and characterization of poly- ϵ -caprolactone nanoparticles containing griseofulvin. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 294, p. 261-267, 2005.