



Universidade Federal de Goiás

Faculdade de Farmácia

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**Desenvolvimento e Caracterização de Nanocápsulas  
Poliméricas contendo Isotretinoína**

Patrícia Ribas Teixeira

**Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Eliana Martins Lima**

Goiânia

2007

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



Universidade Federal de Goiás

Faculdade de Farmácia

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**Desenvolvimento e Caracterização de Nanocápsulas  
Poliméricas contendo Isotretinoína**

Patrícia Ribas Teixeira

**Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Eliana Martins Lima**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas como requisito parcial para a obtenção do Grau de Mestre.

Goiânia

2007

***Você está vivo. Esse é o seu espetáculo. Só quem se mostra se encontra. Por mais que se perca no caminho. (Cazuza)***

## **Agradecimentos**

À minha família pela paciência e compreensão durante minha ausência

À Lidiana, Carol e Zaine pelo apoio dado nas horas que precisei;

À profa. Dra. Eliana Martins Lima pela orientação e pela grande oportunidade de aprendizado;

À profa. Dra. Nereide S.S. Magalhães e sua equipe pela receptividade em seu laboratório e grande contribuição ao meu aprendizado;

À amiga Danielle pela sua amizade e grande contribuição dada a esse trabalho;

À toda equipe do laboratório de tecnologia farmacêutica pelo companheirismo durante as duras rotinas de trabalho;

Aos colaboradores da farmácia Biorgânica pela demonstração de competência em minha ausência;

Dedico também este trabalho aos meus avôs, Olavo e Absay, aos queridos Zuza, Antonieta e Eliane Quinan, todos vítimas do câncer.

## **Abstract**

This study describes the acquisition and formulation optimization of a system nano-reservoir stable, with nanocapsules containing the biocompatible and biodegradable polyester, poly-lactic acid (PLA) and poly-lactic acid-co-glicólideo (PLGA 50:50), obtained through the method of deposition of polymer preformed at the interface, proposed by Fessi et al, in 1989.

There were determined characteristics of various formulations of these nanoparticles containing the drug isotretinoin, such as size and PDI, zeta potential, physical and chemical stability of the dispersion +4°C, between the comparative photomicrographs dispersions, efficiency of encapsulation and release profile of the kinetics *in vitro*, establishing parameters to standardize the best formulation, the method of preparation and the direct influence of these factors in obtaining sizes average less than 200nm and PDI's close to 0,1. It was possible to reach a reproducible formulation, a methodology to separate the fractions of drug encapsulated and free and the measurement of drug encapsulated with further evaluation of maximum efficiency of encapsulation that was obtained with about 99% for a theoretical concentration of 0,5 mg/mL of isotretinoin encapsulated.

The stability of the encapsulated drug was evaluated and compared to free drug, before direct exposure to UVA rays at certain intervals of time.

As well as the dispersion of nanocapsules containing isotretinoin was stored at +4°C and its stability monitored successfully for 5 months.

# Sumário

## Conteúdo

1.1. SISTEMAS DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS .....	15
1.2 MICRO/ NANOENCAPSULAÇÃO .....	18
1.2.1 Histórico .....	18
1.2.2 Aplicações .....	19
1.2.3 Micropartículas e Nanopartículas poliméricas .....	20
1.2.3.1 MÉTODOS DE OBTENÇÃO DE SISTEMAS NANOENCAPSULADOS.....	21
1.2.3.1.1 METODO DE PREPARAÇÃO DAS NANOCÁPSULAS BIODEGRADÁVEIS POR DEPOSIÇÃO INTERFACIAL DE POLIMERO PRÉ-FORMADO.....	23
1.3. COMPONENTES DA FORMULAÇÃO DE NANOCÁPSULAS .....	24
1.3.1 Polímeros.....	24
1.3.2. Fosfatidilcolina.....	29
1.3.3. Óleo vegetal biocompatível: Óleo de soja.....	30
1.4 ISOTRETINOINA (ÁCIDO 13-CIS-RETINÓICO).....	31
1.4.1 Estrutura Química [C <sub>20</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub> ] PM 300.4.....	31
1.4.2 Mecanismo de ação .....	33
1.4.3 Farmacocinética .....	33
1.4.4 Usos Terapêuticos / Doses: .....	34
1.4.5 Efeitos Adversos .....	36
1.4.6 Retinóides em nanocarreadores de fármacos .....	37
2.0 OBJETIVOS.....	38
3.0 MATERIAIS E METODOS .....	39
3.1 Materiais.....	39
3.1.1 Componentes da formulação.....	39

3.1.2 Equipamentos .....	39
3.1.3 Utensílios.....	40
3.1.4 Outros reagentes .....	40
3.2 Métodos.....	41
3.2.1 MÉTODO DE PREPARAÇÃO DAS NANOCÁPSULAS .....	41
3.2.1.1. Incorporação da isotretinoína nas nanocápsulas .....	43
3.2.2 Estabilidade físico-química (envelhecimento acelerado das dispersões de nanocápsulas) .....	45
3.2.3. Tamanho médio da partícula e Índice de polidispersibilidade (PDI).....	46
3.2.4. Estabilidade físico-química (envelhecimento em longo prazo das dispersões de nanocápsulas) .....	47
3.2.5 Eficiência de Encapsulação.....	49
3.2.5.1 Curva de Calibração .....	50
3.2.5.2 Epectros de varredura de absorção UV efetuado no espectrofotômetro de cada componente da formulação de nanocápsulas de isotretinoína. ....	51
3.2.5.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	53
3.2.6 Cinética de Liberação in vitro .....	53
3.2.7 Ensaios de fotodegradação da isotretinoína livre e encapsulada sob exposição à radiação UVA 365nm a 25°C .....	55
4.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	56
4.1. Otimização da formulação de nanocápsulas com incorporação da isotretinoína.....	56
4.2. Teste de Estabilidade para envelhecimento acelerado das nanocápsulas de isotretinoína.....	57
4.3 Carga da Superfície da Partícula (Potencial Zeta - $\xi$ ) .....	60
4.4 Tamanho médio das partículas e Índice de Polidispersibilidade (PDI) .....	61
4.4.1. Avaliação do tamanho médio e PDI das populações obtidas no precipitado e sobrenadante das dispersões após centrifugação e nas dispersões de nanocápsulas com formulação 4 e 6, preparadas com gotejamento G22 e G23 respectivamente. ....	68
4.5 Aspectos microscópicos das dispersões das nanocápsulas contendo isotretinoína .....	72
4.6 Estabilidade em longo prazo da dispersão de NC-ISO, fórmula 6.....	75



4.7 Eficiência de Encapsulação .....	78
4.7.1 Separação das frações de fármaco livre e encapsulado para cálculo da eficiência de encapsulação.....	80
4.8 Cinética de liberação <i>in vitro</i> da formulação 6 de nanocápsulas de PLA contendo isotretinoína.....	82
4.9 Ensaio de Fotodegradação de isotretinoína livre e encapsulada (NC ISO 6) sob exposição à radiação UVA de 365nm a 25°C.....	84
5.0 CONCLUSÕES.....	86
6.0 REFERÊNCIAS .....	88

## Lista de abreviaturas e siglas

Abs	- Absorbância
EE	- Eficiência de encapsulação
FE	- Fração encapsulada
FL	- Fármaco Livre
FDA	- Food and Drug Administration
PC	- Fosfatidilcolina
TP	- Tampão
ISO	- Isotretinoína
NC-ISO	- Nanocápsulas contendo Isotretinoína
PA	- Grau Absoluto
Ci	- Concentração inicial
Vi	- Volume Inicial
Cf	- Concentração final
Vf	- Volume final
PDI	- Índice de Polidispersibilidade
PLA	- Poli (ácido D,L- Lático)
PLGA	- Poli (D,L- Lático)-co-Glicolideo
UV	- Ultravioleta
VIS	- Visível
CLAE	-Cromatografia Líquida de alta eficiência

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Possíveis mecanismos físicos de liberação controlada do fármaco através de sistemas poliméricos ( <a href="http://drugdel.com/polymer.htm">http://drugdel.com/polymer.htm</a> ).....	17
Figura 2. Diferenças morfológicas entre microesfera e nanoesfera (sistema polimérico matricial) (A) e microcapsula e nanocápsula (sistema polimérico reservatório) (B) ( <a href="http://www.canalu.fr/canalu/img">www.canalu.fr/canalu/img</a> ).....	20
Figura 3. Estrutura química da fosfatidilcolina.....	29
Figura 4. Fórmula estrutural do retinol e retinóides de primeira geração (MARCUS & COULSTON, 2003).....	32
Figura 5. Método de fabricação das nanocápsulas poliméricas contendo isotretinoína. ....	42
Figura 6. Curva de calibração da isotretinoína. $ABS = 112,38035 * Conc. + 0,15221$ ....	50
Figura 7. Espectros de varredura de absorção no UV de cada componente da formulação de nanocápsulas. Isotretinoína (azul escuro), tampão fosfato pH 7,4 (azul claro), fosfatidilcolina (vermelho), óleo de soja (marron), Poloxamer 188 (verde escuro), Nanobranca (verde claro). ....	51
Figura 8. Separação das frações de nanocápsulas e fármaco livre através da coluna de gel de Sephadex®, pelo método de exclusão por tamanho. ....	52
Figura 9. Tamanho e distribuição de tamanho da amostra NC-ISO 6 submetida a ciclos de congelamento e descongelamento. Em vermelho: antes do primeiro congelamento, verde: após 10 ciclos, azul: 15 ciclos e preto: 30 ciclos. ....	59
Figura 10. Fotomicrografia da dispersão NC-ISO 6 após 30 ciclos de congelamento/descongelamento. Presença de aglomerados, ausência de cristais alaranjados de isotretinoína.....	60
Figura 11. Comparação entre a distribuição de tamanho das formulações obtidas através do gotejamento G23 nas preparações de nanocápsulas com D,L-PLA contendo isotretinoína 0,5mg/mL (azul) e nanobranca (verde), e PLGA 50:50 contendo isotretinoína 0,5mg/mL (vermelho) e nanobranca (preto). ..	62
Figura 12. Comparação da distribuição da distribuição de tamanho entre três amostras de nanocápsulas de isotretinoína 0,5mg/mL, obtidas com gotejamento G22 (Tabela 8). ....	63

Figura 13. Distribuição de tamanho das 8 amostras de nanocápsulas de isotretinoína 0,5 mg/mL, obtidas com a mesma formulação 6 e gotejamento G23. (Tabela 9). .....	64
Figura 14. Distribuição de tamanho da amostra (A) na fase de emulsão (vermelho) e dispersão de nanocápsulas (verde).....	66
Figura 15. Distribuição de tamanho da amostra (B) na fase de emulsão (vermelho) e dispersão de nanocápsulas (verde).....	66
Figura 16. Distribuição de tamanho antes e após centrifugação, dispersão (vermelho), sobrenadante (verde) e precipitado ressuspenso (azul), da formulação 4 (G22). .....	70
Figura 17. Distribuição de tamanho antes e após centrifugação, dispersão (verde), sobrenadante (azul) e precipitado ressuspenso (vermelho), da formulação 6 (G23). .....	70
Figura 18. Fotomicrografia do precipitado ressuspenso da amostra NC-ISO 6.....	71
Figura 19. Fotomicrografia da amostra NC-ISO 1 (1,0mg/mL) PLGA 50:50, obtida por gotejamento sem agulha, exibindo cristal de isotretinoína. ....	73
Figura 20. Fotomicrografia da amostra NC-ISO 2 (0,5mg/ml) PLGA 50:50, obtida por gotejamento sem agulha, exibindo inúmeras partículas micrométricas.....	73
Figura 21. NC ISO 4 (0,5mg/mL) D,L-PLA Gotejamento G22, exibindo inúmeras partículas micrométricas.....	74
Figura 22. Fotomicrografia da amostra NC-ISO 8 (0,7mg/mL) obtida com D,L-PLA por gotejamento G23, exibindo cristal de isotretinoína. ....	74
Figura 23. Fotomicrografia da amostra NC-ISO 6, obtida com D,L-PLA ( 0,5mg/mL) e por gotejamento G23, exibindo raras partículas micrométricas.....	75
Figura 24. Distribuição de tamanho da dispersão NC-ISO 6 durante o armazenamento em geladeira (4°C ± 1,0), após a fabricação (vermelho), 15 dias (verde claro), 30 dias (azul), 45 dias (preto), 60 dias (rosa escuro), 90 dias (rosa claro), 120 dias (marrom) e 150 dias (verde escuro). .....	77
Figura 25. Fotomicrografia da amostra NC-ISO 6 após 150 dias de fabricação com presença de aglomerados. ....	77
Figura 26. Separação das frações de nanocápsulas contendo fármaco encapsulado e fármaco livre através da coluna de vidro com Sephadex G50®. ....	80
Figura 27. Perfil de eluição das frações de fármaco encapsulado e livre a partir de alíquota da amostra NC-ISO 6.....	81

- Figura 28. Cinética de liberação (%) in vitro da isotretinoína encapsulada em nanocápsulas de PLA fórmula 6, ao longo do tempo (0 - 24horas).....83
- Figura 29. Comparação entre a cinética de fotodegradação da isotretinoína encapsulada (azul) e livre (rosa) sob exposição à luz UVA ao longo de 0 a 8 horas.....85

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Propriedades físico-químicas dos polímeros biodegradáveis D,L- PLA e PLGA para a fabricação das nanocápsulas (KIBBE, 2000).....	26
Tabela 2: Especificações e características físico-químicas do Poloxamer 188® (polietileno-propilenoglicol-copolímero) (KIBBE, 2000; Basf, 2004) .....	28
Tabela 3: Propriedades físico-químicas do óleo de soja .....	31
Tabela 4: Formulações de nanocápsulas com PLGA 50:50 e PLA contendo isotretinoína (NC-ISO) obtidas com diferentes diâmetros das gotículas durante a fase de preparação da emulsão. ....	44
Tabela 5: Resultados dos ensaios de estabilidade acelerada das nanocápsulas de PLGA 50:50 e PLA contendo isotretinoína .....	58
Tabela 6: Potencial Zeta de nanocápsulas de PLGA 50:50 sem isotretinoína, com isotretinoína e isotretinoína livre (Dados obtidos no equipamento ZetaSizer do Departamento de Física da UFPE).....	61
Tabela 7: Comparação entre a média de tamanho das partículas ( $\emptyset$ médio) e distribuição de tamanho (PDI) das populações de nanocápsulas de isotretinoína (0,5 mg/mL) e Nanobranças de PLA e PLGA 50:50 obtidas através dos três tipos de gotejamento durante a fase de emulsificação (sem agulha, G22 e G23). ....	62
Tabela 8: Comparação entre três amostras de nanocápsulas contendo isotretinoína 0,5 mg/mL, obtidas com gotejamento G22. ....	63
Tabela 9: Comparação entre 8 amostras de nanocápsulas de PLA contendo isotretinoína 0,5mg/mL, obtidas com a mesma formulação 6 e gotejamento G23.....	64
Tabela 10: Comparação entre o tamanho médio das gotículas formadas com gotejamento G23 na emulsão e das partículas obtidas na dispersão após remoção de solvente em duas amostras (A) e (B) de mesma formulação (NC ISO), fabricadas em dias diferentes (Figuras 14 e 15). ....	65

Tabela 11: Tamanho médio das partículas e PDI antes e após centrifugação (sobrenadante e precipitado) a 2500rpm/h.....	69
Tabela 12: Avaliação da estabilidade em longo prazo da dispersão de nanocapsulas NC-ISO 6 (armazenada a +4°C) e degradação de isotretinoína encapsulado durante o seu armazenamento através da leitura da queda de sua absorbância máxima ( $\lambda=336\text{nm}$ ) ao longo do tempo.....	76
Tabela 13: Comparação entre os resultados de Eficiência de Encapsulação (EE) das amostras obtidas com as formulações 6, 7, 8 e 9 (NC-ISO) com separação das frações de Fármaco Encapsulado (FE) e quantificação da isotretinoína em $\lambda = 336\text{nm}$ .....	79
Tabela 14: Concentração de isotretinoína liberada (amostra NC-ISO 6) quantificada por espectrofotometria no UV em 336nm ao longo do tempo (0-24horas) – ensaio realizado em triplicata. ....	82
Tabela 15: Perfil de fotodegradação através das concentrações de isotretinoína encapsulada e livre durante a exposição a luz UVA – 365nm, ao longo do tempo 0 - 8horas.....	85

---

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. SISTEMAS DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS

A constante busca por um sistema perfeito de liberação controlada capaz de direcionar fármacos exclusivamente para o sítio alvo desejado, com exposição mínima de outros tecidos não-alvos, tem aumentado o interesse em pesquisas com o objetivo de promover o efeito terapêutico do fármaco com mínima toxicidade, aumentar sua especificidade pelos sítios de ação, reduzir os efeitos colaterais nos sítios não-alvos e melhorar a eficácia. Sistemas de velocidade controlada de liberação de fármacos são sistemas em que a liberação é controlada pelas características do próprio sistema, independente das condições fisiológicas como pH gastrintestinal ou do meio como o tempo de trânsito do fármaco através do trato gastrintestinal (ALLEN *et al*, 2005). O desenvolvimento destes novos sistemas pode ser baseado na promoção contínua de efeitos terapêuticos do fármaco, minimizando seus efeitos tóxicos pelo aumento da quantidade e persistência do fármaco ao redor da célula alvo e redução da exposição deste na célula não-alvo (NASTRUZZI *et al*, 1990; SINGH & DAS, 1998; SANTOS *et al*, 2006; BLOUZA *et al*, 2006; DÍAZ *et al*, 2006; LIU *et al*, 2007; XIONG *et al*, 2007). Através de sistemas de liberação controlada podem ser muitos os benefícios terapêuticos adquiridos tais como a otimização da duração da ação do fármaco, obtenção de menores flutuações dos níveis sanguíneos do fármaco, redução da frequência de doses, e maior controle do sítio de liberação e manutenção constante dos níveis do fármaco, como também benefícios clínicos, que podem ser resultantes do aumento da segurança e adesão do paciente ao tratamento com melhores resultados e redução dos efeitos adversos (ALLEN *et al*, 2005). Quanto a sua administração, estes sistemas podem ser administrados pelas vias transdérmica (ex. géis tópicos), intravaginal (ex. anéis vaginais), intrauterina (ex. dispositivos intra-uterinos), oftálmica (ex. membranas oftálmicas), oral (ex. gomas muco adesivas, grânulos ou pellets, microesferas) e parenteral (ex. microesferas, micro ou nanocápsulas) (ALLEN *et al*, 2005).



A maioria dos sistemas com velocidade controlada de liberação, constituídos por polímeros biodegradáveis, liberam lentamente o fármaco e possuem cinética de liberação predominantemente governada por três fatores como o tipo do polímero, a morfologia do sistema polimérico que compreende desde a estrutura da matriz polimérica onde o fármaco está contido às propriedades químicas de ambos, do polímero e do fármaco, e adjuvantes presentes no sistema (FREIBERG & ZHU, 2004; <http://drugdel.com/polymer.htm>).

A composição dos sistemas poliméricos biodegradáveis é bastante variável sendo que a biocompatibilidade pode ser obtida com o uso de polímeros naturais como celulose, quitina, quitosana, gelatina, colágeno e açúcares ou pelo emprego de polímeros obtidos a partir de monômeros como os de ácido lático (PLA) e ácido lático e glicólico (PLGA) (PRISTA *et al*, 1993a). Os poliésteres (PLA, PLGA e Policaprolactona ou PCL) são os mais utilizados para a preparação de sistemas de liberação controlada de fármaco, por serem biodegradáveis e biocompatíveis (ABDELWAHED *et al*, 2006).

Existem dois mecanismos primários pelo qual o fármaco pode ser liberado sem a necessidade de remoção do sistema após sua liberação, podendo ocorrer isoladamente ou associados: difusão e erosão. Micropartículas ou nanopartículas convencionais preparadas com estes polímeros biodegradáveis são utilizadas como matriz que liberam o conteúdo de fármaco através da difusão controlada (através de poros formados durante o processo de produção da matriz polimérica) onde o fármaco encapsulado pela membrana polimérica ou suspenso na matriz polimérica, é difundido para fora do polímero, já a erosão ou degradação enzimática desta matriz (erosão da matriz polimérica), o polímero é degradado naturalmente pela hidrólise das ligações de ésteres, liberando o fármaco (Figura 1). (; (<http://drugdel.com/polymer.htm>); FREIBERG & ZHU, 2004; FAROKHZAD & LANGER, 2006).

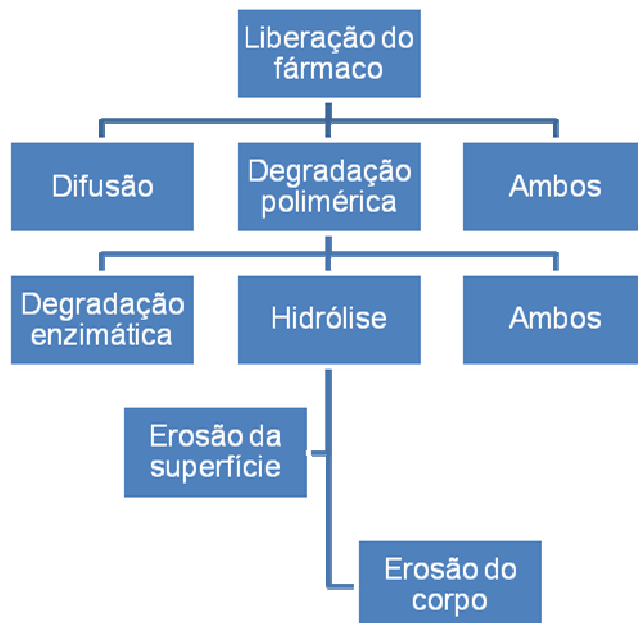


Figura 1 - Possíveis mecanismos físicos de liberação controlada do fármaco através de sistemas poliméricos (<http://drugdel.com/polymer.htm>).

A liberação controlada destes sistemas poliméricos podem se tornar sistemas de longa duração, chamados de nanopartículas furtivas, as quais são ligadas a moléculas de Polietilenoglicol (PEG), retardando a “opsonização” destas partículas (mecanismo de defesa do organismo que utiliza opsoninas, as quais são proteínas que englobam corpos estranhos), impedindo o reconhecimento e fagocitose realizada pelos macrófagos por causa desta modificação na estrutura do sistema, ou seja, com emprego de moléculas hidrofílicas como PEG na superfície da partícula, pode-se alterar o tempo de permanência na circulação sanguínea e/ou garantir a vetorização do sistema ao sítio de ação por criar uma barreira altamente hidrofílica na superfície da partícula que bloqueia a adesão das opsoninas, tornando-a irreconhecível às células fagocitárias (BARRAT, 2000; ALLEN *et al*, 2005).

## 1.2 MICROENCAPSULAÇÃO E NANOENCAPSULAÇÃO

### 1.2.1 HISTÓRICO

Os primeiros sistemas carreadores de fármacos introduzidos na prática médica, capazes de promover uma liberação controlada no organismo foram de origem biológica, como por exemplo, eritrócitos que podem ser utilizados como sistemas carreadores de liberação oral para proteínas sensíveis ao suco gástrico como a insulina, e lipossomas primeiramente descritos por Bangham *et al*, em 1965 são vesículas lipídicas uni ou multi-lamelares, com faixa de tamanho entre 20nm a 10µm de diâmetro, compostas de bicamadas de fosfolípídeos que circundam um cavidade aquosa. Fármacos lipossolúveis podem ser incorporados no interior das bicamadas lipídicas e fármacos hidrossolúveis ficam dissolvidos no compartimento aquoso (BANGHAM *et al*, 1965; MARTIN, 1993; AL ACHI & GREENWOOD, 1998).

No início dos anos 60, foram obtidas microcápsulas estáveis envolvidas com membranas poliméricas semipermeáveis, com diâmetro médio de 1 a 100µm, para encapsular soluções aquosas de proteínas com a idéia de utilizá-las como sistemas de liberação (CHANG, 1964).

As nanopartículas poliméricas biodegradáveis com diâmetro médio de até 200 nm foram introduzidas como carreadores de liberação controlada de fármacos no final da década de 70, por Kreuter em 1978 e 1981 e Speiser em 1976 e 1979, como alternativa para superar algumas limitações encontradas nos lipossomas como baixa eficiência de encapsulação, instabilidade em meio aquoso, rompimento e oxidação durante o armazenamento em longo prazo e degradação hidrolítica dos fosfolípídeos (LASIC, 1997).

Os primeiros estudos de degradação da matriz polimérica biodegradável em sistemas microparticulados foram efetuados inicialmente por Mason *et al*, em 1976, e revisados por Marty & Oppenheim em 1977, e desde então nos últimos 30 anos os processos de biodegradação têm sido estudados e revisados continuamente por outros autores tanto para micropartículas e nanopartículas (WANG *et al*, 1997; ANDERSON & SHIVE, 1997; FREIBERG & ZHU, 2004; MATSUMOTO *et al*, 2005; CRUZ *et al*, 2006) para tentar alcançar uma cinética de liberação do fármaco adequada ao tratamento.

### **1.2.2 APLICAÇÕES**

A obtenção de micropartículas e nanopartículas pode proporcionar desde a obtenção de formas sólidas contendo óleos, mascaramento de sabor e odor desagradáveis, proteção dada ao fármaco contra umidade, calor e oxidação, alteração da solubilidade do fármaco, diminuição da volatilização de essências ou óleos essenciais, prevenção de incompatibilidades entre substâncias ativas na mesma formulação, aumento das características de fluxo de materiais sólidos em processo de compressão, obtenção da liberação controlada e vetorização de fármacos (ANDREO-FILHO & OLIVEIRA, 1999), além do aumento da biodisponibilidade dos fármacos e redução dos seus efeitos colaterais, seja após administração local (MO & LIM, 2005), oral (MU & FENG, 2003; MULLER *et al*, 2004), retal (FAWAZ *et al*, 1996), como também o aumento da atividade terapêutica e modificação da distribuição tecidual dos fármacos pela via parenteral, além de favorecer a redução da frequência de administração por esta via (SONG *et al*, 1997; O'HAGAN *et al*, 1998; WIN & FENG, 2006).

Uma vantajosa aplicação dos sistemas carreadores nanoparticulados de fármacos sobre os sistemas microparticulados, devido o tamanho nanométrico ser mais adequado na administração intravenosa e penetração de cosméticos pela pele (BOUCHEMAL *et al*, 2006). As nanopartículas biodegradáveis são aplicadas preferencialmente pela via de administração parenteral endovenosa e podem veicular uma variedade de ativos, como por exemplo, corantes biomarcadores fluorescentes e fotossensibilizantes (SAXENA *et al*, 2004), antineoplásicos, citostáticos e imunossupressores (WANG *et al*, 1997; WIN & FENG, 2006; COUVREUR *et al*, 2006), antibióticos (PAGE-CLISSON *et al*, 1998; MAGALHÃES *et al*, 2000), proteínas (SONG *et al*, 1997; RIBEIRO *et al*, 2005; CHUNG *et al*, 2006), entre outros.

### 1.2.3 MICROPARTÍCULAS E NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS

O termo “nanopartículas” é utilizado para partículas com tamanho menor que 1 $\mu$ m, enquanto que partículas maiores são denominadas de “micropartículas”. Estes dispositivos são representadas por dois tipos de estruturas diferentes: microesferas e nanoesferas, microcápsulas e nanocápsulas. De acordo com o processo de preparação utilizado são obtidas nanoesferas ou nanocápsulas, onde esferas são sistemas monolíticos em que o fármaco encontra-se homogeneamente disperso no interior da matriz polimérica ou cerosa e microcápsulas e nanocápsulas, ao contrário, constituem sistemas vesiculares, tipo reservatório onde é possível identificar uma cavidade interna diferenciada, que pode ser líquida ou oca e o fármaco encontra-se envolvido por uma membrana polimérica isolando o núcleo do meio externo (ANDREO-FILHO e OLIVEIRA, 1999).

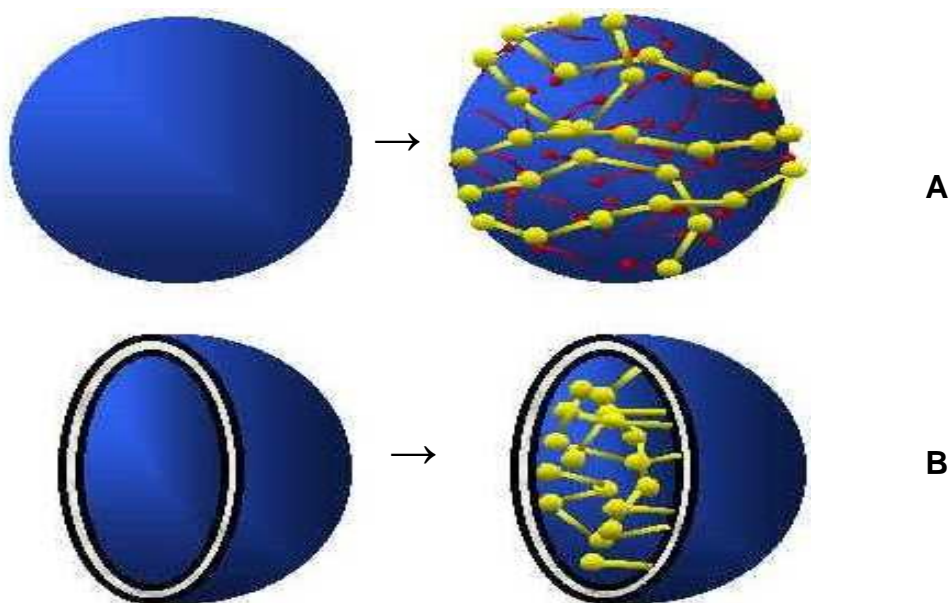


Figura 2: Diferenças morfológicas entre esfera (sistema polimérico matricial vazio e contendo fármaco) (A) e cápsula (sistema polimérico reservatório vazio e contendo fármaco) (B) ([www.canalu.fr/canalu/img](http://www.canalu.fr/canalu/img)).

O método de microencapsulação ou nanoencapsulação de sólido ou líquido, por um revestimento polimérico utilizado, seja para melhorar a estabilidade do fármaco, protegê-lo de condições externas ou modificar a sua liberação e/ou reduzir os seus efeitos colaterais, depende principalmente da solubilidade do fármaco. Os sistemas obtidos podem ser classificados de acordo com a natureza dos materiais poliméricos utilizados especificamente para um determinado processo de preparação (ex. monômeros ou polímeros hidrofóbicos) ou pelo seu tipo de estrutura interna: cápsulas (núcleo revestido) ou esferas (matriz) (GUINEBRETIERE *et al*, 2002). As nanoesferas também podem ser distinguidas das nanocápsulas quando submetidas à ultracentrifugação, as nanoesferas formam um sedimento no fundo do tubo enquanto as nanocápsulas com um núcleo oleoso, formam uma camada na superfície do tubo, por causa das gotículas de óleo do sistema (MARTIN,1993).

### **1.2.3.1 MÉTODOS DE PREPARAÇÃO DE SISTEMAS POLIMÉRICOS NANOENCAPSULADOS**

Dependendo das características físico-químicas do fármaco, é possível escolher o melhor método e o polímero mais adequado para se obter um sistema de liberação controlada ideal para este fármaco, muitos métodos têm sido desenvolvidos para preparar nanopartículas poliméricas, estes métodos podem ser classificados dentro de três categorias principais (REIS *et al*, 2006).

1. *Polimerização em emulsão*: as nanopartículas são obtidas pela polimerização de monômeros parcialmente solúveis em água e o iniciador hidrossolúvel, onde o agente emulsificante forma micelas onde os monômeros ficam contidos, algumas micelas se tornam ativas, onde a reação de polimerização se processa dentro delas, enquanto outras inativas, constituindo apenas de uma fonte de monômeros. À medida que a reação ocorre, as micelas inativas suprem as ativas com monômeros, que crescem formando polímeros. Este método de preparação se divide em duas técnicas de obtenção dependendo da constituição fase contínua (REIS *et al*, 2006);
- Fase contínua orgânica: sempre utiliza um emulsificante para prevenir agregação, pois os monômeros insolúveis no meio são dispersos em emulsão, microemulsão inversa (REIS *et al*, 2006).

- Fase contínua aquosa: onde o monômero é dissolvido em uma fase aquosa não sendo necessário a presença de um agente emulsificante e a molécula iniciadora pode ser um íon ou um radical livre. A fase de separação e de formação das nanoesferas pode ocorrer antes e após o final da polimerização (VAUTHIER et al, 2003).
- 2. *Polimerização interfacial* : nesta técnica a polimerização ocorre na interface entre dois solventes imiscíveis. O polímero é formado no local onde ele é depositado e a membrana polimérica envolve uma fase interna óleo/água ou água/óleo (COUVREUR et al, 2002).
- 3. *Precipitação de polímeros pré-formados*: A vantagem da utilização de polímeros pré-formados sobre a polimerização em emulsão ou polimerização interfacial evita que durante a polimerização, resíduos de monômeros e moléculas residuais de reagentes ou agentes polimerizantes fiquem no produto final, o que pode proporcionar em cada lote fabricado, maior ou menor toxicidade, requerendo um meticuloso processo de purificação do material coloidal após a polimerização, além do mais, moléculas de monômeros ativados podem interagir com o fármaco durante o processo de polimerização e, por exemplo, levar à desnaturação e inativação de fármacos protéicos (LAMPRECHT et al, 1999; REIS et al, 2006), Este método se divide em duas técnicas de obtenção:
  - Emulsificação/Evaporação do solvente: Nesta técnica envolve duas etapas, primeiro o polímero pré-formado é dissolvido em uma solução aquosa (formação de emulsão), em seguida é evaporado induzindo a precipitação deste como nanoesferas (SOPPIMATH et al, 2001).
  - Deslocamento do solvente e deposição interfacial: Consiste na precipitação do polímero de uma solução orgânica, e difusão do solvente orgânico para a fase aquosa, geralmente na presença de um tensoativo (FESSI et al 1989). A técnica de deslocamento do solvente é utilizada para a preparação de nanocápsulas e nanoesferas, de acordo com a presença ou ausência de óleo, respectivamente. O ítem 1.1.2.1.1, a seguir descreve detalhadamente o método de preparação das nanocápsulas biodegradáveis por esta técnica de deposição interfacial de polímero pré-formado.

### **1.2.3.1.1 Método de preparação das nanocápsulas biodegradáveis por deposição interfacial de polímero pré-formado**

O método de deposição interfacial de polímero pré-formado através da evaporação do solvente, primeiramente descrito por Fessi *et al*, em 1989, é baseado na emulsificação da fase interna orgânica contendo o polímero dissolvido, dentro da fase aquosa externa. Ocorre então um processo de emulsificação/solidificação usado para a fabricação das nanocápsulas. Na deposição interfacial é introduzido um óleo de natureza biocompatível miscível no solvente do polímero, mas imiscível na mistura final.

Neste método, o polímero é dissolvido juntamente com o fármaco lipossolúvel, óleo e fosfolípídeos em acetona. A mistura orgânica (solução acetona-óleo) é injetada lentamente dentro de um meio aquoso sob agitação, resultando numa emulsificação espontânea da solução oleosa na forma de nanogotículas, devido à instabilidade na interface que surge através da rápida difusão da acetona quando atravessa a interface e provoca a diminuição da tensão interfacial. Durante a evaporação da acetona ocorre a migração do polímero insolúvel através da interface óleo/água, ou seja, ele se deposita entre a água e as nanogotículas de óleo formando a membrana da nanocápsula (FESSI *et al*, 1989).

As propriedades farmacêuticas das micro/nanopartículas podem ser determinadas por vários fatores como natureza, solubilidade e encapsulação do fármaco; tipo de polímero (peso molecular e composição), propriedades do solvente orgânico, concentração e proporção da mistura das fases aquosa e orgânica, bem como a proporção entre os componentes de cada uma das fases (polímero / fármaco / tensoativo(s) / estabilizante(s) / aditivo(s)), natureza e concentração do(s) tensoativo(s), força mecânica de partilha / agitação e outras condições como temperatura e pH (MU *et al*, 2003).



## 1.3 COMPONENTES DA FORMULAÇÃO DE NANOCÁPSULAS

### 1.3.1 POLÍMEROS

As propriedades físico-químicas da partícula bem como do polímero são de grande importância e podem influenciar na elaboração de sistemas microparticulados e nanoparticulados quando se pretende a liberação controlada, prolongada ou vetorização de fármacos, uma vez que a farmacocinética do fármaco passa a ser dependente do sistema no qual ele está contido (PRISTA *et al*, 1993b).

Os poliésteres alifáticos são homo ou co-polímeros de ácido láctico, ácido glicólico e  $\epsilon$ -hidroxi ácido capróico muito utilizados em sistemas nanoencapsulados. Eles são facilmente susceptíveis à hidrólise na presença de umidade e são classificados como materiais biodegradáveis, bio-compatíveis e bio-absorvíveis, com aprovação do seu uso por várias vias de administração inclusive parenteral, pela “Food and Drug Administration (FDA)” (JIANGA *et al*, 2005; KIBBE,2000). Em meio aquoso estes poliésteres sofrem degradação hidrolítica através do rompimento de suas ligações ésteres, tornando-se ácidos hidroxicarboxílicos não tóxicos. Estes ácidos hidroxicarboxílicos são eventualmente metabolizados no organismo e eliminados como água e dióxido de carbono através da via do ácido cítrico ou ciclo de Krebs (KIBBE, 2000). O processo de biodegradação do PLA e do PLGA é descrito com uma sucessão de etapas quando estes são expostos aos fluidos do organismo, inicialmente o material sofre hidratação, com a presença das moléculas da água, o processo de degradação inicia através da hidrólise das ligações ésteres, originando produtos na forma de monômeros solúveis e não tóxicos de ácido láctico para PLA e ácido láctico e glicólico para PLGA (PLA + PGA). A degradação prossegue por um processo biologicamente ativo (feito por enzimas) ou pela quebra de ligações ésteres ou clivagem hidrolítica passiva (ELKE *et al* 2004). Terminada a hidrólise dos polímeros, para PLA inicia-se uma oxidação a ácido láctico e para PGA a conversão das unidades de ácido glicólico em glicina que por sua vez são convertidos em ácido pirúvico. Na presença de acetil coenzima A, ocorre liberação de CO<sub>2</sub> e conseqüentemente decomposição em citrato. O citrato será então incorporado no Ciclo de Krebs, resultando em CO<sub>2</sub> e água, podendo sua eliminação ser feita através da urina e da respiração. Dessa maneira, o material foi reabsorvido e totalmente metabolizado (ALI *et al*, 1993).

A velocidade de biodegradação e características como solubilidade de sistemas formulados com poliésteres, podem ser controladas por alterações nas propriedades físicoquímicas dos polímeros como cristalinidade, hidrofobicidade, estereoquímica do monômero, proporção de co-polímero e peso molecular do polímero. Os pesos moleculares variam de 2000 até mais de 100000. Proporções de co-monômeros de ácido láctico e ácido glicólico para Poli (DL-láctico-co-glicólico) ou PLGA variam entre 85: 15 a 50: 50 (KIBBE, 2000). Para o co-polímero PLGA, à medida que a proporção Lactídeo/Glicolídeo é alterada diminuindo o ácido láctico e aumentando ácido glicólico, por exemplo, proporções como 85: 15 / 75: 25 / 50: 50 quantidades relativas de ácido láctico e ácido glicólico, respectivamente irão determinar a cristalinidade e a taxa de hidrólise do polímero e conseqüentemente a velocidade de liberação do fármaco através da matriz polimérica (DESHPANDE et al, 1998). Com o aumento da taxa de ácido glicólico até 50%, a hidrofiliabilidade é aumentada e a interação entre o polímero, fase oleosa e fase aquosa também se alteram, acelerando a velocidade de degradação polimérica e conseqüentemente a liberação do fármaco (MU & FENG, 2003).

A composição do polímero e a cristalinidade desempenham um importante papel na solubilidade destes poliésteres alifáticos, pois homopolímeros cristalinos de ácido glicólico são apenas solúveis em solvente forte como hexafluorisopropanol, já os homopolímeros cristalinos de ácido láctico não possuem boa solubilidade na maioria dos solventes orgânicos, entretanto polímeros amorfos de D,L- ácido láctico e os copolímeros de D,L-ácido láctico e glicólico com baixo teor de ácido glicólico são solúveis na maioria dos solventes orgânicos, as propriedades físico-químicas dos polímeros biodegradáveis D,L-PLA e PLGA 50:50 utilizados para a fabricação das nanocápsulas estão descritas na tabela 1 (KIBBE, 2000).

Tabela 1: Propriedades físico-químicas dos polímeros biodegradáveis D,L- PLA e PLGA para a fabricação das nanocápsulas (KIBBE, 2000).

Polímero Nome genérico e químico (CAS)	Fórmula geral	Solubilidade*	Ponto de fusão (°C)	Densidade (g/mL)	Viscosidade (dL/g)*	Peso molecular	Cor
PLA Poli-(DL-lactídeo)  Ácido propiônico, 2-hidroxihomopolímero	$-(C_3 H_6 O_3)_n$	MeCl <sub>2</sub> THF EtOAc C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O CHCl <sub>3</sub>	amorfo	<1,25	0,5 – 0,8 (CHCl <sub>3</sub> )	40000-100000	Branco
PLGA Poli (DL-lactídeo-co-glicolídeo)  1,4-dioxano-2,5-dione, polímero com (3S-cis)-3,6-dimetil-1,4-dioxano-2,5-dione	$[-OCH (CH_3) CO -]_x$ $[-OCH_2 CO -]_y$	MeCl <sub>2</sub> THF EtOAc C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O CHCl <sub>3</sub>	amorfo	<1,34	0,5 – 0,8 dL/g (HFIP)	40000-100000	Incolor, branco a levemente amarelado

\* MeCl<sub>2</sub> = cloreto de metileno, THF= tetrahydrofurano, EtOAc= acetato de etila, C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O= acetona, CHCl<sub>3</sub> = clorofórmio, HFIP= hexafluoroisopropanol)

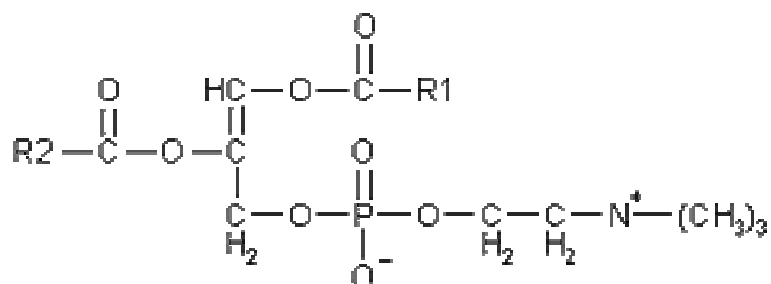
Outro tipo de polímero utilizado como agente estabilizante de sistemas nanoparticulados, capaz de proporcionar aumento na viscosidade da fase externa aquosa aumentando a estabilidade da dispersão coloidal (Cunha Junior et al, 2003), é um copolímero bloco não iônico, o polioxietileno-polioxipropileno, chamado comercialmente de Poloxamer 188® ou Pluronic® F-68 e suas especificações e características físico-químicas estão descritas na Tabela 2 (KIBBE, 2000)

As características do Poloxamer 188® em termos de peso molecular, aparência, hidrofiliicidade/hidrofobicidade e solubilidade são determinadas pelo comprimento da cadeia constituída com unidades de polioxietileno – (EO-) (porção hidrofílica) e unidades de polioxipropileno – (PO-) (porção hidrofóbica). A distribuição do peso molecular é dependente das reações que ocorrem durante a polimerização de óxido de propileno e a capacidade de solubilização do poloxamer é comandada pela sua porção hidrofóbica presente na cadeia polimérica (cerca de 20-28% de unidades de polióxipropileno–(PO-)). O Poloxamer 188® pode ser utilizado como emulsificante em emulsões oleosas intravenosas e na preparação de sistemas sólidos de dispersões, agente solubilizante, podendo aumentar a biodisponibilidade oral de fármacos insolúveis em água. É útil ainda como agente de revestimento para antibióticos e revestimento e ligante para comprimidos (pode garantir uniformidade de conteúdo durante a granulação), também é usado em bases para pomadas e supositórios além de várias outras aplicações (KIBBE, 2000; QUADIR, 2006).

Tabela 2: Especificações e características físico-químicas do Poloxamer 188® (polietileno-propilenoglicol-copolímero) (KIBBE, 2000; Basf, 2004)

Nome químico	$\alpha$ - hidro - $\omega$ -hidroxipoli(oxietileno) copolímero bloco de poli-(oxipropileno) – poli-(oxietileno)
Peso molecular	7680-9510 (peso médio $\approx$ 8400)
Fórmula geral	$\text{HO}(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_a(\text{C}_3\text{H}_6\text{O})_b(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_a\text{H}$ possui cerca de 80% de a e 20-28% de b
Viscosidade	1000 cP quando fundido a 77°C
Ponto de fusão	52-55°C
Características gerais	Escamas sólidas ou grânulos brancos e cerosos. Carga aniônica. A porção polioxietilenoglicol [ $\approx$ 80%] é mais hidrofílica e a porção polioxipropilenoglicol é mais hidrofóbica
Acidez/alcalinidade	pH 5 a 7,5 para uma solução aquosa a 2,5%
Densidade	1,06 g/mL
HLB	>24
Solubilidade	Livremente solúvel em etanol (95%) e água

### 1.3.2.FOSFATIDILCOLINA



**FIGURA 3 - Estrutura química da fosfatidilcolina**

([www.bioq.unb.br/htm/biomoleculas/geral/fosfatidilcolina](http://www.bioq.unb.br/htm/biomoleculas/geral/fosfatidilcolina))

A fosfatidilcolina, quimicamente denominada 1,2 diacil-*sn*-glicero-3-fosfocolina pode ser de origem vegetal extraída da lecitina de soja purificada (Lipoid S100® pureza de 99%) e de origem animal extraída de gema de ovo (KIBBE, 2000). Segundo a Farmacopéia dos Estados Unidos, USP 30, a lecitina de soja é definida como uma mistura complexa de fosfatídeos insolúveis em acetona, os quais consistem principalmente em fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, e fosfatidilinositol combinados a várias outras substâncias como triglicerídeos, ácidos graxos e carboidratos, quando separados de uma fonte de óleo vegetal cru (KIBBE, 2000).

A composição da lecitina varia bastante dependendo da fonte e do grau de purificação. A lecitina de soja contém aproximadamente 21% de fosfatidilcolina, 22% de fosfatidiletanolamina, 19% de fosfatidilinositol, além de outros componentes. As lecitinas são principalmente utilizadas em produtos farmacêuticos como agente dispersante, emulsificante, e estabilizante e são incluídos em injeções intravenosas e intramusculares, formulações para nutrição parenteral, produtos tópicos como cremes e pomadas entre outras aplicações. Lecitinas são solúveis em hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos, óleo mineral, e ácidos graxos e praticamente insolúveis em óleos vegetais e animais frios, solventes polares e água. Possuem grande variedade na sua forma física, de semilíquido viscoso a pó, dependendo da quantidade de ácidos graxos livres sua cor varia também de marrom a amarelo claro, dependendo do grau de

purificação. Decompõem-se em pHs extremos e quando aquecidas, são higroscópicos, e sujeitos a degradação microbiana (KIBBE, 2000).

Os fosfolipídeos possuem grande eficiência em manter a estabilidade da emulsão, sendo utilizados na fabricação das nanocápsulas como estabilizante da fase oleosa da emulsão óleo/água formada na primeira etapa de preparação, reduzindo a energia de superfície na interface e devido à grande afinidade pela fase oleosa e aquosa (FENG & HUANG, 2001), dispõem-se na interface juntamente com o poloxamer 188®.

### ***1.3.3. ÓLEO VEGETAL BIOCOMPATIVEL: ÓLEO DE SOJA***

O óleo de soja refinado possui composição tipicamente conhecida de ácidos graxos, apresentados como glicerídeos, sendo os principais: ácido linoleico 50-57%, ácido linolênico 5-10%, ácido oléico 17-26%, ácido palmitoleico 9-13% e ácido esteárico 3-6% (KIBBE, 2000). Emulsões contendo óleo de soja têm sido usadas como veículos para a administração oral e intravenosa de fármacos lipossolúveis como, por exemplo, os retinóides que podem ser incorporados dentro da fase oleosa (NANKERVIS *et al*, 1994).

O armazenamento prolongado de emulsões contendo óleo de soja, particularmente em temperaturas elevadas, pode resultar em formação de ácidos graxos livres com uma conseqüente redução do pH da emulsão. A degradação é minimizada com uma faixa de pH 6 – 7, entretanto estas emulsões são estáveis em temperatura ambiente (não excedendo a 25 °C), desde que armazenadas sob nitrogênio e recipientes de vidro resistente à luz, o que evita a degradação oxidativa. Suas propriedades físico-químicas estão descritas na tabela 3 (KIBBE, 2000).

Tabela 3: Propriedades físico-químicas do óleo de soja

Densidade (g/cm <sup>3</sup> )	Ponto de congelamento	Solubilidade	Viscosidade (cP)
0,916-0,922 a 25°C	-10 a -16°C	praticamente insolúvel em etanol (95%) e água, miscível em dissulfeto de carbono, clorofórmio, éter e vaselina branca.	172,9 a 0°C 99,7 a 10 °C 50,09 a 25 °C 28,86 a 40 °C

## 1.4 ISOTRETINOINA (ÁCIDO 13-CIS-RETINÓICO)

### 1.4.1 ESTRUTURA QUÍMICA [C<sub>20</sub>H<sub>28</sub>O<sub>2</sub>] PM 300.4

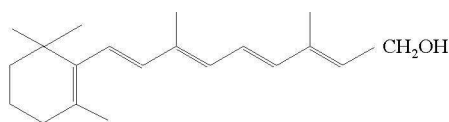
A isotretinoína é descrita na farmacopéia americana, USP 30, como um pó cristalino amarelo a alaranjado, sensível ao ar, calor e luz especialmente em solução, praticamente insolúvel em água, levemente solúvel em álcool etílico, isopropílico e polietilenoglicol 400, solúvel em diclorometano e clorofórmio. É um derivado do retinol (vitamina A) que é um álcool primário encontrado na forma esterificada nos tecidos de animais e peixes de água salgada, principalmente no fígado (MARCUS & COULSTON, 2003).

A estrutura básica da molécula de retinóides consiste em um grupamento cíclico terminal, uma cadeia lateral poliênica e um grupamento polar terminal. Derivados do retinol, os isômeros geométricos - isotretinoína e tretinoína são ácidos retinóicos de primeira geração, obtidos devido às possíveis configurações *cis-trans*, respectivamente, em torno das ligações duplas da cadeia lateral (Figura 3). A alteração das cadeias laterais e dos grupamentos terminais cria várias classes de retinóides, sendo que os de primeira geração são capazes de se ligar a vários receptores para retinóides em virtude da flexibilidade transmitida pela alteração de suas ligações simples e duplas, apresentam muitas funções importantes e diferentes em todo o organismo, como na visão, na regulação da proliferação e na diferenciação celular, no crescimento ósseo, na defesa imunológica e na supressão tumoral, mas a ausência

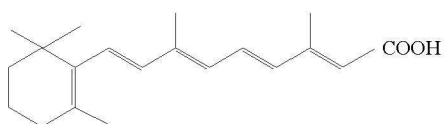


relativa de especificidade dos receptores pode levar ao surgimento de maiores efeitos colaterais (CHANDRARATNA, 1998).

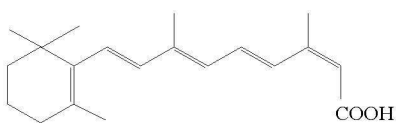
O ácido retinóico, cujo grupo alcoólico do retinol foi oxidado, é muito potente na promoção do crescimento e no controle da diferenciação e manutenção do tecido epitelial de animais com deficiência de vitamina A. O ácido retinóico todo *trans* (tretinoína) parece ser a forma ativa da vitamina A em todos os tecidos, exceto na retina, sendo 10-100 vezes mais potente que o retinol em vários sistemas *in vitro*. A interconversão entre isômeros ocorre rapidamente no organismo. A isomerização deste composto produz o ácido 13-*cis*-retinóico ou isotretinoína, quase tão potente quanto a tretinoína em muitas de suas ações sobre os tecidos epiteliais, embora possa ser até 5 vezes menos potente na produção dos sintomas tóxicos (MARCUS & COULSTON, 2003).



**Retinol**



**Tretinoína**  
(ácido retinóico all-*trans*)



**Isotretinoína**  
(ácido 13-*cis*-retinóico)

Figura 4: Fórmula estrutural do retinol e retinóides de primeira geração (MARCUS & COULSTON, 2003).

### **1.4.2 MECANISMO DE AÇÃO**

Os retinóides regulam a transcrição gênica mediante a ativação de receptores nucleares específicos. A estrutura do retinóide determina o tipo de receptor retinóico que será ocupado e assim efeitos farmacológicos como modulação da expressão gênica, serão produzidos, possuindo atividade semelhante à do retinol. Como ainda não foi identificado receptor comparável ao retinol, é possível que seja necessária a oxidação do retinol a ácido retinóico para produzir seus efeitos nas células-alvo (BLANER, 2001; MARCUS & COULSTON, 2003).

### **1.4.3 FARMACOCINÉTICA**

**Absorção:** Após administração oral, as concentrações plasmáticas máximas de ácido 13-*cis*-retinóico são atingidas entre 2 a 4 horas nos indivíduos em jejum, apresentando uma cinética de primeira ordem e pode ser descrita como um modelo linear de dois compartimentos. A biodisponibilidade oral é estimada em cerca de 20%, a presença de alimento aumenta significativamente o grau de absorção sistêmica. Com a administração repetida, as concentrações no estado de equilíbrio dinâmico são estabelecidas em 5-7 dias. A isotretinoína não é suficientemente absorvida para via tópica (ALLEN & BLOXHAM, 1989 e NISSEN, 2002).

**Distribuição:** A isotretinoína liga-se extensamente às proteínas plasmáticas, mais de 99,9%, principalmente albumina e, em geral sua concentração nos tecidos é inferior a da circulação geral (NISSEN, 2002).

**Metabolismo:** Após administração oral da isotretinoína, seu principal metabólito, 4-oxo-isotretinoína, é identificado no sangue. Concentrações máximas de 4-oxo-isotretinoína (87-399 ng/mL) foram encontradas em 6-20 horas após a administração oral de duas cápsulas de 40mg. A concentração sanguínea deste metabólito geralmente excede a de isotretinoína após 6 horas e com a administração repetida, ele acumula-se no sangue. A isotretinoína também sofre interconversão *in vivo*, ou seja isomerização para ácido todo-*trans*-retinóico, que é então metabolizado para seu 4-oxo-metabolito correspondente. Cerca de 20 a 30% de uma dose de isotretinoína são rapidamente metabolizados por via hepática. Ambos os compostos isotretinoína e tretinoína e seus metabólitos formados são posteriormente metabolizados em formas

conjugadas para serem excretados (WIEGAND & CHOU, 1988, ALLEN & BLOXHAM, 1989 e NISSEN, 2002).

**Eliminação:** A excreção dos metabólitos e do composto original na bile ocorre após a conjugação com ácido glicurônico. As formas conjugadas e produtos de degradação são secretados pela bile e excretados pelas fezes e urina. Metabólitos da isotretinoína e alguns conjugados são eliminados em quantidades relativamente iguais (total de 65%-83%). A meia-vida da isotretinoína no plasma varia aproximadamente entre 20 horas (WIEGAND & CHOU, 1988; ALLEN & BLOXHAM, 1989 e NISSEN, 2002).

#### **1.4.4 USOS TERAPÊUTICOS / DOSES:**

**Doenças dermatológicas:** acne, distúrbios de queratinização como ictioses, psoríase, nevos e verrugas, distúrbios na formação do colágeno como fibroses, escleroses, quelóides, envelhecimento cutâneo e outros. A principal indicação da terapia de uso oral com isotretinoína é para o tratamento da acne severa conglobata e nodulocística, que não responderam a outros tratamentos inclusive com antibacterianos sistêmicos. A administração da isotretinoína produz uma redução dose dependente da excreção sebácea com uma subsequente redução nos níveis de *Propionibacterium acnes*, inflamação e formação de cistos (JONES, 1989). As doses iniciais diárias de isotretinoína por via oral no tratamento de acne variam entre 0,5 a 1,0 mg/kg de peso, doses acima de 2mg/kg ainda são permitidas nos EUA e em alguns países para pacientes com doenças severas ou primariamente no corpo ao invés da face (MCLANE, 2001; ELLIS & KRACH, 2001; SWEETMAN, 2002a). Tratamentos usuais com 0,5-2mg/Kg, 1 a 2x ao dia), por 15 a 20 semanas, resultam em uma completa e prolongada remissão da maioria (>90%) das lesões inflamatórias severas (nódulos recalcitrantes) (MCLANE, 2001).

**Câncer e quimioprevenção:** Como o retinol regula a diferenciação e a proliferação das células epiteliais, há considerável interesse na aparente capacidade do retinol e compostos correlatos de interferir na carcinogênese. O mecanismo exato do efeito carcinogênico ainda não foi esclarecido, porém nos seres humanos, a deficiência de retinol (vitamina A) aumenta a susceptibilidade à carcinogênese, as células basais de vários epitélios sofrem acentuada hiperplasia e redução da diferenciação celular. A administração do retinol ou retinóides em animais reverte essas alterações no epitélio do trato respiratório, da glândula mamária, da bexiga e da pele. Assim, a progressão de

células pré-malignas em células com características invasivas e malignas é diminuída, retardada, interrompida ou até mesmo revertida em animais de laboratório (MOON *et al*, 1994; HONG & ITRI, 1994).

São inúmeras as evidências de que os retinóides podem ser úteis na prevenção do desenvolvimento de vários tipos de neoplasias entre elas o carcinoma celular escamoso cutâneo em indivíduos de moderado a alto risco e carcinoma celular escamoso na cabeça e pescoço apesar de limitações como toxicidade e resistência adquirida (HONG *et al*, 1990; MOON *et al*, 1997; SMITH & SABA, 2005). Dragnev *et al* em 2000, através da revisão sobre estudos clínicos e pré-clínicos utilizando retinóides como agentes de prevenção do câncer, reportaram que derivados da vitamina A possuem atividade no tratamento específico de lesões pré-malignas e redução da incidência de tumores primários e secundários principalmente em pacientes com câncer na cabeça, pescoço, pulmão e fígado, porém ainda não se sabe como os retinóides irão prevenir câncer primário nestes sítios.

O desenvolvimento de retinóides menos tóxicos e mais efetivos (que atuam somente em receptores específicos) aumenta as chances de utilizar a quimioprevenção retinóide em indivíduos de alto risco (DI GIOVANNA, 1998), como por exemplo, doses até 0,5mg/Kg/dia de isotretinoína, via oral, podem ser usadas com segurança em pacientes com epidermólise bolhosa distrófica recessiva para uso em longo prazo com possível quimioprevenção do câncer (FINE *et al*, 2004).

Resultados otimistas sugerem que a terapia de diferenciação com retinóides pode proporcionar uma terapia eficaz para leucemias, bem como para outras neoplasias mais comuns (MARCUS & COUSTON, 2003). Para tratamentos de várias desordens pré-neoplásicas e neoplásicas, estudos com resultados encorajadores foram reportados, como o uso da isotretinoína no estudo piloto em leucemia mielogênica crônica juvenil (CASTLEBERRY *et al*, 1994) e combinações de quimioterápicos e terapia de diferenciação com isotretinoína para o tratamento de leucemia mielocítica juvenil (KANG *et al*, 2004), muitos benefícios também foram reportados em pacientes com linfomas nas células T em estágio avançado (THOMSEN, 1995; KNOBLER *et al*, 1991).

Robert Silver *et al* em 2003, notaram que a associação em longo prazo da isotretinoína com a quimioterapia convencional ( $\alpha$ -2- $\beta$  interferon e metotrexato) foi capaz de estabilizar o epitélio e diminuir a progressão da doença no controle da

papilomatose respiratória recorrente, já Duvic *et al*, 2003 trouxeram evidências de maior resposta e melhor tolerância ao tratamento de linfoma cutâneo de células T, através de um estudo em longo prazo com regimes combinados incluindo a isotretinoína oral na terapia. Combinações retinóides-não retinóides bem como com outras classes de agentes quimiopreventivos são promissoras para diminuir a incidência de tumores malignos do trato respiratório e digestivo (SMITH & SABA, 2005).

#### ***1.4.5 EFEITOS ADVERSOS***

Os efeitos adversos da isotretinoína e dos outros retinóides são similares aos da Vitamina A e são geralmente reversíveis e dose-dependentes. Os mais comuns incluem secura das membranas mucosas e da pele com descamação, fragilidade e eritema, especialmente na face, queilite, prurido, epistaxe, conjuntivite, boca seca e esfoliação palmo-plantar. Ocorrem ainda opacificação da córnea, secura dos olhos, distúrbios visuais, sintomas músculo-esqueléticos, aumento de triglicérides séricos com risco de pancreatite, elevação das enzimas hepáticas, da velocidade de sedimentação dos eritrócitos e da glicose sanguínea. Outros efeitos incluem afinamento e perda dos cabelos (ocasionalmente irreversíveis), fotossensibilidade, alterações na pigmentação da pele, paroniquia (inflamação na base das unhas), sintomas gastrintestinais, hepatite, cefaléia, sonolência, sudorese, alterações de humor, sintomas psicóticos, depressão, conduta suicida, hipertensão intracranial primária, ansiedade, vasculites, reações de hipersensibilidade incluindo anafilaxia e associação às infecções de pele e à síndrome do intestino irritável (MACLANE, 2001; JACOBS, 2001, SWEETMAN, 2002 A; FRAUNFELDER *et al*, 2004; STOLL *et al*, 2004).

A necessidade da prescrição restrita da isotretinoína para prevenir a teratogenicidade retinóide, devido a seus efeitos teratogênicos, em particular no período de 2 a 5 semanas após a concepção, causa uma média de 40% de risco de aborto espontâneo e 25% de risco de desenvolver má formação fetal. Mulheres devem tomar contraceptivos orais e fazer outro tipo de controle de natalidade, além de ter um resultado negativo de teste de gravidez antes de iniciar o tratamento oral com isotretinoína (NAU, 2001; SANTIS *et al*, 2007).

#### **1.4.6 RETINÓIDES EM NANOCARREADORES DE FÁRMACOS**

Estudos referentes à encapsulação de retinóides em sistemas de liberação modificada resultaram em avaliações satisfatórias sobre seus efeitos citotóxicos, antineoplásicos e anti-proliferativos. Por exemplo, o ácido *all-trans* retinóico (tretinoína) contido em lipossomas promoveu o aumento da atividade antitumoral e liberação específica no sítio de ação (DIAZ *et al*, 2006; NASTRUZZI *et al*, 1989). Trabalhos como os de Singh e Das em 1998 indicaram que sistemas lipossomais contendo vitamina A, foram capazes de diminuir a toxicidade com menor lise das células vermelhas sanguíneas e aumentar a estabilidade da vitamina A encapsulada em comparação a vitamina A não encapsulada. Liu *et al*, em 2007, demonstraram que o uso de nanocarreadores lipídicos contendo isotretinoína se torna promissor pela boa estabilidade e aumento significativo da captação de isotretinoína através da pele.

## 2. OBJETIVOS

### Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi desenvolver uma dispersão estável de nanocápsulas poliméricas biodegradáveis contendo isotretinoína com eficiência de encapsulação máxima satisfatória e avaliar a sua cinética de liberação *in vitro*.

### Objetivos específicos

- ❖ Padronizar o método de obtenção e formação das nanocápsulas em tamanhos inferiores a 200nm e baixo índice de polidispersão;
- ❖ Caracterizar tamanhos médios de populações de nanocápsulas e sua polidispersão conforme o método de preparação com dois tipos de polímeros, D,L-PLA e PLGA 50:50;
- ❖ Avaliar a estabilidade físico-química das nanocápsulas contendo isotretinoína;
- ❖ Determinar a eficiência de encapsulação em relação à quantidade de isotretinoína/polímero/tensoativos/óleo utilizados nas formulações;
- ❖ Investigar uma possível proteção do revestimento polimérico dada ao fármaco encapsulado durante o armazenamento da dispersão em longo prazo, na geladeira a +4°C e sob a exposição direta na luz UVA em temperatura ambiente;
- ❖ Avaliar o perfil de liberação *in vitro* da isotretinoína a partir das nanocápsulas obtidas.

# 3. MATERIAIS E MÉTODOS

## 3.1 MATERIAIS

### 3.1.1 COMPONENTES DA FORMULAÇÃO

- Isotretinoína MAG® (Italia)
- Poloxamer 188® ICI (França) – PM 8400
- D,L- PLA - PuraSorb® Poly-DL- Lactide, Purac Biochem® (Holanda) – Viscosidade inerente 0,55-0,75dL/g
- PLGA 50:50 – DL lactídeo 50mol% - Birmigham Polymers® (USA) – Viscosidade inerente 0,57g/dL
- Fosfatidilcolina – Lipoid S100 (100% PC) – Lipoid GMBA® (Alemanha)
- Óleo de soja - Sigma Aldrich® (St.Louis, USA)
- Fosfato de potássio monobásico anidro PA – Merck® (Darmstadt, Alemanha)
- Hidróxido de sódio PA – Merck® (Darmstadt, Alemanha)
- Acetona – Merck® (Darmstadt, Alemanha)
- Metanol – Merck® (Darmstadt, Alemanha)
- Água Milli-Q®

### 3.1.2 EQUIPAMENTOS

- Evaporador Rotativo TECNAL® TE-210 acoplado a um banho termostaticado e refrigerador TECNAL® TE 184 e a Bomba à vácuo TECNAL® TE 0581
- Centrífuga SIGMA® 3-18K
- Agitador de tubos - Vórtex Phoenix® AP 56
- Balança analítica Gehaka® AG-200
- Zeta Sizer Malvern® Nanoseries 50
- Espectrofotômetro CARY UV-VISIBLE VARIAN®
- Coluna de vidro (capacidade 25mL) com gel de Sephadex G-50® (granulometria 50µm)
- Microscópico óptico Leica® DME
- pH-metro digital Gehaka® PG 18000



- Mini incubadora com agitador orbital, MA 410, Shaker Marconi®
- Câmara fechada com luz UVA –  $\lambda$  365nm TECNAL® TE 540
- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência. Varian, modelo Pro-Star

### ***3.1.3 UTENSÍLIOS***

- Membranas de Celulose na forma de tubo (Cellu-Sep Membranes®)
- Seringas descartáveis de 10mL
- Agulhas descartáveis G22 (BD)
- Agulhas descartáveis G23 (BD)
- Tubos Falcon graduados de 10mL
- Béqueres 25 e 50mL
- Balões de vidro 250mL
- Pipetas volumétricas 1, 2, 3, 5, 10mL
- Pêras
- Espátula de inox e papel manteiga para pesagem
- Parafilme
- Papel alumínio
- Imãs magnéticos
- Tubos de ensaio
- Lâminas e lamínulas de vidro
- Coluna cromatográfica Ominisphere RP-18;

### ***3.1.4 OUTROS REAGENTES***

- Álcool etílico absoluto 99% PA Merck (Darmstadt, Alemanha)
- Acetonitrila grau HPLC JTBAKER
- Ácido Acético Glacial Merck

## 3.2 MÉTODOS

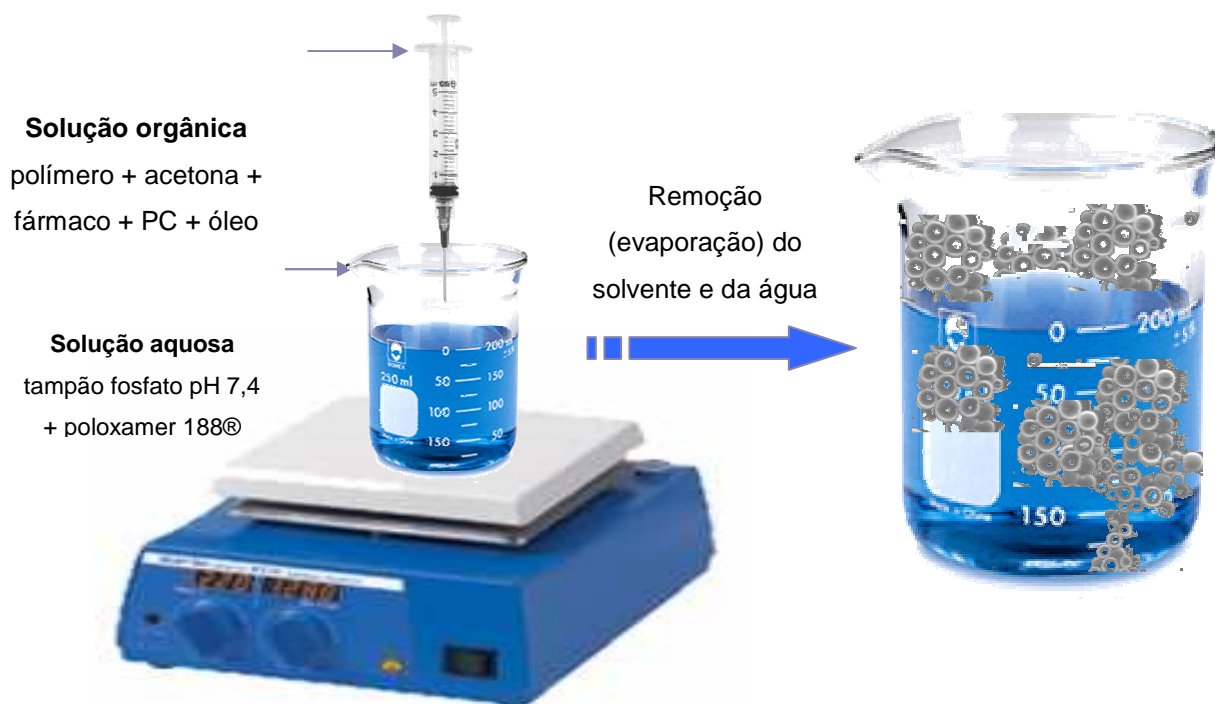
### 3.2.1 MÉTODO DE PREPARAÇÃO DAS NANOCÁPSULAS

Nanocápsulas contendo isotretinoína foram obtidas segundo o método de deposição interfacial de polímero pré-formado, proposto por Fessi e colaboradores (1989) com algumas modificações nas concentrações dos componentes da formulação e utilização de metanol para dissolver a fosfatidilcolina. Uma preparação oleosa (fase orgânica), diluída em acetona e metanol, constituída de PLGA 50:50 ou D,L-PLA, fosfolípido de soja, óleo de soja e isotretinoína foi inicialmente preparada em temperatura ambiente ( $\approx 25^{\circ}\text{C}$ ). O polímero foi dissolvido em 7 mL de acetona, o óleo de soja e isotretinoína em 10 mL de acetona, a fosfatidilcolina foi dissolvida em uma mistura de 5 mL de metanol e 5 mL de acetona. A fase externa aquosa foi preparada com adição do tensoativo hidrofílico poloxamer 188® em tampão fosfato pH 7,4. Após as dissoluções, as soluções orgânicas foram misturadas e introduzidas lentamente na solução aquosa (fase aquosa), previamente preparada e mantida sob agitação moderada antes e depois da adição da fase orgânica.

A adição da fase orgânica à fase aquosa foi realizada através de três tipos de gotejamento para comparação da influência deste processo na obtenção de populações de menor tamanho mais uniforme possível, sendo o primeiro tipo de gotejamento manual sem seringa, onde a solução orgânica é gotejada numa velocidade comandada pela força da mão do manipulador, o qual exerce uma pressão sobre o êmbolo empurrando-o para dentro da seringa e monitora aleatoriamente a velocidade do gotejamento, no segundo e terceiro tipo de gotejamento foram utilizados seringas de capacidade para 10mL e agulhas orifícios G22 e G23 respectivamente, obtendo um gotejamento com fluxo uniforme e contínuo, sem utilização do êmbolo, onde a força exercida sobre a descida do líquido foi somente por meio da gravidade.

O produto dessa agitação foi uma emulsão que permaneceu sob agitação magnética moderada o suficiente para formar bolhas, por um período de 30 minutos a fim de que as nanocápsulas fossem formadas de forma homogênea após a evaporação do solvente e precipitação do polímero em volta das gotículas da emulsão. A acetona e o metanol, os quais são rapidamente difundidos através da fase aquosa, foram então removidos sob pressão máxima reduzida de aproximadamente -600ATM a  $40^{\circ}\text{C}$ ,

originando uma dispersão coloidal. Esta dispersão coloidal foi concentrada para um volume final de 10mL pela remoção da água sob as mesmas condições (SANTOS *et al*, 2005) (Figura 5).



**FIGURA 5: MÉTODO DE FABRICAÇÃO DAS NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS CONTENDO ISOTRETINOÍNA.**

### 3.2.1.1. INCORPORAÇÃO DA ISOTRETINOÍNA NAS NANOCÁPSULAS

Para determinar a quantidade de isotretinoína incorporada nas nanocápsulas de PLGA 50 : 50 ou D,L-PLA (denominadas NC-ISO), diferentes condições experimentais foram avaliadas durante o estudo de pré-formulação. Foram variados as concentrações de fármaco e os tipos de gotejamento utilizado durante a etapa de formação da emulsão, na tentativa de obter nanogotículas com uma média de diâmetro padronizada e reprodutível a cada fabricação. Durante a fase de introdução da fase orgânica na fase aquosa foram utilizados três diferentes tipos de gotejamento manual: a) através de uma seringa com capacidade para 50mL sem agulha, onde o manipulador empurra o êmbolo da seringa controlando a velocidade do gotejamento manualmente, b) seringa com capacidade para 10mL, com agulha G22 (Gauge 22) correspondente à medida do diâmetro interno de 0,3937mm e c) agulha G23 (Gauge 23) correspondente à medida do diâmetro interno de 0,3175mm. As seringas b) e c) foram utilizadas sem êmbolo, onde o gotejamento foi efetuado naturalmente de acordo com a lei da gravidade.

Concentrações de 0,1 a 1,0 mg/mL de isotretinoína foram incorporadas a cada processo na intenção de avaliar a eficiência máxima de encapsulação para uma formulação estável de nanocápsulas. Foi inicialmente estabelecida uma relação entre FÁRMACO: POLÍMERO de 1: 30 e FARMACO: ÓLEO de 1: 20.

As primeiras formulações (1, 2 e 3) foram obtidas com PLGA 50:50, devido a disponibilidade deste polímero durante estágio no Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA – UFPE, onde foram obtidas. Na continuidade dos trabalhos, no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Faculdade de Farmácia, UFG, a disponibilidade de D,L-PLA foi determinante para a alteração do polímero e o desenvolvimento do trabalho, possibilitando ainda fazer comparações entre estes dois tipos de polímeros com e sem fármaco, utilizados na obtenção nas formulações para a obtenção de populações com tamanhos médios menores e mais uniformes possíveis.

A tabela 4 descreve as diversas formulações e as variações introduzidas durante os ensaios de otimização do método e processo de obtenção das nanocápsulas contendo isotretinoína.

Tabela 4: Formulações de nanocápsulas com PLGA 50:50 e D,L-PLA contendo isotretinoína (NC-ISO) obtidas com diferentes diâmetros das gotículas durante a fase de preparação da emulsão.

<b>Componentes das formulações NC-ISO</b>	<b>Formulações obtidas com gotejamento sem agulha</b>			<b>Formulações obtidas com gotejamento agulha G22</b>		<b>Formulações obtidas com gotejamento agulha G23</b>				
	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>
<b>PLGA 50:50 (0,57dl/g) (mg)</b>	150	150	150	-----	150	-----	-----	-----	-----	150
<b>D,L-PLA (0,49dl/g) (mg)</b>	-----	-----	-----	150	-----	150	150	150	135	-----
<b>PC L100 99% (mg)</b>	150	150	150	150	150	150	150	150	150	150
<b>Óleo de soja (mg)</b>	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
<b>Isotretinoína (mg)</b>	10	1	5	5	5	5	6	7	5	5
<b>Metanol (mL)</b>	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
<b>Acetona (mL)</b>	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22
<b>Tampão fosfato pH 7,4 (mL)</b>	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
<b>Poloxamer (mg)</b>	150	150	150	150	150	150	150	150	150	150

### **3.2.2 ESTABILIDADE FÍSICO-QUÍMICA (ENVELHECIMENTO ACELERADO DAS DISPERSÕES DE NANOCÁPSULAS)**

A dispersão de nanocápsulas obtida após a evaporação do solvente orgânico foi avaliada quanto ao aspecto de estabilidade físico-química através da utilização dos testes de envelhecimento acelerado (escolha da melhor formulação durante o processo de otimização) e envelhecimento em longo prazo (acompanhamento da estabilidade selecionada em tempo real). Estes testes tiveram como objetivo principal submeter as preparações às condições de estresse para simular processos de esterilização, transporte e armazenamento. Nos ensaios de estabilidade acelerada, a dispersão foi analisada seguindo as metodologias descritas abaixo adaptadas de Santos *et al*, 2005.

Resistência à centrifugação: A amostra foi submetida à centrifugação a 2500 rpm, durante 1h, na temperatura de 25°C, simulando uma passagem acelerada do tempo.

Resistência às vibrações mecânicas (Estresse mecânico): O teste consiste em simular condições de transporte. Uma alíquota da amostra foi colocada em tubo falcon bem fechado, deitado dentro de uma mini – incubadora com agitador orbital termostaticamente controlada, à temperatura de 37°C, sob trepidação horizontal de ≈150 oscilações/min, durante 48h.

Resistência a ciclos de congelamento e descongelamento: Alíquotas, da dispersão, foram congeladas durante 16h a –18°C e descongeladas por 8h a 25°C, com o intuito de avaliar a resistência da dispersão através de gráficos fornecidos pelo Zeta sizer Malvern® e fotomicrografia óptica após 30 ciclos.

Potencial zeta ou Carga elétrica das partículas: Amostras das dispersões obtidas a partir do PLGA 50:50 sem ativo (nanobranca) e com isotretinoína 0,5 mg/mL, como também a isotretinoína isolada em solução, foram avaliadas de acordo com a carga elétrica de partícula fornecida pelo Zeta sizer Malvern® em meio aquoso.

### ***3.2.3. TAMANHO MÉDIO DA PARTÍCULA E ÍNDICE DE POLIDISPERSIBILIDADE (PDI)***

As dispersões foram avaliadas após a fabricação quanto ao tamanho médio das partículas e seu PDI, ou seja, Índice de Polidispersabilidade, que indica o grau de uniformidade de tamanho entre as populações, quanto mais próximo de zero estiver o índice, menor a diferença entre o tamanho das populações de nanocápsulas formadas na dispersão.

As dispersões foram preparadas com diferentes métodos de obtenção (formas de gotejamento), na tentativa de padronizar o método de obtenção da preparação com melhor tamanho médio entre populações formadas e menores PDI's, garantir uma reprodutibilidade na obtenção da média de tamanho com índices de polidispersabilidade próximos a zero, como também evitar a formação de aglomerados e micropartículas na dispersão.

Através de gráficos fornecidos pelo Zeta Sizer® foi efetuada uma comparação de tamanho entre as nanocápsulas de PLGA 50:50 e D,L-PLA com ativo (NC-ISO) e sem ativo (nanobranças), a relação entre o tamanho médio, PDI e aparecimento de micropartículas com o tamanho das nanogotículas de óleo formadas durante o processo de emulsificação. Foi também avaliado o pequeno precipitado que aparece nas dispersões após o teste de centrifuga separando-o do sobrenadante e comparando a média de tamanho das suas partículas com a da dispersão original.

Através da microscopia óptica as dispersões foram observadas em microscópio óptico, com objetiva de imersão (100x), quanto a presença de microcápsulas, visualização do movimento browniano exercido entre as nanopartículas quando dispersas em um meio líquido, homogeneidade de tamanho das partículas dispersas, presença de cristais alaranjados de isotretinoína ou agregação polimérica e/ou lipídica, registrados através de fotomicrografias.

#### **3.2.4. ESTABILIDADE FÍSICO-QUÍMICA (ENVELHECIMENTO EM LONGO PRAZO DAS DISPERSÕES DE NANOCÁPSULAS)**

O teste consistiu em avaliar a durabilidade da melhor formulação obtida e padronizar a obtenção de nanopartículas com tamanho médio inferior a 200 nm e PDIs similares a 0,1. Para os ensaios de estabilidade em longo prazo foram utilizadas somente as nanocápsulas de D,L-PLA. As amostras foram avaliadas imediatamente após a sua fabricação, e em seguida, ou até a manutenção da estabilidade, em intervalos de 15, 30, 60, 90, 120 e 150 dias. Nestes intervalos de tempo, alguns parâmetros foram investigados, tais como: aspectos macro e microscópicos, variações de pH e tamanho médio de partícula, seguindo as metodologias descritas a seguir:

- Aspecto macroscópico: As características organolépticas das formulações foram analisadas, observando visualmente o aparecimento de mudanças no aspecto geral, tais como: coloração com ou sem fluorescência, deposição de resíduos e/ou cristais de cor laranja da isotretinoína, formação de grumos, cremagem ou nata sobrenadante, gotículas de óleo aderidas ao vidro, floculação ou separação de fases (SANTOS *et al*, 2005).
- Estudo da variação do pH: A variação do pH foi analisada utilizando-se um potenciômetro digital equipado com um eletrodo de vidro e um sensor de temperatura. O aparelho foi previamente calibrado com tampões de pH 4,0; 7,0 e 10. Alíquotas de nanocápsulas foram colocadas em béquer para que eletrodo introduzido permitisse a leitura imediata do pH das formulações.
- Tamanho médio da partícula e PDI : É uma importante propriedade da dispersão coloidal uma vez que a tendência de sedimentar é determinada por alterações neste parâmetro (Magenheim & Benita,1991). As dispersões foram monitoradas ao longo do tempo quanto à manutenção do tamanho médio das partículas e PDI da dispersão armazenada em geladeira ( $4,0^{\circ}\text{C} \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ ) a fim de se avaliar o tempo



máximo da estabilidade físico-química da formulação com o decorrer do tempo (Teixeira et al, 2005).

- Estabilidade do fármaco encapsulado durante o armazenamento: O efeito protetor do revestimento polimérico sobre a estabilidade da isotretinoína foi avaliado após o armazenamento da dispersão em geladeira (4°C) em vários intervalos de tempo. O monitoramento foi realizado através da leitura da absorbância máxima da isotretinoína encapsulada em  $\lambda = 336\text{nm}$ , durante intervalos de tempo 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120 e 150 dias, permitindo acompanhar uma possível degradação do fármaco encapsulado ao longo do tempo, a quantificação da isotretinoína foi efetuada de acordo com o método utilizado para avaliar a eficiência de encapsulação, precipitando o polímero com etanol, obtendo a absorbância máxima e aplicando a equação da reta obtida através da curva de calibração descritos nos itens 3.2.5. e 3.2.5.1.
- Aspecto microscópico: A dispersão foi observada ao longo do tempo, com auxílio da microscopia óptica com objetiva de imersão (100 x), para a visualização da homogeneidade de tamanho garantindo a estabilidade da dispersão em relação ao tempo de armazenamento, possível formação de aglomerados ou aparecimento de cristais ou agregação polimérica e/ou lipídica, registrado através de fotomicrografia juntamente com os outros ensaios citados acima.

### **3.2.5 EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO**

A eficiência de encapsulação foi determinada após a preparação da dispersão de nanocápsulas. O fármaco encapsulado foi separado do fármaco livre utilizando a cromatografia de exclusão por tamanho em coluna de vidro com gel de Sephadex G50 com diâmetro de 1 cm e altura de 35 cm preenchida pelo gel (Figura 6). Aplicando uma alíquota de 0,5 mL da dispersão de nanocápsulas de isotretinoína, dentro da coluna contendo o gel de Sephadex e logo após cerca de 40mL de tampão fosfato pH 7,4 como eluente, foi separado cerca de 40 frações contendo aproximadamente 1mL cada, e submetidas a medida da leitura da absorbância máxima em espectrofotômetro UV-VIS, utilizando comprimento de onda de  $\lambda = 336\text{nm}$  (comprimento de onda de absorção máxima da isotretinoína). Ao analisar cada fração e obter a respectiva absorbância foi possível identificar aquelas contendo fármaco encapsulado e fármaco livre, onde as alíquotas correspondentes às frações nas quais foram eluídas as nanocápsulas sempre possuíam absorbâncias de valores altos acima de 1,0. Estas foram reunidas e o volume total foi medido e registrado (cerca de 6 a 10mL dependendo da coleta). Retirou-se 1mL deste volume e foram acrescentados 3 mL de etanol PA para promover a precipitação do polímero e solubilização da isotretinoína. Na seqüência, esta mistura foi homogeneizada em vórtex e então centrifugada a 5000 rpm por 5 minutos para total remoção do polímero precipitado. Após a separação do sobrenadante, foi feita nova leitura da absorbância máxima da isotretinoína no espectrofotômetro UV-VIS a  $\lambda = 336\text{nm}$  para calcular a concentração de fármaco encapsulado, obtendo esta absorbância máxima e aplicando a equação da reta obtida através da curva de calibração descrita no item 3.2.5.1., possibilitando determinar a concentração de isotretinoína encapsulada e sua eficiência de encapsulação.

### 3.2.5.1 CURVA DE CALIBRAÇÃO

O ponto de partida foi uma solução estoque de isotretinoína em etanol PA contendo 5 mg/mL. Diluições volumétricas sucessivas foram efetuadas utilizando como solvente uma mistura etanol: tampão fosfato pH 7,4 na proporção de 1:1. O intervalo de concentrações para a curva analítica foi entre 0,001 a 0,025 mg/mL. (Figura 5).

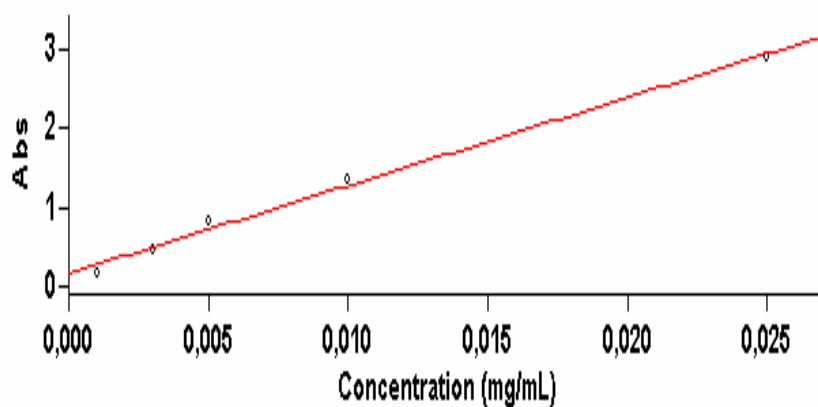


Figura 6: Curva de calibração da isotretinoína.

$$\text{ABS} = 112,38035 * \text{Conc.} + 0,15221$$

$$R^2 = 0,99417.$$

### 3.2.5.2 ESPECTROS DE VARREDURA DE ABSORÇÃO UV EFETUADO NO ESPECTROFÔTOMETRO DE CADA COMPONENTE DA FORMULAÇÃO DE NANOCÁPSULAS DE ISOTRETINOINA.

Espectros de varredura UV-VIS foram obtidos no intervalo de 250 a 400 nm para conferir qualquer possível interferência na absorbância máxima no mesmo comprimento de onda, 336 nm, dada por algum outro componente da formulação (óleo de soja, fosfatidilcolina, poloxamer 188, polímero D,L-PLA, tampão fosfato, nanocápsula sem ativo).

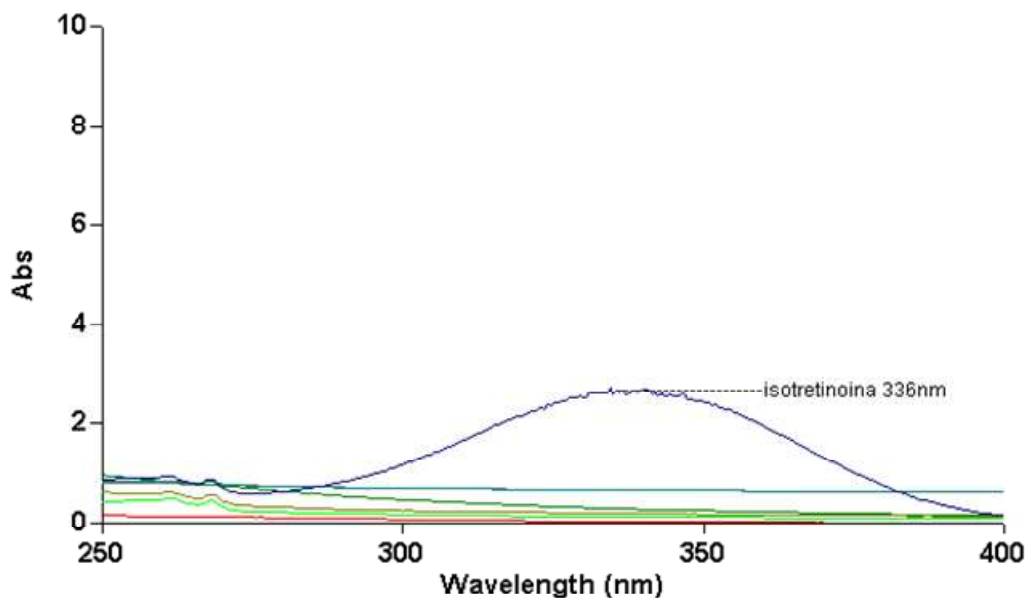


Figura 7: Varredura dos espectros de absorção no UV de cada componente da formulação de nanocápsulas. Isotretinoína (azul escuro), tampão fosfato pH 7,4 (azul claro), fosfatidilcolina (vermelho), óleo de soja (marrom), Poloxamer 188 (verde escuro), Nanobranca (verde claro).

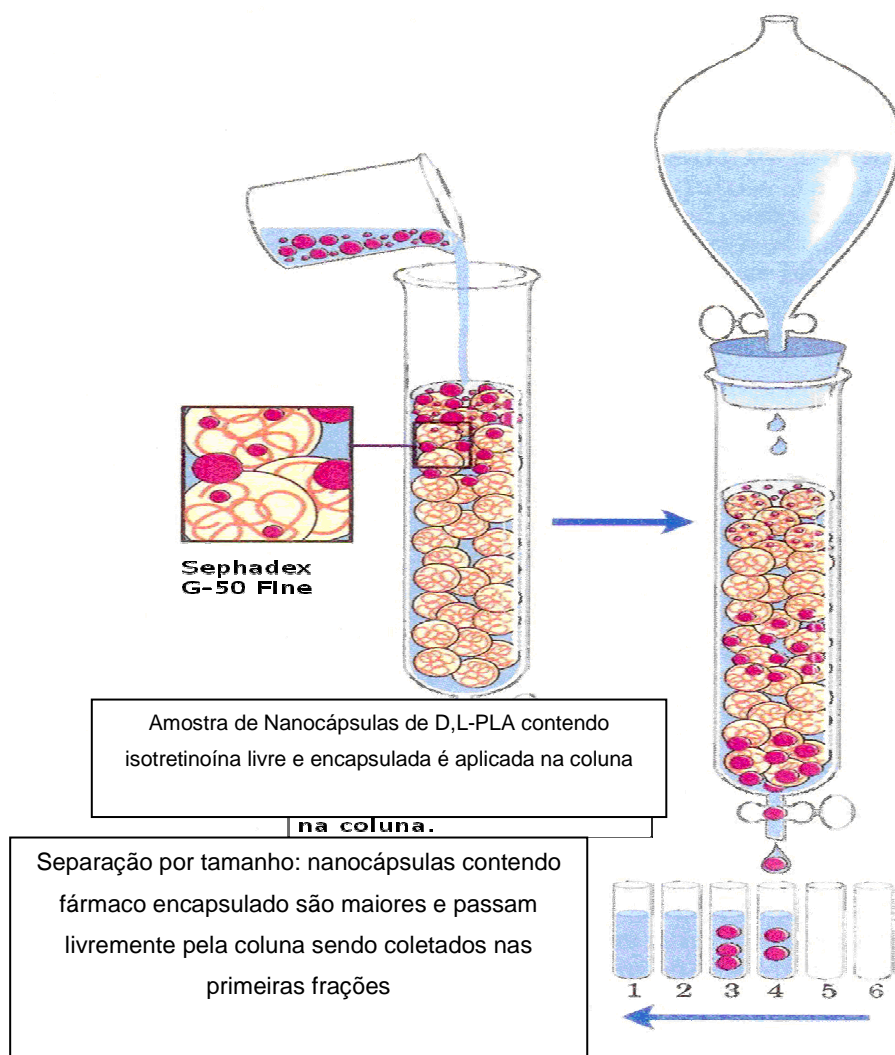


Figura 8: Esquema de separação das frações de nanocápsulas e fármaco livre através da coluna de gel de Sephadex®, pelo método de exclusão por tamanho.

### 3.2.5.3 Cromatografia Líquida de alta eficiência (CLAE).

Foi utilizado cromatógrafo Varian, modelo Prostar, com injetor automático, detector UV-visível, coluna Ominispher RP 18 (150 mm x 4,6 mm) em fase reversa constituída de acetonitrila : água na proporção de 80:15 v/v acidificadas com 0,5 % ácido acético. O comprimento de onda selecionado para o detector de UV-visível foi de 360 nm. Apresentando as seguintes curvas de calibração para a isotretinoína(a) e tretinoína (b): (a)  $y=0,01322+2,48115.X$  com  $R^2:0,9989$  e (b)  $y=6,1108.10^{-3} +3,47420.X$  com  $R^2:0,9991$ .

### 3.2.6 CINÉTICA DE LIBERAÇÃO IN VITRO

Os perfis de liberação da isotretinoína das preparações de nanocápsulas foram determinados como a concentração de isotretinoína liberada das nanocápsulas para o meio receptor (tampão fosfato pH 7,4 a 37°C) em função do tempo. Alíquotas das amostras foram coletadas em triplicata, em tempos variáveis e sucessivos, como: 0; 0,25; 0,5; 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 12; 15; 18 e 24 horas ao longo do ensaio de liberação, quando foram obtidos valores médios da concentração de isotretinoína encapsulada, desvio padrão (DP), teor de isotretinoína encapsulada dado em porcentagem e sua respectiva liberação dada também em porcentagem. A avaliação da liberação da isotretinoína encapsulada foi realizada através de um sistema de diálise adaptado em mini-incubadora com agitação orbital, nas seguintes condições: volumes de 100 mL de meio receptor para cada intervalo de tempo, temperatura 37° C e agitação constante ( $\approx$  77 rpm). A liberação foi avaliada utilizando-se como meio de dissolução o próprio tampão fosfato constituinte da preparação das nanocápsulas. Foram utilizadas membranas de diálise (acetato de celulose) em forma de tubo, dentro das quais foram colocados 0,5mL da preparação de nanocápsulas previamente diluída a 1:10 para estabelecer a condição “sink” do meio receptor, com velocidade e agitação padronizadas, tentando mimetizar ao máximo as condições do trato gastro-intestinal. O tubo de diálise foi mergulhado no meio de dissolução e a liberação da isotretinoína foi avaliada em intervalos de tempo durante 24horas. A cada tempo foi retirado um tubo de diálise e coletada amostra de 0,25mL do seu interior, que foi então quantificada para determinar seu conteúdo em isotretinoína.

**Condição sink:** Definir condições “sink” pode variar de acordo com a fonte bibliográfica, o *Pharmacopeial Fórum* de 1981 as define como 3 vezes o volume de saturação do fármaco dentro de uma faixa entre 500 a 1000mL, entretanto atualmente é aceito que um volume de 5 a 10 vezes o necessário para saturação, seja o suficiente para manter as condições “sink” do meio receptor e evitar a saturação do fármaco neste meio (ABDOU, 1989). Foi então estabelecida uma condição essencial do meio receptor externo aquoso, para evitar qualquer interferência da solubilidade da isotretinoína em sua liberação *in vitro*.

**Teste de solubilidade da Isotretinoína em tampão Fosfato pH 7,4:** Foi utilizado 5mg de isotretinoína para 10mL de tampão fosfato pH7,4 em um béquer tampado e protegido da luz com filme PVC e papel alumínio. Este foi então submetido ao banho de ultrassom por 20minutos e após sob agitação magnética por 24horas. A isotretinoína não dissolvida foi separada e a solução filtrada foi recolhida e diluída numa proporção de 1mL de amostra para 5mL de álcool etílico e o branco foi obtido com 1mL de tampão fosfato pH 7,4 e 5mL de álcool etílico.

A quantificação da isotretinoína foi efetuada através da leitura no espectrofotômetro Carry® UV-VIS  $\lambda = 336\text{nm}$ . Após obter a absorbância máxima de 0,2289 para isotretinoína dissolvida, foram aplicados os cálculos da equação da reta obtida através da curva de calibração, descrito no item 3.2.5.1.

A solubilidade máxima da isotretinoína no tampão fosfato pH 7,4 foi determinada a 0,0007mg/mL, a sua concentração total máxima no meio receptor foi estabelecida a 0,00025mg/mL, cerca de três vezes inferior à sua concentração máxima.

**Ponto de partida:** dispersão concentrada de nanocápsulas que contém isotretinoína encapsulada na concentração de 0,5mg/mL. Diluição 1 NC-ISO: 1mL da dispersão de nanocápsulas concentrada + 9mL de tampão fosfato (10%) = 0,05mg/mL de isotretinoína.

**Procedimento:** em vidro âmbar de 125mL, foram colocados 0,5mL (0,025mg de isotretinoína) da diluição 1 NC-ISO dentro da membrana de diálise Cellu Sep® para 100mL de meio receptor tampão fosfato pH 7,4 (concentração máxima possível de ser liberada no meio receptor = 0,00025mg/mL). Cada frasco foi preparado e colocado na incubadora com agitação orbital MA410 Marconi®, mantidos à temperatura de 37°C e velocidade de agitação de 77rpm. O branco (controle) foi preparado da mesma forma, mas com nanocápsulas “brancas”, ou seja, sem isotretinoína.

### ***3.2.7 ENSAIOS DE FOTODEGRADAÇÃO DA ISOTRETINOÍNA LIVRE E ENCAPSULADA SOB EXPOSIÇÃO À RADIAÇÃO UVA 365 nm A 25°C***

Amostras de isotretinoína livre e da dispersão de nanocápsulas contendo isotretinoína foram submetidas à luz UVA direta em temperatura ambiente e, analisadas por cromatografia líquida de alta resolução segundo método descrito no item 3.2.5.3.

Para avaliação da fotoestabilidade 330 uL da dispersão de nanocápsulas contendo 0,5 mg/mL de isotretinoína, foram diluídas com 24,67 mL de tampão fosfato no sentido de obter concentração dentro da faixa de linearidade no método cromatográfico utilizado. Para avaliar a fotodegradação da dispersão diluída, 0,5 mL da mesma foram acrescidos de 2,5 mL de etanol para a precipitação e remoção do polímero. Em seguida as amostras foram homogeneizadas em vortex e centrifugadas a 5000 rpm por 5 minutos para separação completa do polímero. Após precipitação do polímero, o sobrenadante contendo isotretinoína foi levado ao HPLC para determinação da concentração de isotretinoína na amostra

Já para a isotretinoína livre 96,25 ul de uma solução de 0,4 mg/ml de isotretinoína em etanol foram utilizadas para preparar 35 mL de uma solução alcoólica de isotretinoína.

As amostras foram coletas com 2,5,10,15,30,45,60,120,180,240,300,360,420,480 minutos, para comparar e avaliar possível proteção dada ao fármaco pelo filme de revestimento polimérico.



## **4. Resultados e Discussão**

### **4.1. OTIMIZAÇÃO DA FORMULAÇÃO DE NANOCÁPSULAS COM INCORPORAÇÃO DA ISOTRETINOÍNA.**

As formulações NC-ISO foram obtidas com dois tipos de polímeros, PLGA 50:50 (NC ISO 1, 2, 3, 5 e 10) e D,L-PLA (NC ISO 4, 6, 7, 8, 9), diferentes tipos de gotejamento: sem agulha (NC ISO 1,2 e 3), com agulhas G22 (NC ISO 4 e 5) e agulhas G23 (NC ISO 6,7,8,9 e10), diferentes quantidades (p/v) de isotretinoína: 10mg (NC ISO 1), 1mg (NC ISO 2), 5mg ( NC ISO 3,4,5,6,9 e 10), 6mg (NC ISO 7) e 7mg (NC ISO 8) e uma variação na concentração de PLA para 135mg (NC ISO 9) (Ver Tabela 4, na página nº 4445).

A análise das características físico-químicas logo após a fabricação indicou que as formulações de NC-ISO com D,L-PLA e PLGA 50:50 produziram um líquido amarelo claro de aspecto leitoso, presença visível de fluorescência, e ausência de indicadores de instabilidade (resíduos insolúveis em água aderidos ao balão do rotaevaporador, cristais alaranjados de isotretinoína, cremagem pelo excesso de tensoativos e óleos, aglomerados e sedimentos de polímeros não redispersíveis) e os pHs das dispersões entre 7,3 e 7,4.

As características organolépticas e o pH das dispersões NC-ISO 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 10 conferidas após a fabricação foram similares para os dois tipos de polímeros utilizados, PLGA 50:50 e D,L-PLA.

As formulações 1 e 8 apresentaram precipitados alaranjados de isotretinoína após 48 horas de preparação e a formulação 9 apresentou menor fluorescência visível a olho nú que as demais, deixando resíduos de natureza hidrofóbica aderidos ao balão do rotaevaporador, difíceis de retirar com água e facilmente removíveis com acetona, o que indica serem resíduos constituintes da fase orgânica.

Todas as formulações foram posteriormente avaliadas nos testes de estabilidade acelerada.

## **4.2. ENVELHECIMENTO ACELERADO DAS NANOCÁPSULAS DE ISOTRETINOINA**

As características organolépticas das dispersões NC-ISO 2,3,4,5,6,7 e 10 conferidas após os testes de estabilidade acelerada foram similares para os dois tipos de polímero utilizado, PLGA 50:50 e D,L-PLA. Estas amostras foram posteriormente avaliadas no Zeta sizer Malvern® para verificar a uniformidade de tamanho das populações obtidas. As dispersões de nanocápsulas de isotretinoína que foram submetidas aos testes de estabilidade acelerada, com exceção das formulações de número 1, 8 e 9, apresentaram resultados satisfatórios quanto à estabilidade.

As formulações contendo isotretinoína acima de 0,7mg/mL (1 e 8) exibiram cristais de isotretinoína alaranjados, visíveis a olho nú e através de fotomicrografias, agregados e precipitados. A completa ausência de agregados ou sedimentos contendo cristais de cor laranja em concentrações inferiores a 0,6 mg/mL pareceu indicar que a isotretinoína foi completamente dissolvida na fase oleosa nanoencapsulada. Após centrifugação, as formulações obtidas através do gotejamento G22 (4 e 5) exibiram quantidade maior de precipitado cor creme redispersível, ocupando cerca de 2,5% do volume total da dispersão, já as formulações obtidas com gotejamento G23, exceto a formulação 9, apresentaram um leve precipitado fino e redispersível, que ocupou menos de 1% do volume total da dispersão. Estes precipitados e seus respectivos sobrenadantes foram analisados quanto ao tamanho médio das suas partículas ressuspensas no Zeta Sizer Malvern® e quanto à presença ou não de aglomerados de microcápsulas ou resíduos de polímeros facilmente visíveis na microscopia óptica.

A composição original foi mantida com a proporção de 1:1 de tensoativos hidrofílico e lipofílico, poloxamer 188 e fosfatidilcolina 150mg respectivamente, e duas formulações de isotretinoína, as formulações 6 e 7 preparadas com D,L-PLA e gotejamento G23 contendo 0,5 e 0,6mg/mL de isotretinoína respectivamente, resultaram em satisfatória resistência aos testes de estabilidade acelerada, estresse mecânico e centrifugação (Tabela 5), estas formulações foram consideradas estáveis

nos testes de estabilidade acelerada (Ver Tabela 4, na página nº 4445), as quais foram obtidas com as seguintes proporções 0,5:15 e 0,6:15 fármaco:polímero e 0,5:10 e 0,6:10 fármaco: óleo, dependendo mais adiante dos resultados dos testes de eficiência máxima de encapsulação, os quais foram importantes para determinar qual das duas proporções será mais adequada indicando a maior quantidade de isotretinoína encapsulada.

Na formulação 9, após o teste de centrifuga, apareceu cremagem sobrenadante e ausência do pequeno precipitado creme, provavelmente causada por quantidade insuficiente de polímero D,L-PLA na formulação e conseqüente excesso de óleo e tensoativo, já que esta formulação foi preparada com 10% menos polímero do que a formulação original, de 150mg para 135mg. Esta redução teve o propósito de evitar a formação do fino precipitado creme que aparece nas outras formulações. Esta foi também posteriormente avaliada quanto a sua eficiência máxima de encapsulação.

Tabela 5: Resultados dos ensaios de estabilidade acelerada das nanocápsulas de PLGA 50:50 e D,L-PLA contendo isotretinoína

Testes de estabilidade acelerada para resistência	Formulações NC-ISO			
	1	2,3,4,5,6,7 e 10	8	9
Estresse mecânico (≈150 rotações /minuto, 37°C, 48h)	Precipitado laranja de isotretinoína	Estável	Precipitado laranja de isotretinoína	Estável
Centrifugação 2500rpm/1hora	Precipitado laranja de isotretinoína	Pequeno precipitado creme redispersível	Precipitado laranja de isotretinoína	Cremagem redispersível

Nos ensaios de resistência aos ciclos de congelamento e descongelamento, efetuados apenas com a dispersão F6 (0,5 mg/mL de isotretinoína) que permaneceu visivelmente estável (não separou fases, ausência de óleo livre e cristais alaranjados de isotretinoína), formou-se, após 30 dias, um visível precipitado redispersível. A formação deste precipitado foi crescendo gradativamente na medida em que a amostra permaneceu exposta ao estresse de congelamento e descongelamento; como demonstrado na Figura 9. Os aglomerados também apareceram na fotomicrografia da dispersão conforme Figura 10. Em experimento semelhante realizado por Santos e colaboradores (2005), em uma preparação de nanocápsulas de PLGA contendo ácido úsnico de composição similar para quantidade de fase aquosa/tensoativo hidrofílico e

proporção de fase orgânica/oleosa, a formulação resistiu ao estresse de congelamento e descongelamento por 45 dias. Entretanto, estes autores relatam apenas a observação macroscópica para a análise da ocorrência de precipitado, cremagem e agregados, ao passo que neste trabalho o comportamento das amostras foi monitorado por medidas de tamanho por espalhamento de luz e microscopia óptica.

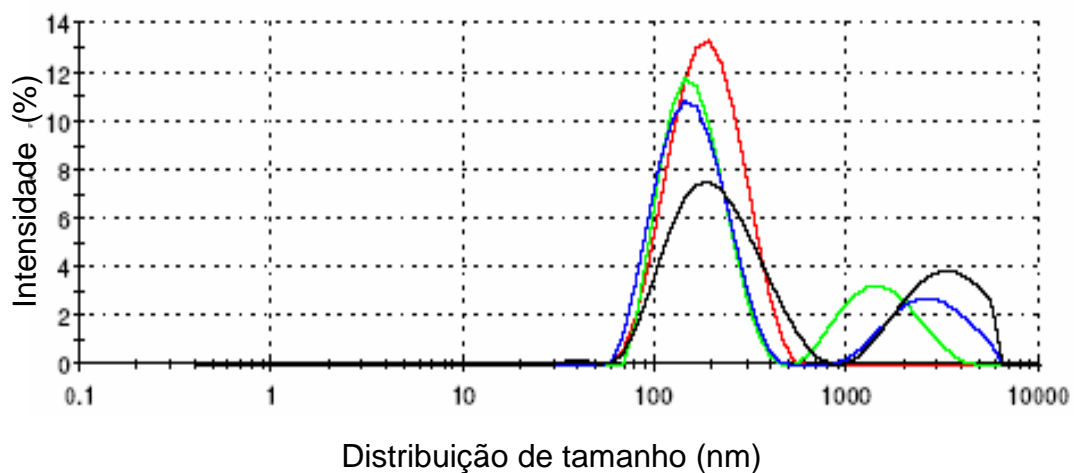


Figura 9: Tamanho e distribuição de tamanho da amostra NC-ISO 6 submetida a ciclos de congelamento e descongelamento. Em vermelho: antes do primeiro congelamento, verde: após 10 ciclos, azul: 15 ciclos e preto: 30 ciclos.

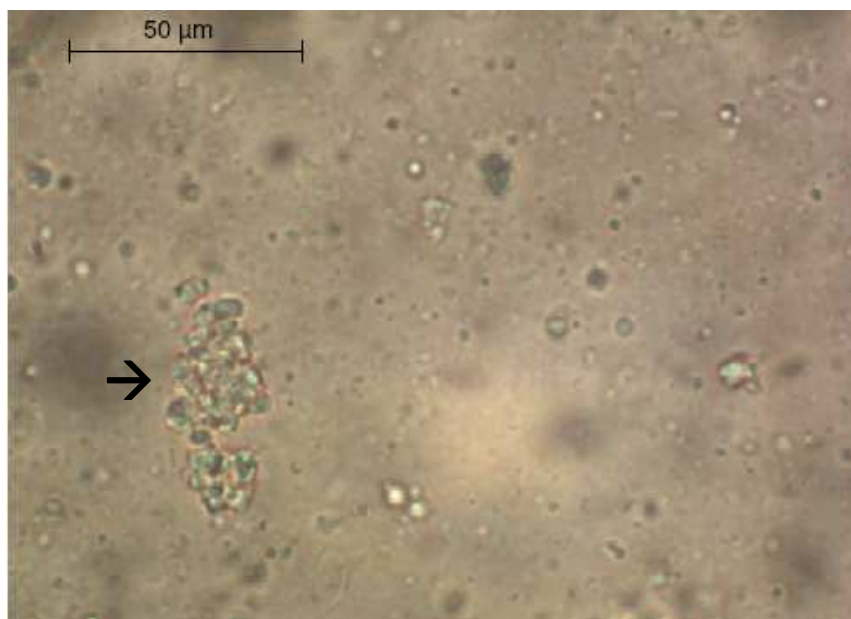


Figura 10: Fotomicrografia da dispersão NC-ISO 6 (0,5mg/mL) após 30 ciclos de congelamento/descongelamento. Presença de aglomerados, ausência de cristais alaranjados de isotretinoína.

#### **4.3 CARGA DA SUPERFÍCIE DA PARTÍCULA (POTENCIAL ZETA - $\xi$ )**

Os resultados do potencial Zeta demonstraram cargas negativas para as nanocápsulas com valores tipicamente descritos nestes sistemas (Tabela 6), o valor negativo encontrado para as nanocápsulas de PLGA 50:50 sem fármaco, com fármaco e da isotretinoína isolada é proveniente da presença de grupamentos terminais carboxílicos nas suas moléculas e também das próprias características de outros componentes da formulação das nanocápsulas, como a fosfatidilcolina e óleo que são compostos de fosfolipídios e ácidos graxos livres carregados negativamente (TEIXEIRA *et al*, 2005). O valor negativo fornecido à interface proporciona uma repulsão eletrostática entre as partículas quando dispersas em água, evitando a atração entre elas e formação de aglomerados. A variação da carga da superfície da nanocápsula aumenta conforme a ionização dos grupos carboxílicos terminais presentes nos polímeros, especialmente nos poli-alfa-hidroxi-ácidos (polímeros de ácido lático e ácido glicólico). A presença da isotretinoína nas nanocápsulas pode contribuir para aumentar a carga negativa do potencial Zeta na superfície polimérica,

sugerindo que certa quantidade de isotretinoína possa estar aderida à membrana polimérica da nanocápsula em contato com o meio externo aquoso.

Tabela 6: Potencial Zeta de nanocápsulas de PLGA 50:50 sem isotretinoína, com isotretinoína e isotretinoína livre (Dados obtidos no equipamento ZetaSizer do Departamento de Física da UFPE)

<b>Formulação</b>	<b>Potencial Zeta (<math>\xi</math>) (mV )</b>
Nanobranca (sem ativo)	-17
NC-ISO PLGA 50:50 0,5 mg/mL	-22
Isotretinoína livre	-9

#### ***4.4 TAMANHO MÉDIO DAS PARTÍCULAS E ÍNDICE DE POLIDISPERSIBILIDADE (PDI)***

O tipo de preparo com gotejamento G23 foi fundamental para obter populações de tamanhos médios abaixo de 200nm e PDIs 0,1, tanto para nanocápsulas compostas de D,L-PLA quanto PLGA 50:50, porém os gotejamentos através da seringa sem agulha e agulha G22 demonstraram ser incapazes de reproduzir estes tamanhos médios e PDIs entre as amostras (tabela 7).

A agulha G23 (0,3175 mm) possui um diâmetro interno cerca de 25% menor que a agulha G22 (0,3937mm) e o gotejamento sem agulha também fornece gotículas maiores como a agulha G22 e não garante uniformidade de fluxo podendo ser atribuído à fase orgânica gotejada de acordo com a capacidade do operador de empurrar o êmbolo da seringa e controlar sua vazão. Quanto mais uniforme o fluxo do gotejamento e menores forem as gotículas produzidas durante o processo da emulsificação, menor o tamanho médio e PDI das partículas resultantes, aumentando a uniformidade de tamanho entre as populações de nanocápsulas.

A presença do fármaco não alterou o tamanho médio das populações obtidas através do gotejamento com agulha G23 e não foi observada diferença entre os

tamanhos médios e PDIs obtidos nas dispersões das nanopartículas contendo D,L-PLA e PLGA 50:50 com (NC-ISO) ou sem fármaco (nanobranca) (Tabela 7 e figura 11).

Tabela 7: Comparação entre a média de tamanho das partículas ( $\emptyset$  médio) e distribuição de tamanho (PDI) das populações de nanocápsulas de isotretinoína (0,5 mg/mL) e Nanobranca de D,L-PLA e PLGA 50:50 obtidas através dos três tipos de gotejamento durante a fase de emulsificação (sem agulha, G22 e G23).

		<i>Formulações de Nanocápsulas de isotretinoína 0,5mg/mL e Nanocápsulas sem ativo (nanobranca- NB) obtidas com PLGA 50:50 e D,L-PLA</i>							
Tipo de preparo	sem agulha		G22		G23				
Formulação	NB (PLGA)	3 (PLGA)	NB (PLA)	4 (PLA)	NB (PLGA)	10 (PLGA)	NB (PLA)	6 (PLA)	
$\emptyset$ médio (nm)	167	244,5	211,8	267,1	175	178	153	167	
PDI	0,22	0,32	0,25	0,28	0,12	0,15	0,11	0,13	

\*Ver tabela 4 composição de cada formulação (pág. 44)

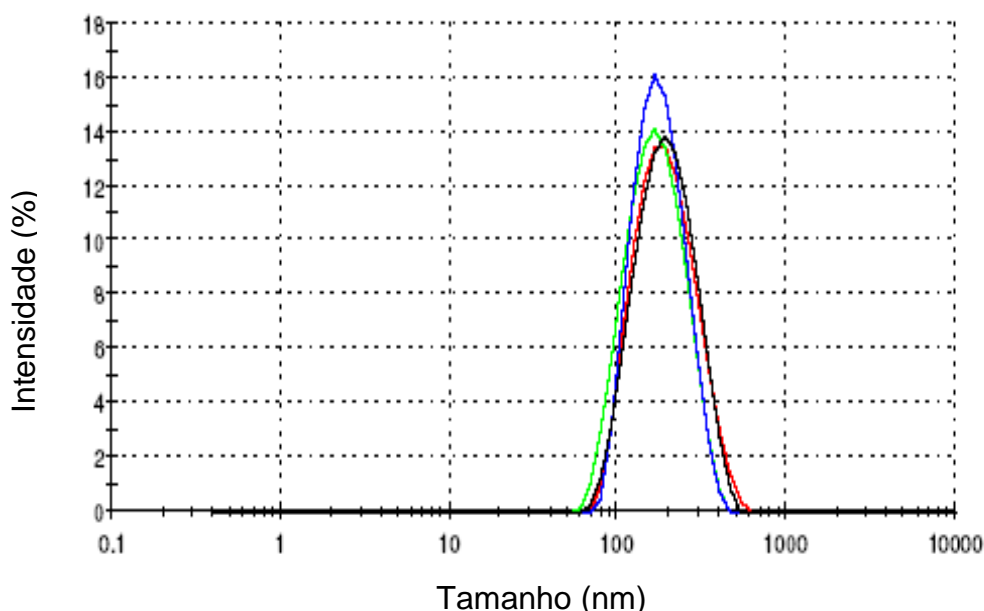


Figura 11. Comparação entre a distribuição de tamanho das formulações obtidas através do gotejamento G23 nas preparações de nanocápsulas com D,L-PLA contendo isotretinoína 0,5mg/mL (azul) e nanobranca (verde), e PLGA 50:50 contendo isotretinoína 0,5mg/mL (vermelho) e nanobranca (preto).

O gotejamento através da agulha de maior diâmetro G22 permitiu certa reprodutibilidade na obtenção de tamanhos médios das gotículas devido a sua velocidade constante de fluxo, como também permitiu reproduzir uma média de tamanho e PDI similares para as três amostras obtidas nas mesmas condições (Tabela 8). Entretanto, este diâmetro do orifício da agulha demonstrou ser grande o suficiente para influenciar na obtenção de um PDI acima de 0,2 e na formação de populações de micropartículas com tamanhos na faixa de 2 a 5µm (Figura 12).

Tabela 8: Comparação entre três amostras de nanocápsulas contendo isotretinoína 0,5 mg/mL, obtidas com gotejamento G22.

<b>Formulação 4 NC-ISO</b>	<b>Amostra G22-1 (vermelho)</b>	<b>Amostra G22-2 (verde)</b>	<b>Amostra G22-3 (azul)</b>
<b>Tamanho médio (nm)</b>	201	208	267,1
<b>PDI</b>	0,22	0,23	0,28
<b>Intensidade (%) nm</b>	(91,5%) 205 (8,5%) 3500	(92,6%)232 (7,4%) 2950	(95,63%) 332,4 (4,367%) 4614

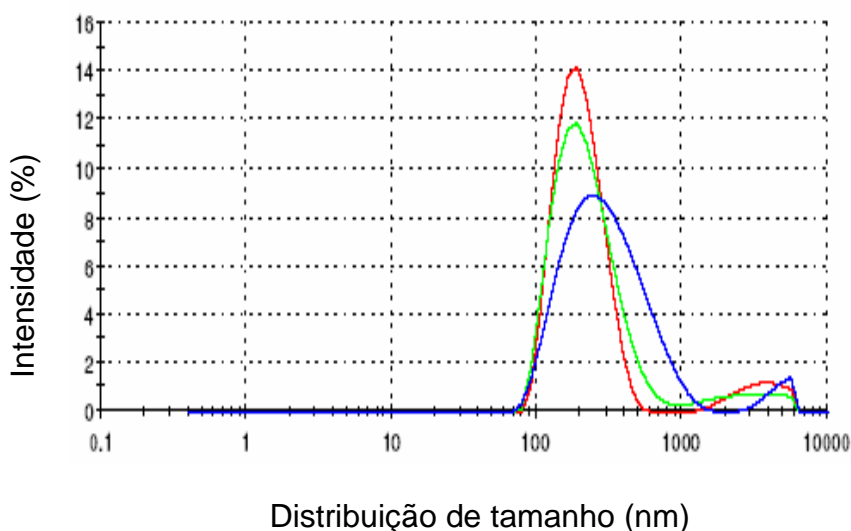


Figura 12: Comparação da distribuição de tamanho entre três amostras de nanocápsulas de isotretinoína 0,5mg/mL, obtidas com gotejamento G22 (Tabela 8).



O perfil de formação de nanopartículas nos sistemas e os PDIs obtidos foram similares entre as 8 amostras reproduzidas através do gotejamento com agulha G23. Este diâmetro do orifício da agulha demonstrou ser pequeno suficiente para influenciar na obtenção de PDIs aproximados a 0,1, não sendo observado formação de populações de micropartículas (Tabela 9 e figura 13). Deste modo foi possível viabilizar, com reprodutibilidade, a preparação de sistemas com tamanhos e PDIs inferiores àqueles obtidos pelo método de deposição de polímero pré-formado publicados anteriormente, como de Santos e colaboradores em 2005 e 2000. Estes autores, embora utilizando diferentes componentes na formulação, bem como as mais variadas proporções entre os mesmos, obtiveram populações de nanocápsulas de PLGA 50:50 com média de tamanho 324nm e 224 nm respectivamente. Cauchetier e colaboradores (2003) obtiveram nanocápsulas com tamanhos médios de 230 nm; já Teixeira e colaboradores em 2005, obtiveram nanocápsulas de tamanhos médios inferiores a 300nm e PDIs de aproximadamente 0,4.

Tabela 9: Comparação entre 8 amostras de nanocápsulas de PLA contendo isotretinoína 0,5mg/mL, obtidas com a mesma formulação 6 e gotejamento G23.

Formulação NC-ISO	6	G23-1 (vermelho)	G23-2 (verde claro)	G23-3 (azul)	G23-4 (preto)	G23-5 (laranja)	G23-6 (rosa)	G23-7 (marrom)	G23-8 (verde escuro)
Diâmetro médio (nm)		173,0	171,0	169,0	165,0	176,0	167,0	157,0	159,0

\*PDI 0,1 para todas as formulações

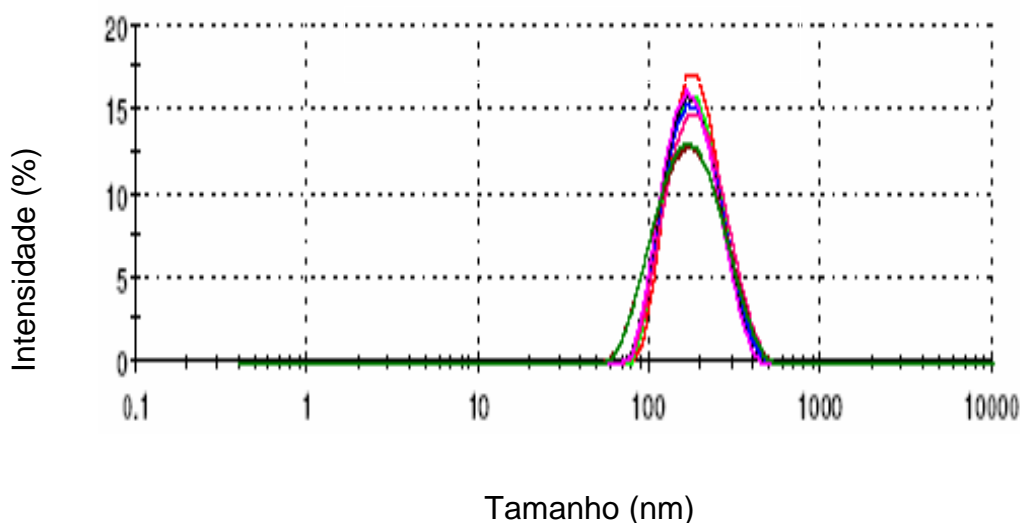


Figura 13: Distribuição de tamanho das 8 amostras de nanocápsulas de isotretinoína 0,5 mg/mL, obtidas com a mesma formulação 6 e gotejamento G23. (Tabela 9).

Durante o método de preparação das nanocápsulas, a etapa de evaporação do solvente orgânico ocorre durante os primeiros minutos logo após colocar no rotaevaporador, houve então a necessidade de regular a pressão inicial nos primeiros 10 minutos de rotaevaporação que foi imprescindível para evitar o aparecimento de bolhas de ar, estas podem formar uma segunda interface e prejudicar na precipitação uniforme do polímero sobre as gotículas oleosas da emulsão.

Na amostra A, os primeiros 10 minutos de rotaevaporação foi tempo suficiente para total evaporação da acetona, a pressão esteve reduzida a -500 atm, com mínima formação de bolhas de ar, após a remoção completa do solvente orgânico a pressão foi padronizada a -600atm durante a evaporação da água, não aparecendo mais bolhas de ar até o final do processo. Para a amostra B, a pressão negativa iniciou a -600 atm, sendo observado uma grande formação de bolhas de ar durante a evaporação da acetona (Tabela 10).

Tabela 10: Comparação entre o tamanho médio das gotículas formadas com gotejamento G23 na emulsão e das partículas obtidas na dispersão após remoção de solvente com diferentes pressões iniciais de rotaevaporação (nos primeiros 10 minutos) para duas amostras A e B, de mesma formulação (NC ISO 6), fabricadas em dias diferentes (Figuras 14 e 15).

	<i>Gotículas da emulsão (vermelho)</i>		<i>Nanopartículas da dispersão (verde)</i>	
	A	B	A	B
<i>Fórmula 6 (NC-ISO G23)</i>			(-500atm)	(-600atm)
Tamanho médio (nm)	172,4	174	173,2	195
PDI	0,12	0,16	0,14	0,25
Intensidade (%) nm	100%	100%	100%	97% 254
	197,6	214	206	3% 4510

As figuras 14 e 15 mostram gráficos comparativos da distribuição de tamanho entre as amostras descritas acima em dois momentos: ainda no estágio de emulsão, (após gotejamento) e após a formação das nanocápsulas com a rotaevaporação do solvente.

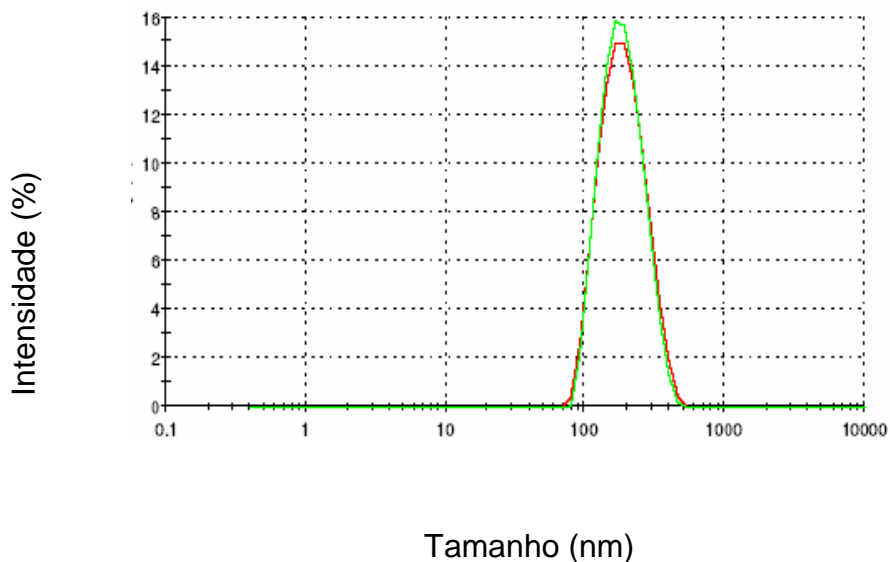


Figura 14: Distribuição de tamanho da amostra (A) na fase de emulsão (vermelho) e dispersão de nanocápsulas (verde).

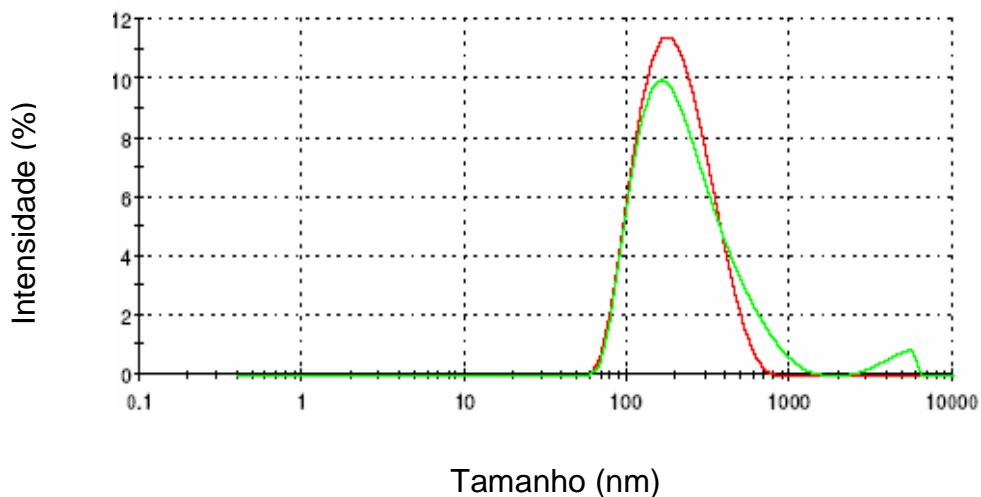


Figura 15: Distribuição de tamanho da amostra (B) na fase de emulsão (vermelho) e dispersão de nanocápsulas (verde).

Teixeira e colaboradores (2005) observaram tamanhos similares para a nanoemulsão correspondente à dispersão de nanocápsulas. Jalil e Nixon (1990) observaram que, ao preparar nanopartículas, durante o processo de evaporação do solvente ocorre um decréscimo gradual no volume e conseqüentemente um acréscimo na viscosidade da emulsão que afeta o equilíbrio do tamanho das gotículas. Este processo pode resultar em coalescência e aglomeração das gotículas oleosas, o que pode ser resolvido com a adição de tensoativo hidrofílico na fase aquosa contínua, o qual fornece uma fina camada protetora em volta das gotículas, reduz a coalescência e estabiliza a emulsão. Conforme os resultados mostrados nas Figuras 14 e 15 e Tabela 10, o aparecimento de populações de micropartículas não dependeu somente destes fatores, pois a amostra parece ter sofrido a interferência da grande quantidade de bolhas de ar formadas durante o processo de evaporação da acetona. Padronizar a pressão a -500atm durante o tempo inicial (nos primeiros 10 minutos) de evaporação do solvente orgânico (acetona), foi fundamental para uma precipitação rápida e uniforme do polímero sobre as gotículas, a turbulência causada pelo aparecimento de bolhas de ar durante este período inicial de rotaevaporação pode ter contribuído para aglomerar as nanogotículas formando micropopulações além de causar uma precipitação defeituosa do polímero sobre elas.

A alteração da agulha G22 para G23 demonstrou ser fundamental para diminuir a média de tamanho das gotículas na emulsão e conseqüentemente das nanopartículas formadas após a evaporação. Menores gotículas na emulsão parecem ter prevenido a formação das micropartículas na dispersão, desde que seja promovida uma evaporação inicial rápida do solvente com mínima formação de bolhas de ar.

A formulação 6, preparada com agulha G23 na fase da emulsão, foi então escolhida como formulação padrão para seguir os estudos de estabilidade a longo prazo depois de obtidos os melhores resultados de comparação entre as médias de tamanho das partículas e respectivo PDI. Além de otimizar as concentrações dos componentes da formulação, o método de preparação também foi padronizado observando-se assim que a uniformidade de gotejamento e tamanho das gotículas da emulsão foi fundamental para obtenção de lotes semelhantes com tamanhos médios menores que 200nm e PDIs de 0,1. Estes resultados indicaram boa reprodutibilidade entre as oito amostras obtidas em dias diferentes conforme demonstrado na Tabela 9 e Figura 13.

***4.4.1. AVALIAÇÃO DO TAMANHO MÉDIO E PDI DAS POPULAÇÕES OBTIDAS NO PRECIPITADO E SOBRENADANTE DAS DISPERSÕES APÓS CENTRIFUGAÇÃO E NAS DISPERSÕES DE NANOCÁPSULAS COM FORMULAÇÃO 4 E 6, PREPARADAS COM GOTEJAMENTO G22 E G23 RESPECTIVAMENTE.***

O sobrenadante coletado após a centrifugação da amostra obtida com a fórmula 4 demonstrou que a maioria das nanopartículas que permaneceram estáveis na dispersão, ou seja, não precipitaram, possuem tamanhos médios menores que 230 nm, ver figura 16. Já o precipitado ressuspensão possuiu na sua maioria, partículas com média de tamanho superior a 400nm(>90%), ver tabela 11. Cerca de 90% de nanopartículas que precipitaram poderão ser nanoesferas, conforme Teixeira e colaboradores (2005), onde estudos futuros poderão comprovar esta teoria através da microscopia eletrônica de transmissão, já as micropartículas com tamanhos superiores a 4µm detectadas na dispersão antes de centrifugar e no seu respectivo precipitado ressuspensão após centrifugar, são microcápsulas facilmente visíveis através de fotomicrografias ópticas (ver item 4.5) formadas após o processo de rotaevaporação (tabela 11 e figura 16).

Estes resultados demonstram que além das micropartículas, a maioria das nanopartículas (provavelmente nanoesferas) com tamanhos aproximados e superiores a 400nm também precipitam após o teste de centrifuga, ver figuras 16 e 17.

Tabela 11: Tamanho médio das partículas e PDI antes e após centrifugação (sobrenadante e precipitado) a 2500rpm/h.

		<i>Fórmula 4 (G22) - Figura 11</i>			<i>Fórmula 6 (G23) - Figura 12</i>		
		Dispersão antes da centrifuga (vermelho)	Sobrenadante Pós centrifuga (verde)	Precipitado Pós centrifuga (azul)	Dispersão antes da centrifuga (verde)	Sobrenadante Pós centrifuga (azul)	Precipitado Pós centrifuga (vermelho)
Diâmetro médio (nm)		267,1	217,7	372,5	159	141	190
PDI		0,28	0,23	0,34	0,16	0,09	0,15
Intensidade de espalhamento (nm) e distribuição (%) das populações	População 1	332,4 (95,6%)	230,5 (100%)	463,4 (90,11%)	183 (100%)	158 (100%)	208 (100%)
	População 2	4614 (4,4%)	-----	112,7 (6,76%)	-----	-----	-----
	População 3	-----	-----	5057 (3,12%)	-----	-----	-----

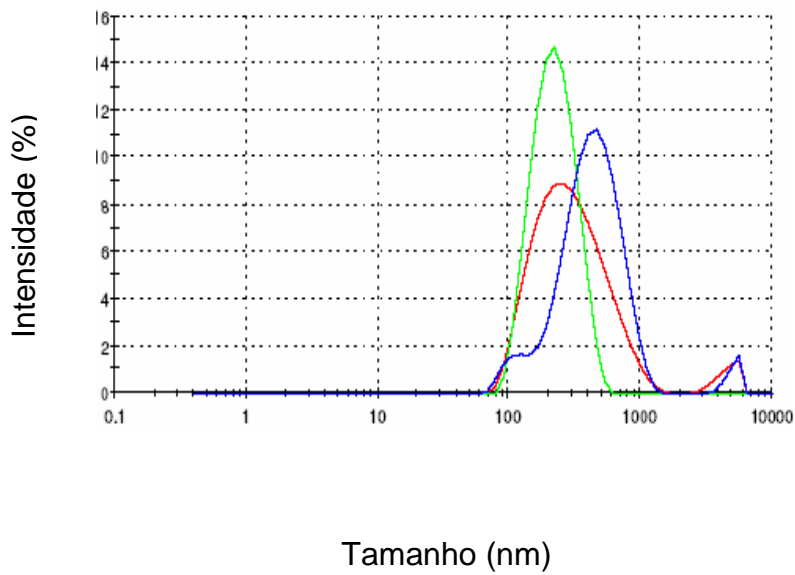


Figura 16: Distribuição de tamanho antes e após centrifugação, dispersão (vermelho), sobrenadante (verde) e precipitado ressuspenso (azul), da formulação 4 (G22).

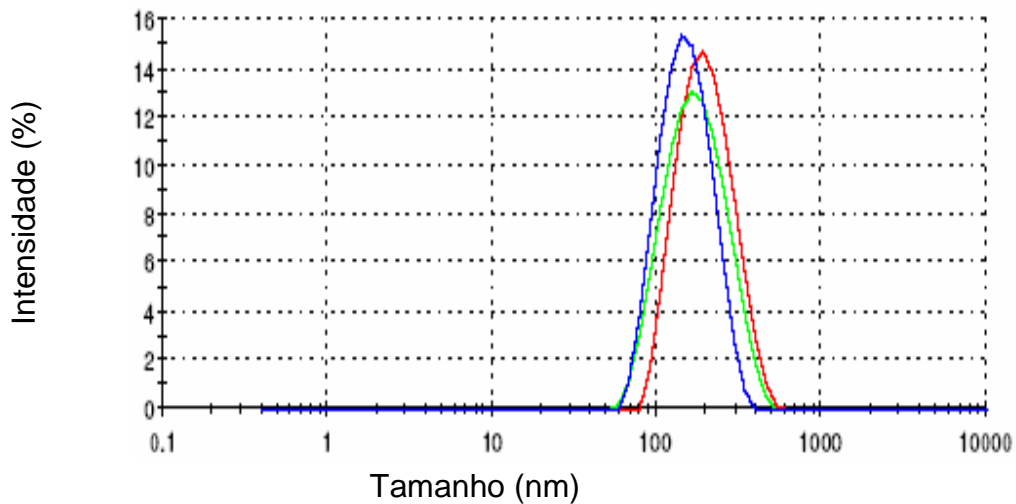


Figura17: Distribuição de tamanho antes e após centrifugação, dispersão (verde), sobrenadante (azul) e precipitado ressuspenso (vermelho), da formulação 6 (G23).

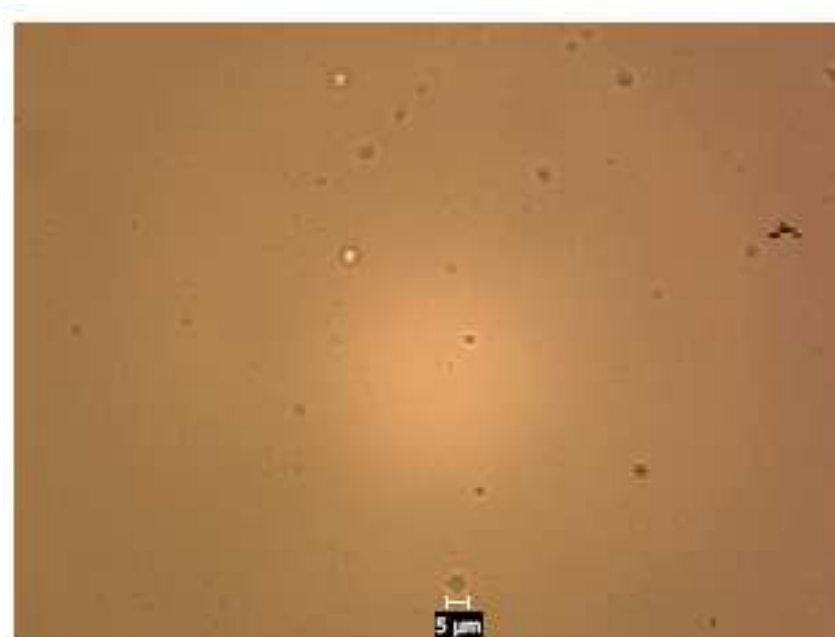


Figura 18: Fotomicrografia do precipitado ressuspenso da amostra NC-ISO 6.

Após o teste de centrífuga feito com a dispersão NC-ISO 6, nenhum óleo livre foi detectado, mas foi observada a presença de um pequeno precipitado, que ocupa menos que 1% do volume total da dispersão. Foram detectadas raras micropartículas na fotomicrografia óptica do precipitado ressuspenso, o que permite dizer que este precipitado pode ser formado por nanopartículas, sejam nanoesferas e/ou nanocápsulas aglomeradas que permaneceram com tamanho médio superior a 200nm após ressuspensão, conforme demonstrado pela Figura 17 e 18.

O sobrenadante coletado após a centrifugação da amostra obtida com a formulação 6 demonstrou que a maioria das populações de nanocápsulas com tamanhos inferiores a 300nm permaneceram estáveis na dispersão, ou seja, não precipitaram. Já no precipitado ressuspenso apareceram populações de nanopartículas com tamanhos aproximados a 400nm também detectadas na dispersão antes de centrifugar (Figura 17).

Teixeira *et al*, em 2005, também obtiveram nas suas dispersões de nanocápsulas um pequeno pellet formado no fundo do tubo após teste da centrífuga, o qual foi atribuído à formação de nanoesferas devido a uma inadequada deposição do polímero sobre a interface das gotículas oleosas da emulsão no meio aquoso. Como nenhum óleo livre foi detectado nas formulações analisadas, acredita-se que o óleo foi completamente coberto pelo polímero.



## **4.5 ASPECTO MICROSCÓPICO DAS DISPERSÕES DE NANOCÁPSULAS CONTENDO ISOTRETINOÍNA**

Nas seguintes fotomicrografias, figuras 19 a 23, foram apresentadas diferentes dispersões obtidas através da variação da forma de gotejamento bem como da concentração de isotretinoína na formulação.

A Figura 19 demonstra a presença de cristal amarelo de isotretinoína e várias microcápsulas na dispersão obtida através de gotejamento manual com a concentração teórica de 1 mg/mL de isotretinoína. Na Figura 20, também obtida por gotejamento manual com a concentração teórica de isotretinoína de 0,5 mg /mL foi possível observar a presença de microcápsulas de tamanhos variados assim como na Figura 19, entretanto, mas não se observou presença de cristais de isotretinoína sugerindo que esta foi totalmente encapsulada.

O perfil microscópico da dispersão de nanocápsulas com PGLA 50:50, obtida pelo gotejamento sem agulha, representada pela Figura 20, foi semelhante ao da dispersão de nanocápsulas contendo PLA obtida pelo gotejamento com agulha G22, representada pela Figura 21, ambas contém 0,5mg/mL de isotretinoína e apresentaram inúmeras partículas micrométricas e ausência de cristais de isotretinoína. A figura 22 demonstra a dispersão de nanocápsulas obtidas através de gotejamento em agulha G23, apresentando cristais de isotretinoína sugerindo que a concentração teórica de 0,7 mg/mL excedeu a capacidade máxima de encapsulação. Entretanto, na Figura 23 a dispersão de nanocápsulas com concentração teórica de isotretinoína de 0,5 mg/mL e gotejamento em agulha G23, apresentou raras microcápsulas e ausência de cristais, demonstrando maior homogeneidade entre as populações e completa encapsulação.

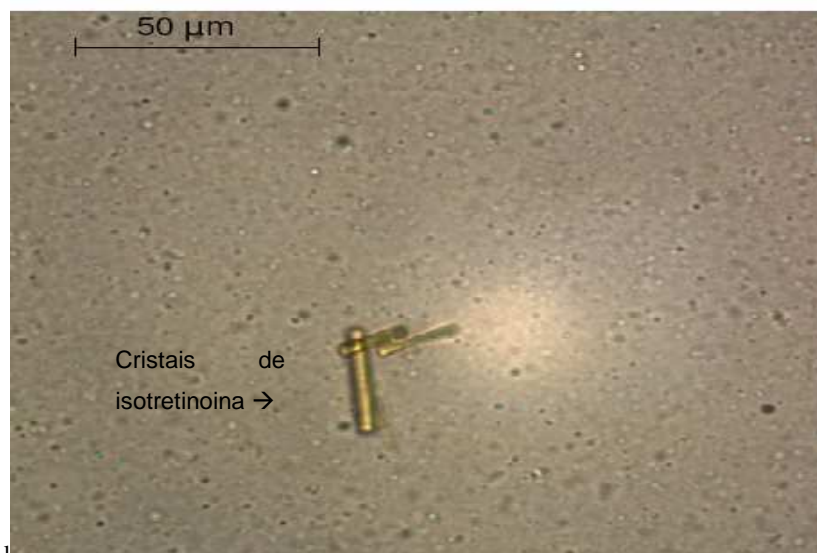


Figura 19: Fotomicrografia da amostra NC-ISO 1 (1,0mg/mL de isotretinoína) com PLGA 50:50, obtida por gotejamento sem agulha, exibindo cristais de isotretinoína.

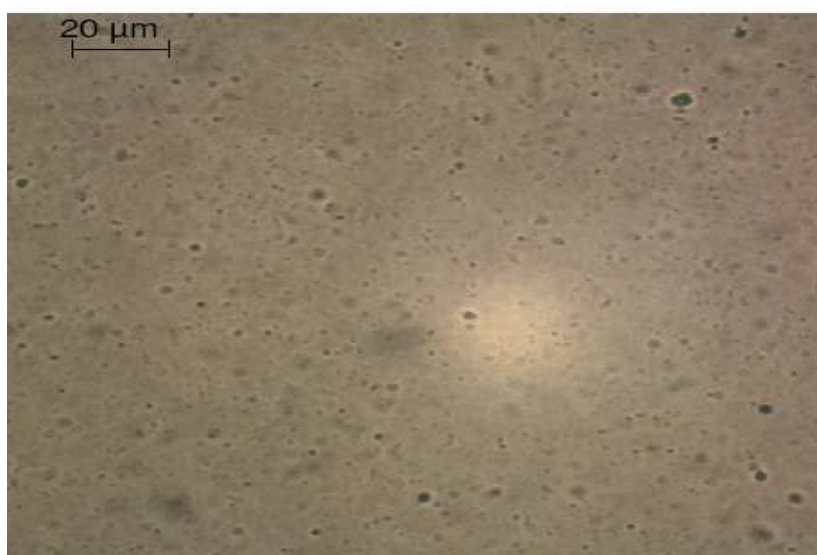


Figura 20: Fotomicrografia da amostra NC-ISO 2 (0,5mg/mL de isotretinoína) com PLGA 50:50, obtida por gotejamento sem agulha, exibindo inúmeras partículas micrométricas.

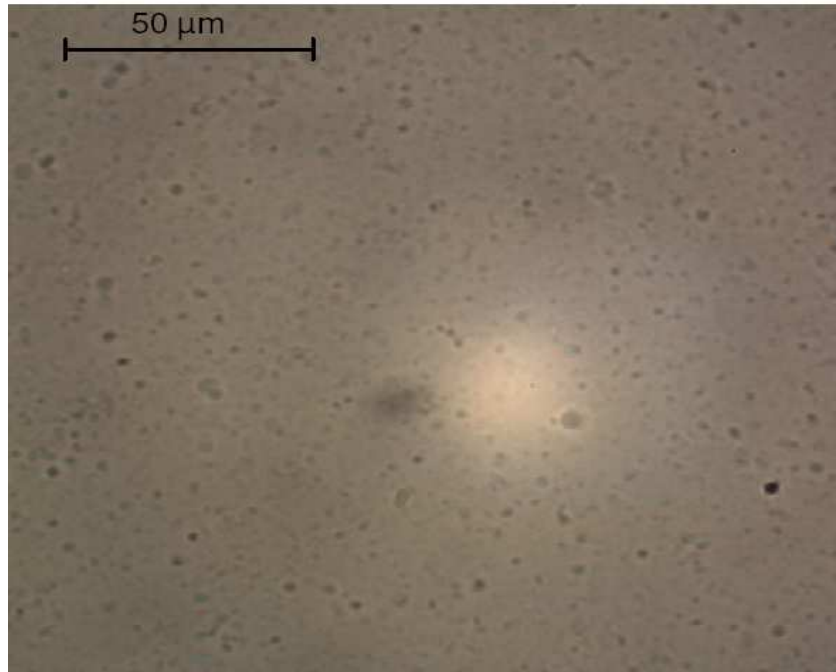


Figura 21: NC ISO 4 (0,5mg/mL de isotretinoína) com D,L-PLA e Gotejamento G22, exibindo inúmeras partículas micrométricas.

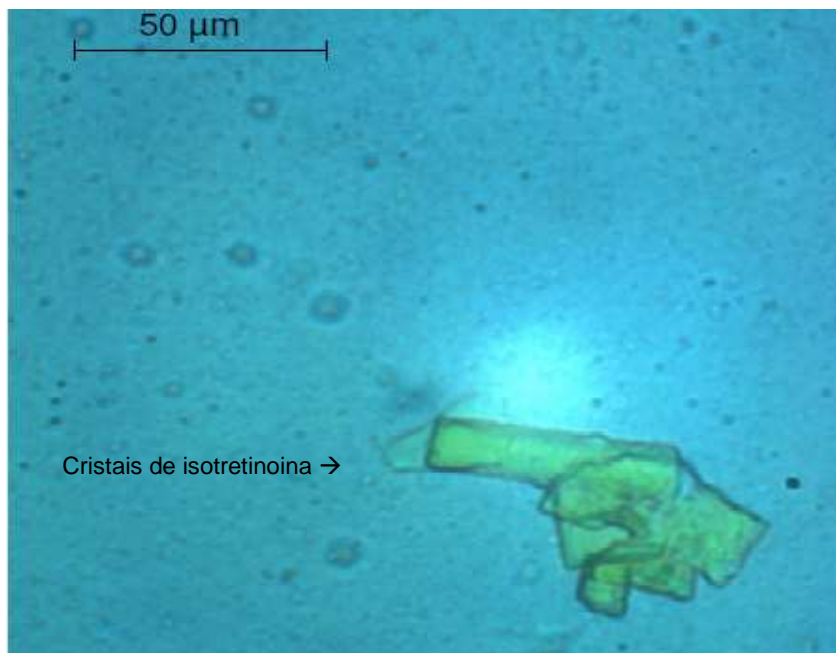


Figura 22: Fotomicrografia da amostra NC-ISO 8 (0,7mg/mL de isotretinoína) obtida com D,L-PLA por gotejamento G23, exibindo cristais de isotretinoína.

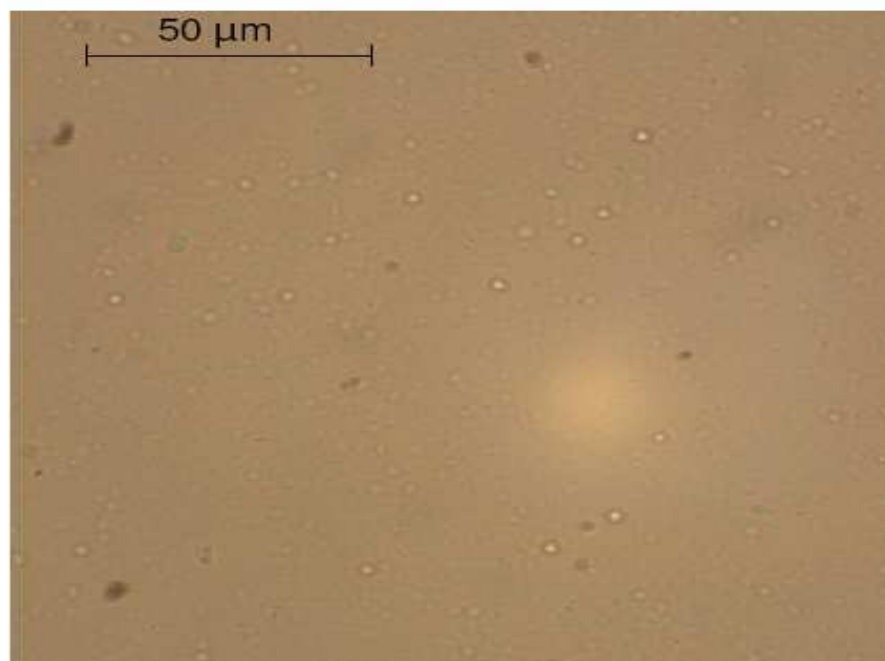


Figura 23: Fotomicrografia da amostra NC-ISO 6, obtida com D,L-PLA (0,5mg/mL) e por gotejamento G23, exibindo raras partículas micrométricas e ausência de cristais de isotretinoína..

#### **4.6 ESTABILIDADE EM LONGO PRAZO DA DISPERSÃO DE NC-ISO, FÓRMULA 6**

Até 4 meses após a preparação da formulação 6 não foi observado nenhum sedimento, cristais de isotretinoína, óleo livre ou cremagem. As características organolépticas e a microscopia óptica da dispersão se mantiveram estáveis desde a fabricação até 120 dias, não ocorrendo notáveis variações de pH, do tamanho médio e PDI. Após 5 meses, a microscopia óptica revelou poucas populações aglomeradas, as quais foram detectadas pelo ensaio de espalhamento de luz, levando ao aparecimento de micropopulações e aumento do PDI. Pode ser possível também relacionar os valores de queda do pH da dispersão ao início de hidrólise polimérica com pequena liberação de fármaco, apesar que esta redução no pH após 120 dias pode ser considerada pouco significativa para justificar a hidrólise do PLA. Em 150 dias houve o aparecimento de micropartículas com aumento do PDI para 0,2 sugestivos de formação de resíduos devido à erosão das nanocápsulas ou aglomerados de microcápsulas

indicativos de início de instabilidade da dispersão que coincidiu com mesmo tempo da queda do pH da dispersão de 7,35 para 6,94 (Tabela 12 e Figuras 24 e 25).

Tabela 12: Avaliação da estabilidade em longo prazo da dispersão de nanocápsulas NC-ISO 6 (armazenada a +4°C) e demonstração da degradação de isotretinoína encapsulada durante o seu armazenamento através da queda de sua absorbância máxima ao longo do tempo ( $\lambda=336\text{nm}$ ).

Tempo (dias)	Características macroscópicas	Características microscópicas	pH	Tamanho médio de partícula (nm)	PDI	ABS máx. isotretinoína encapsulada não degradada $\lambda=336\text{nm}$	Doseamento (% isotretinoína encapsulada não degradada) *
0	Líquido amarelo claro, leitoso fluorescente e sem resíduos	Raras microcápsulas	7,35	166,9	0,1	0,927	99,2
15	Estável	Raras microcápsulas	7,35	167	0,1	0,923	98,76
30	Estável	Raras microcápsulas	7,35	169	0,1	0,912	97,35
45	Estável	Raras microcápsulas	7,35	166	0,1	0,894	95,05
60	Estável	Raras microcápsulas	7,35	172	0,1	0,696	69,68
90	Estável	Raras microcápsulas	7,35	163	0,1	0,655	64,42
120	Estável	Raras microcápsulas	7,29	167	0,1	0,632	61,47
150	Estável	Presença de poucas microcápsulas aglomeradas e poucos resíduos de polímero	6,94	182	0,21	0,508	45,59

\*Cálculos efetuados através da equação da reta obtida pela curva de calibração, ver itens 3.2.5 e 4.7 sobre eficiência de encapsulação.

\*\*Volume total das frações de isotretinoína encapsulada = 9mL (coletado após fabricação da NC ISO-6 por cromatografia de exclusão de tamanho).

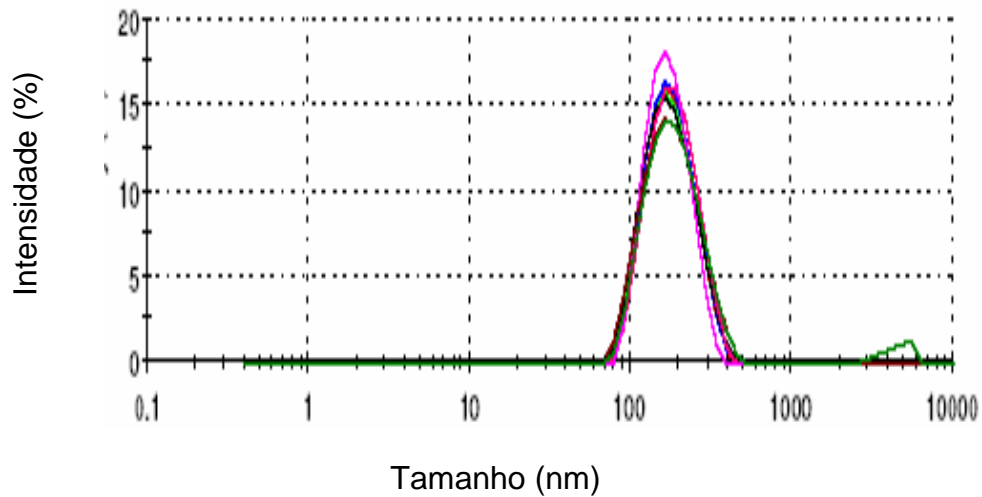


Figura 24: Distribuição de tamanho da dispersão NC-ISO 6 durante o armazenamento em geladeira ( $4^{\circ}\text{C} \pm 1,0$ ), após a fabricação (vermelho), 15 dias (verde claro), 30 dias (azul), 45 dias (preto), 60 dias (rosa escuro), 90 dias (rosa claro), 120 dias (marrom) e 150 dias (verde escuro).

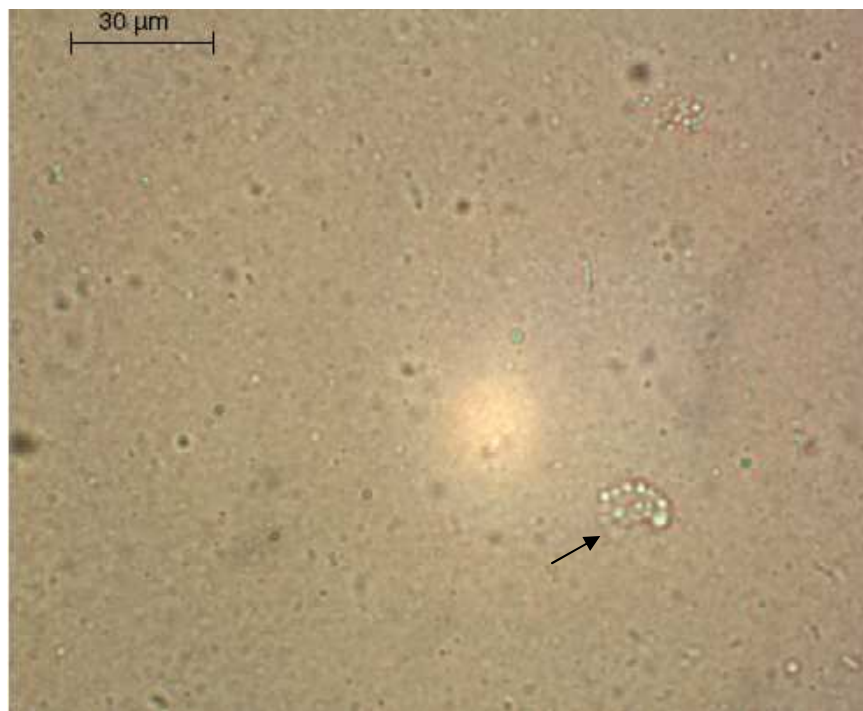


Figura 25: Fotomicrografia da amostra NC-ISO 6 após 150 dias de fabricação com presença de aglomerados.

A absorvância máxima da isotretinoína em 336nm teve queda marcante após 60 dias, demonstrando que o fármaco encapsulado degradou parcialmente após este tempo de armazenamento sem ser liberado para o meio. A absorvância da isotretinoína no comprimento de onda de 336nm declinou de 0,9 para 0,6 após 60 dias da fabricação e permanecendo similar até 120 dias. Isto sugere uma possível adsorção de isotretinoína na superfície polimérica das nanocápsulas, ficando em contato com o meio externo aquoso da dispersão, acelerando sua degradação durante o armazenamento da dispersão de nanocápsulas em geladeira ( $4^{\circ}\text{C} \pm 1,0$ ), mesmo na ausência da luz (Tabela 12).

#### **4.7 EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO**

A melhor eficiência de encapsulação (99,2%) foi obtida com a concentração inicial de 0,5mg/mL de isotretinoína para a formulação 6 que contém 150mg de PLA / 150mg de poloxamer 188 / 150mg fosfatidilcolina / 100mg de óleo de soja.

A formulação 9 foi preparada com redução de 10% na concentração inicial de polímero com o intuito de diminuir o pequeno precipitado que surge na dispersão após a centrifuga, o qual pode ser considerado como nanoesferas formadas por um pequeno excesso de polímero. Nesta formulação foi observada queda na eficiência de encapsulação de 99% para 87%. Isto sugere que a concentração inicial de 150mg do polímero foi imprescindível para uma completa encapsulação, ao contrário da formulação 9 obtida com 135mg de polímero, onde provavelmente tensoativos, fármaco livre e óleo, ficaram em excesso e puderam ser detectados macroscopicamente aderidos ao balão de vidro após a rotaevaporação, com formação de um halo de resíduos de difícil remoção com água e fácil remoção com acetona, a queda na eficiência de encapsulação desta dispersão NC ISO 9 demonstrou que houve perda de isotretinoína durante o processo de fabricação.

Com a obtenção de resultados satisfatórios na eficiência de encapsulação da formulação 6 não houve necessidade de fazer mais alterações na formulação, como diminuir as concentrações dos tensoativos, óleo e fármaco.

As concentrações iniciais de 0,6mg/mL e 0,7mg/mL de isotretinoína das formulações 7 e 8 originaram fármaco livre em excesso, diminuindo a porcentagem de eficiência máxima de encapsulação. A formulação 6 apresentou bons resultados nos

ensaios de estabilidade acelerada bem como maior eficiência de encapsulação, sendo assim considerada a formulação mais adequada para seguir nos testes de estabilidade a longo prazo na tentativa de obter um produto aceitável.

Tabela 13: Comparação entre os resultados de Eficiência de Encapsulação (EE) das amostras obtidas com as formulações 6, 7, 8 e 9 (NC-ISO) com separação das frações de Fármaco Encapsulado (FE) e quantificação da isotretinoína em  $\lambda = 336\text{nm}$ .

<i>Amostra Concentração inicial isotretinoína (mg) : D, L- PLA (mg)</i>	<i>Volume total das frações de fármaco encapsulado - FE (mL)*</i>	<i>ABS máxima da isotretinoína <math>\lambda = 336\text{nm}</math></i>	<i>Quantidade de fármaco encapsulado – FE (mg)*</i>	<i>Eficiência de Encapsulação (%)</i>
NC ISO 6/1 5 :150	9,0	0,927	4,96	99,2
NC ISO 6/2 5 :150	6,6	1,2092	4,966	99,3
NC ISO 7/1 6 :150	7,2	1,099	4,39	73
NC ISO 7/2 6 :150	9,3	0,8528	4,64	77
NC ISO 8 7 :150	7,1	1,1639	5,11	73
NC ISO 9 5 :135	8,0	0,9158	4,35	87

\* Os volumes totais das frações de fármaco encapsulado (FE) foram coletados através da cromatografia de exclusão de tamanho, as NC ISO 6 e NC ISO 7 foram feitas em duplicatas para confirmar os resultados;

\*\*Os cálculos foram efetuados através da equação da reta obtida pela curva de calibração utilizando os dados descritos na tabela da ABS máxima da isotretinoína e volume total das frações de FE, ver item 4.7.1;



#### 4.7.1 SEPARAÇÃO DAS FRAÇÕES DE FÁRMACO LIVRE E ENCAPSULADO PARA CÁLCULO DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO:



Figura 26: Separação das frações de nanocápsulas contendo fármaco encapsulado e fármaco livre através da coluna de vidro com Sephadex G50®.

Pela reunião das frações eluídas contendo as nanocápsulas para quantificação por espectrofotometria, a eficiência de encapsulação foi assim calculada:

Equação da reta da curva analítica:  $ABS = 112,38035 \times Conc. + 0,15221$

Exemplo: NC ISO 6/2 (tabela 13)

$$Conc = \frac{1,2092 - 0,15221}{112,38035} = 0,0094 \text{ mg/mL}$$

$0,0094 \times 4 \text{ mL} = 0,0376 \text{ mg/mL}$ , onde 4 mL é a diluição total utilizada com álcool etílico para precipitar o polímero e liberar o fármaco para quantificá-lo.

$0,0376 \times 6,6 \text{ mL} = 0,2483 \text{ mg/mL}$ , onde 6,6 mL é o volume total da fração encapsulada diluída em tampão fosfato pH 7,4 (0,5 mL de dispersão concentrada de nanocápsulas) obtido através da cromatografia de exclusão de tamanho.

$$x = \frac{0,2483 \text{ mg} \times 10 \text{ mL}}{0,5 \text{ mL}}$$

Onde 10mL é o volume final da dispersão concentrada de nanocápsulas e 0,5mL é a quantidade de dispersão concentrada de nanocápsulas introduzida na cromatografia de exclusão de tamanho.

$$x = 4,96 \text{ mg}/10\text{mL} \text{ ou } 0,49 \text{ mg}/\text{mL}$$

Se a concentração inicial de isotretinoína na formulação 6/2 foi de 5mg para 10mL de dispersão e foi quantificado 4,96mg de isotretinoína encapsulada, esta dispersão de nanocápsulas obteve 99,3% de eficiência máxima de encapsulação.

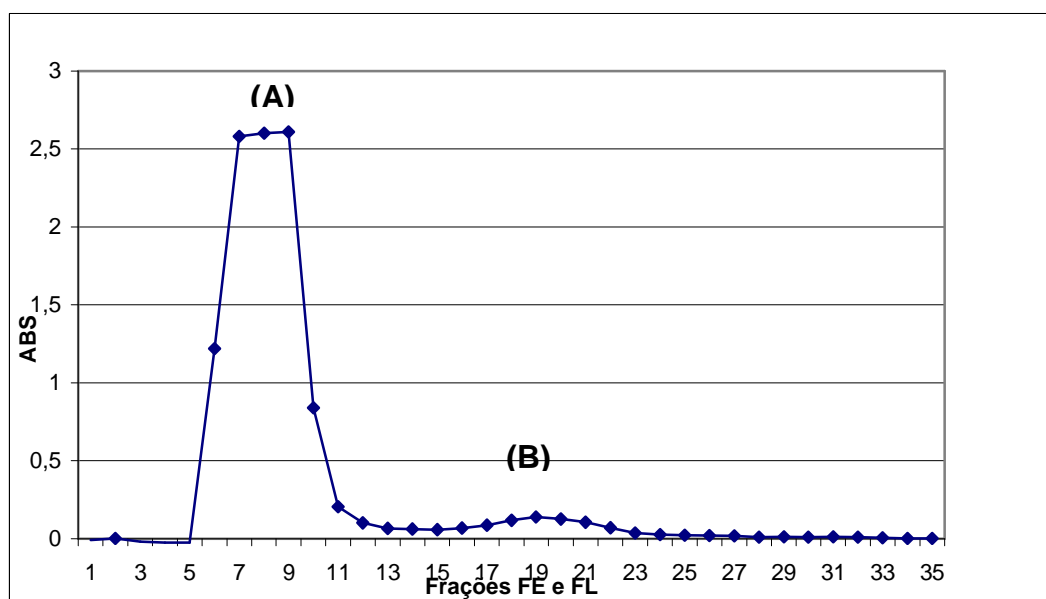


Figura 27: Perfil de eluição das frações de fármaco encapsulado (A) e fármaco livre (B) a partir de alíquota da amostra NC-ISO 6/2.

A alta eficiência de encapsulação se deve a isotretinoína ser pobremente solúvel em água e ter a tendência de migrar para o núcleo oleoso em razão de seu caráter lipofílico. Tal como no trabalho de Santos *et al* (2005), a alta eficiência de encapsulação do fármaco lipofílico utilizado dentro das nanocápsulas de PLGA, foi fortemente dependente da solubilidade do fármaco na fase oleosa. Ainda conforme Teixeira *et al* (2005), a porcentagem do fármaco encapsulado nas nanocápsulas está relacionada à sua solubilidade no núcleo oleoso. Isto explica a alta eficiência de encapsulação obtida com a isotretinoína, devido ao seu caráter majoritariamente apolar. Cauchetier e colaboradores 2003, utilizando três polímeros diferentes (PLGA, PCL e D,L -PLA)

demonstraram uma encapsulação de quase 100% para fármaco atovaquone, altamente lipofílico.

#### 4.8 CINÉTICA DE LIBERAÇÃO *IN VITRO* DA FORMULAÇÃO 6 DE NANOCÁPSULAS DE PLA CONTENDO ISOTRETINOÍNA.

A Tabela 14 exhibe os dados de liberação da isotretinoína a partir das nanocápsulas (Formulação 6) durante as 24 horas do ensaio de liberação.

Tabela 14: Concentração de isotretinoína liberada (amostra NC-ISO 6) quantificada por espectrofotometria no UV em 336nm ao longo do tempo (0-24horas) – ensaio realizado em triplicata.

Tempo (horas)	média Conc. (mg)	DP	% teor	% Perda
0	0,0064499	0,00061	100%	0%
0,25	0,0053923	0,00048	83%	17%
0,5	0,0051919	0,00013	80%	20%
1	0,0050435	0,00066	78%	22%
2	0,0049803	0,00015	77%	23%
3	0,0037819	0,00167	58%	42%
4	0,0037096	0,00027	57%	43%
5	0,0036144	Nd*	56%	44%
6	0,0032976	0,00017	51%	49%
7	0,0033252	0,00002	51%	49%
8	0,0028634	0,00189	44%	56%
12	0,0010392	Nd*	16%	84%
15	0,0006179	0,00008	10%	90%
18	0,0001565	0,00033	2%	98%
24	0,0005442	0,00063	-8%	100%

\* Desvio Padrão não determinado

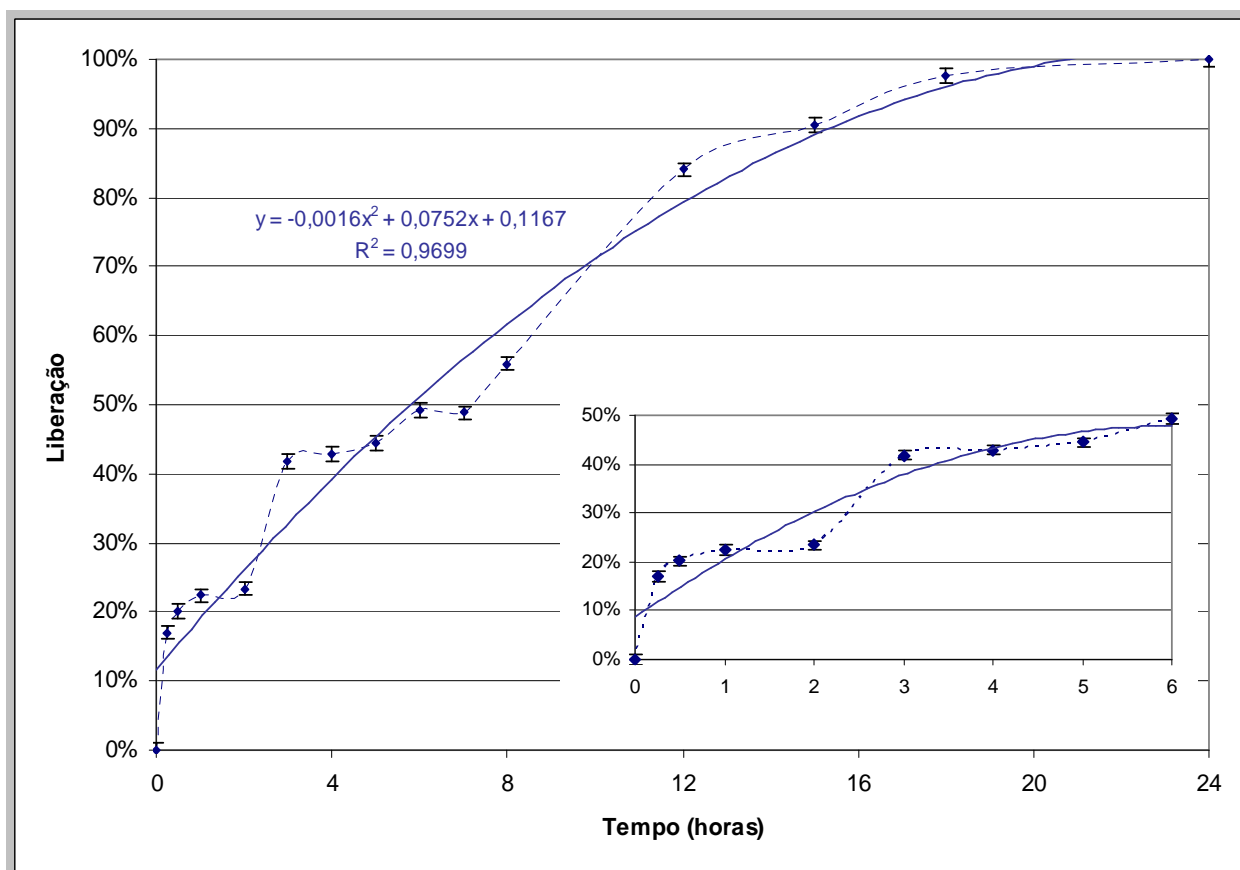


Figura 3: Cinética de liberação (%) in vitro da isotretinoína encapsulada em nanocápsulas de PLA fórmula 6, ao longo do tempo (0 - 24horas).

Um efeito “burst” inicial na primeira hora do processo liberou pouco mais de 20% da isotretinoína das nanocápsulas de D,L-PLA, o que reforça a possibilidade de certa quantidade de isotretinoína estar adsorvida na superfície da camada polimérica das nanocápsulas. Segundo N.P. Santos e colaboradores, este efeito “burst” também ocorreu na primeira hora com liberação de 15% de ácido úsnico das nanocápsulas de PLGA, também atribuindo esta liberação imediata a uma possível adsorção do fármaco à superfície polimérica das nanocápsulas,

De forma gradativa e lenta, ocorreu liberação de 50% de isotretinoína nas primeiras 6 horas, 84% em 12 horas, finalizando 100% de fármaco liberado em 24 horas de ensaio a 37°C. No trabalho de N.P. Santos e colaboradores (2005), a liberação de ácido úsnico das nanocápsulas de PLGA chegou a 78% da concentração inicial de fármaco dentro de 48 horas. A autora atribuiu este perfil a vários fatores que têm efeito sobre a liberação de fármacos encapsulados nos sistemas nanocarreadores, como tamanho da partícula e solubilidade ou afinidade do fármaco pela fase oleosa e pelo polímero e sua incorporação. Estes são parâmetros comuns que governam o perfil

de cinética de liberação dos fármacos, o que pode explicar porque as nanocápsulas de D,L-PLA contendo isotretinoína liberaram em 24 horas todo o fármaco, pois com menor tamanho médio da partícula (sub 200 nm) e maior a uniformidade entre as populações formadas (PDI 0,1) foi possível proporcionar liberação mais rápida e gradativa (uniforme).

Ammoury N. e Fessi H. (1990), conseguiram liberar 85% de indometacina em 2 horas das nanocápsulas de D,L-PLA. A literatura possui relatos controversos que são fortemente dependentes dos tipos e componentes utilizados no sistema e das condições experimentais

#### **4.9 ENSAIO DE FOTODEGRADAÇÃO DA ISOTRETINOÍNA LIVRE E ENCAPSULADA (NC-ISO 6) SOB EXPOSIÇÃO À RADIAÇÃO UVA DE 365NM A 25°C**

O ensaio de fotodegradação foi realizado com o objetivo de comparar o teor (%) de isotretinoína livre com isotretinoína encapsulada ao longo de 08 horas de exposição à radiação UVA para conferir se o filme polimérico que reveste a nanocápsula fornece alguma proteção ao ativo fotossensível.

Nos primeiros 2 a 5 minutos após a exposição das nanocápsulas 20 a 35% de isotretinoína foi degradada respectivamente, o que reforça a teoria de uma determinada quantidade de fármaco dentro dessa faixa de concentração possa estar aderida na superfície das nanocápsulas e teve contato direto com a luz sem proteção do filme polimérico, enquanto que a concentração de isotretinoína livre decaiu drasticamente neste tempo inicial de exposição de 94% para 30%.

Após 10 minutos de exposição à luz, cerca de 50% da isotretinoína encapsulada permaneceu íntegra, enquanto que no mesmo período de tempo a concentração de isotretinoína livre caiu aproximadamente 30%.

A partir dos 240 minutos de exposição, o nível de degradação para as duas amostras com isotretinoína se torna similar apresentando uma concentração de 16 a 18% de isotretinoína e decaindo gradativamente com concentrações similares até os 480 minutos finais do ensaio restando apenas 7 a 8% de isotretinoína presente nas nanocápsulas e isotretinoína livre.

Tabela 15: Perfil de fotodegradação através das concentrações de isotretinoína encapsulada e livre durante a exposição a luz UVA – 365nm, ao longo do tempo 0 - 8 horas.

TEMPO	% NANO ISO PLA	DP	% ISO LIVRE	DP
0	92,87	0,0007	94,7	0,02192
2	80,06243032	0,0524	37,40776	0,014491
5	65,25752508	0,0198	30,51011	0,003559
10	52,91638796	0,0052	28,24832	0,007932
15	47,10813824	0,0058	27,735	0,005715
30	42,63545151	0,0120	27,57459	0,004243
45	36,41471572	0,0078	25,56946	0,004349
60	34,64882943	0,0057	25,36092	0,012897
120	28,45039019	0,0047	21,55919	0,005737
180	22,65328874	0,0114	18,86429	0,001414
240	18,44370123	0,0115	16,50626	0,00781
300	13,18171683	0,0465	13,93167	0,00263
360	11,4916388	0,0081	12,27141	0,005033
420	8,963210702	0,0116	10,49086	0,001155
480	7,076923077	0,0037	8,87873	0,007

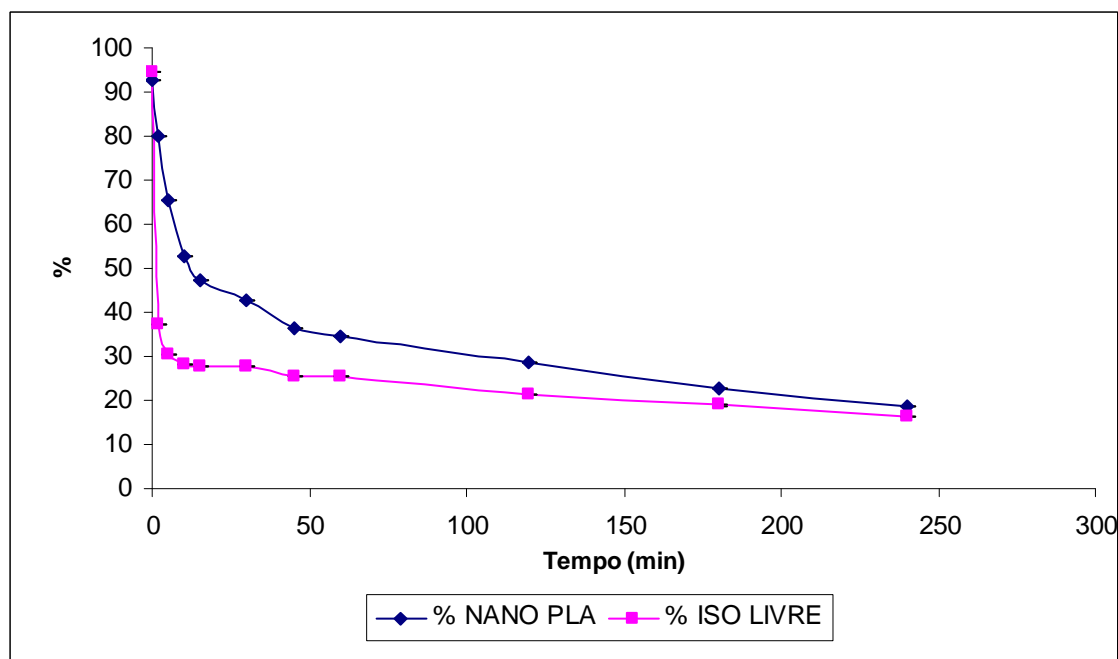


Figura 29: Comparação entre a cinética de fotodegradação da isotretinoína encapsulada (azul) e livre (rosa) sob exposição à luz UVA ao longo de 0 a 8 horas.

## 5.0 CONCLUSÕES

- Dentre as diversas preparações, a formulação que resultou nas melhores características foi a NC-ISO 6, contendo 5 mg de isotretinoína / 150 mg D,L-PLA / 150 mg PC / 100 mg Óleo de soja / 150 mg Poloxamer 188, para 10 mL da dispersão obtida através do método de deposição interfacial do polímero;
- A obtenção de populações com tamanhos médios menores que 200nm e PDIs 0,1 foi reprodutível desde que garantido o mesmo tamanho médio para as gotículas da emulsão com gotejamento G23 e mantida a pressão de vácuo durante toda a evaporação do solvente orgânico até -500atm para evitar a formação de bolhas de ar;
- O potencial zeta demonstrou que uma determinada quantidade de isotretinoína fica situada na superfície da membrana polimérica das nanocápsulas de PLGA 50:50 (NC ISO 2) aumentando a carga negativa superficial.
- A dispersão de nanocápsulas de D,L-PLA contendo isotretinoína (0,5mg/mL) – NC ISO 6, armazenada em geladeira se mostrou estável por até 120 dias. Com 150 dias de armazenamento após a fabricação, apareceram populações de micropartículas e o pH diminuiu de 7,35 para 6,94 podendo indicar o começo de uma degradação polimérica e demonstrou também aglomeração de partículas na dispersão, conforme fotomicrografia óptica indicando início de instabilidade da dispersão;
- Após 60 dias de armazenamento da NC ISO 6 em geladeira, sem contato com a luz, a isotretinoína encapsulada degradou cerca de 30%, apesar da dispersão de nanocápsulas permanecer estável, reforçando que esta quantidade de isotretinoína que degradou está adsorvida na membrana polimérica em contato com meio aquoso externo, responsável pela sua degradação;
- A eficiência máxima de encapsulação foi alcançada com 99,2% de isotretinoína encapsulada, com a concentração inicial de 0,5 mg/mL para a formulação NC ISO 6;
- No ensaio de fotodegradação da isotretinoína encapsulada com a fórmula de NC ISO 6, foi demonstrado uma maior proteção dada pela presença do filme polimérico, pois cerca de 50% de isotretinoína foi preservada, em comparação a

isotretinoína livre que caiu para 28% quando exposta diretamente a luz UVA nos primeiros 10 minutos.

- Nos primeiros 2 minutos após a exposição das nanocápsulas apenas 20% de isotretinoína encapsulada foi degradado, o que reforça a possibilidade de que 20 a 30% de isotretinoína estão aderidos à membrana polimérica em contato com o meio externo e tiveram contato direto com a luz sem proteção do filme polimérico, enquanto que a concentração de isotretinoína livre caiu drasticamente neste tempo inicial de exposição de 94% para 37%.
- A cinética de liberação *in vitro* da NC ISO 6, com solubilidade da isotretinoína determinada no meio tampão fosfato pH 7,4 = 0,0007mg/mL, demonstrou liberar gradativamente o fármaco de maneira satisfatória. Na primeira hora de ensaio foi demonstrado um efeito “burst” com liberação de 20% de isotretinoína e, após 6 horas, foram liberados cerca de 50%, chegando a 100% após 20 horas de ensaio. Com este efeito “burst” pode-se sugerir que a quantidade de isotretinoína liberada rapidamente estava presente na camada polimérica em contato com a fase externa da dispersão.
- Os ensaios efetuados de envelhecimento em longo prazo, potencial zeta, fotodegradação e cinética de liberação *in vitro* das dispersões de nanocápsulas contendo isotretinoína, sugeriram a possibilidade de uma quantidade deste fármaco (20 a 30%), estar presente na superfície polimérica das nanocápsulas, devendo ser necessários mais estudos futuros que comprovem realmente esta hipótese.



## 6. REFERÊNCIAS

1. ABDELWAHED, W.; DEGOBERT, G; STAINMESSE, S; FESSI, H.; Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process and storage considerations. *Drug Deliv Rev*, Amsterdam, v.58, p.1688-1713, 2006.
2. ABDOU H.M. Dissolution, Bioavailability & Bioequivalence. Easton: Mack Publishing Company, 554p., 1989.
3. AL ACHI, A.; GREENWOOD,R.; Erythrocytes as oral delivery systems for human insulin. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, New York, v.24, p. 67-72, 1998.
4. ALLEN, J.G., BLOXHAM, D.P. The pharmacology and pharmacokinetics of the retinoids. *Pharmacol. Ther*, London, v.40, n.1, p. 1-27, 1989..
5. ALLEN JR. L.V., POPOVICH N.G., ANSEL H.C. Solid Oral Modified-Release Dosage and Drug Delivery Systems. In: Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, 8ed , Lippincott Williams e Wilkins, Baltimore, p.260, 2005, cap.9. (A)
6. ALLEN JR. L.V., POPOVICH N.G., ANSEL H.C., Novel Dosage Forms and Drug Delivery Technologies. In: Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, 8ed., Lippincott Williams e Wilkins, Baltimore, p. 652-671, 2005, cap.20.(B)
7. ALI, S. A. M.; ZHONG, S. P.; DOHERTY, P. J.; WILLIAMS, D. F.; Mechanisms of polymer degradation in implantable devices: I. Poly (caprolactone). *Biomaterials*, Guilford, v.14, p.648, 1993.
8. AMMOURY N., FESSI H. DEVISSAGUET J.P.;PUISIEUX F.; BENITA S.; In vitro release kinetic pattern of indomethacin from poly (D,L-Lactide) nanocapsules. *J. Pharm. Sc.*, Washington, v.79 (9), p. 763-7, 1990.

9. ANDERSON J.M., SHIVE M.S.; Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. *Adv. Drug Deliv Rev*, Amsterdam, v. 28, p.5-24,1997.
10. ANDREO-FILHO, N; OLIVEIRA, A.G., Sistemas de Micro/Nanoencapsulação de fármacos. *Infarma*, Brasília, v.9, nº 1/5, p.18-21, 1999
11. BANGHAM A.D.; STANDISH M.M.; WATKINS J.C.; Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J. Mol. Biol*, London, v.13, p.238-52, 1965.
12. BARRAT G.M.; Therapeutic applications of colloidal drug carriers. *Pharm. Sci Technol Today (PSST)*, Oxford, v.3, p.163-171, 2000.
13. BASF CORPORATION; Pluronic® F68 Block Copolymer Surfactant. *Technical Bulletin*, 2004.
14. BLANER, W.S.; Cellular metabolism and actions of 13-*cis*- retinoic acid. *J Am Acad Dermatol*, St. Louis, v.45, n.5, p. S129-S135, 2001.
15. BLOUZA L., CHARCOSSET C., SFAR S., FESSI H.; Preparation and characterization of spironolactona – loaded nanocapsules for paediatric use. *Int J Pharm*, Amsterdam, v.325, p. 124-131, 2006.
16. BOUCHEMAL K., BRIANÇON S., FESSI H., CHEVALIER Y., BONNET I., PERRIER E.; Simultaneous emulsification and interfacial polycondensation for the preparation of colloidal suspensions of nanocapsules. *Mater Sci Eng*, Lausanne, p. 472-480, 2006.
17. CASTLEBERRY R.P, EMANUEL P.D., ZUCKERMAN K.S., COHN S., STRAUSS L., BYRD R.L., HOMANS A., CHAFFEE S., NITSCHKE R., GUALTIERI R.J.; A Pilot Study of Isotretinoin in the Treatment of Juvenile Chronic Myelogenous Leukaemia. *N Engl J Med*, Boston, v. 331, p.1680-4, 1994.
18. CAUCHETIER, E., DENIAU, M., FESSI, H., ASTIER, A., PAUL, M. Atovaquone-loaded nanocápsulas: influence of the nature of the polymer on their in vitro characteristics. *Int J Pharm*, Amsterdam, v.250, p.273-81, 2003.
19. CHANDRARATNA, R.A.; Rational design of receptor-selective retinoids. *J Am Acad Dermatol*, St Louis, v. 39(4Pt 2), p. S124-8, 1998.
20. CHANG T.M.; Semipermeable microcapsules; *Science*, New York, v.146, p.524-525, 1964.

21. CHUNG Y.I., TAE G., YUK S.H.; A facile method to prepare heparin-functionalized nanoparticles for controlled release of growth factors. *Biomaterials*, Guilford, v.27, p.2621-2626, 2006.
22. COMPANIES INVOLVED IN POLYMERIC DRUG DELIVERY – DRUGDEL; Polymeric drug delivery – a brief review. Disponível em [http:// www.drugdel.com /polymer.htm](http://www.drugdel.com/polymer.htm), acessado em julho de 2007.
23. COUVREUR P., BARRAT G., FATTAL E., LEGRAND P., VAUTHIER, C.; Nanocapsule technology: a review. *Critical Review Therapeutic Drug Carrier Systems*, v.19, n.2, p.99-134, 2002.
24. COUVREUR P., GREF R., ANDRIEUX K., MALVY C.; Nanotechnologies for drug delivery: Application to cancer and autoimmune diseases. *J. Solid State Chem*, San Diego, v.34, p. 231-235, 2006.
25. CRUZ L., SOARES L.U., COSTA T.D., MEZZALIRA G., SILVEIRA N.P., GUTERRES S. S., POHLMANN A.R.; Diffusion and mathematical modeling of release profiles from nanocarriers. *Int J Pharm*, Amsterdam, v.313, p. 198-205, 2006.
26. CUNHA JUNIOR A.S., LIGÓRIO S.F., CARNEIRO L.B., ORÉFICE F.; Microemulsões como veículo de drogas para administração ocular tópica. *Arq. Bras. Oftalmol.*, São Paulo, v.66, p.385-391, 2003.
27. DESHPANDE, A. A.; HELLER, J.; GURNY, R.; Bioerodible polymers for ocular delivery. *Critical Review Therapeutic Drug Carrier Systems*, v.15, p.381-420, 1998.
28. DI GIOVANNA J.J.; Postransplantation Skin Cancer: Scope of the problem, Management and Role for System Retinoid Chemoprevention. *Transplant Proc*, New York, v.30, p.2771-2775, 1998.
29. DIAZ C., VARGAS E., GATJENS-BONICHE O.; Cytotoxic effect induced by retinoic acid loaded into galactosyl-sphingosine containing liposomes on human hepatoma cell lines. *Int J Pharm*, Amsterdam, v. 325, p. 108-115, 2006.
30. DRAGNEV K.H., RIGAS J.R., DMITROVSKI E.; The Retinoids and Cancer Prevention Mechanisms. *Oncologist*, Dayton, v.5, p. 361-168, 2000.
31. DUVIC M., APISARNTHANARAX N., COHEN D.S., SMITH T.L., HA C.S., KURZROCK R.; *J. Am. Acad. Dermatol.*, St.Louis, v.49, n.1, p. 35-49, 2003.

32. ELLIS C.N., KRACH K.J.; Uses and complications of isotretinoin therapy. *J Am Acad Dermatol*, St.Louis , v.45, n.5, p. S150-S157, 2001.
33. ELKE, M; ROLF-JOACHIM, M; WOLF – DIRTER, D. Interrelation between side chain crystallization and dynamics glass transitions in higher poly (n-alkyl methacrylates). *Termochimica acta*, v.403, n.1, p.105-114, 2004.
34. FARO KHZAD, O. C.; LANGER, R. Nanomedicine developing smarter therapeutic and diagnostic modalities. *Adv Drug Deliv Rev*, Amsterdam, v.58, p. 1456-1459, 2006.
35. FAWAZ F., BONINI F., GUYOT M., LAGUENY A.M., FESSI H., DEVISSAGUET J.D.; Disposition and protective effect against irritation after intravenous and retal administration of indomethacin loaded nanocapsules to rabbits. *Int J Pharm*, Amsterdam, v. 133, p.107-115, 1996.
36. FENG S.S., HUANG G.; Effects of emulsifiers on the controlled release of paclitaxel (Taxol®) from nanospheres of biodegradable polymers. *J Control Release*, Amsterdam, v.71, p.53-69, 2001.
37. FESSI H., PUISIEUX F., DEVISSAGUET J.PH., AMMOURY N., BENITA S.; Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement, *Int J Pharm*, Amsterdam, v. 55, p. R1-R4,1989.
38. FINE J.D., JOHNSON L.B., WEINER M., STEIN A., SUCHINDRAN C.; Chemoprevention of squamous cell carcinoma in recessive dystrophic epidermolysis bullosa: Results of a phase 1 trial of systemic isotretinoin. *J Am Acad Dermatol*, St.Louis, v.50, p. 563-571, 2004.
39. FRAUNFELDER F.W., FRAUNFELDER F.T., CORBETT, J.J.; Isotretinoin – Associated Intracranial Hypertension. *Ophthalmology*, Rochester, v.111, n.6, p.1248-1250, 2004.
40. FREIBERG S., ZHU X.X.; Polymer microspheres for controlled drug release review. *Int J Pharm*, Amsterdam, v.282, p. 1-18, 2004.
41. GUINEBRETIERE S., BRIAÇON S., LIETO J., MAYER C., FESSI H.; Study of Emulsion - Diffusion of Solvent: Preparation and Characterization of Nanocapsules. *Drug Dev Res*, New York, v.57, p.18-33, 2002.
42. HONG WK, LIPPMAN SM, ITRI LM, KARP DD, LEE JS, BYERS RM, SCHANTZ SP, KRAMER AM, LOTAN R, PETERS LJ, ET AL; Prevention of second primary

- tumors with isotretinoin in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med*, Boston, v. 323, p. 795-801, 1990.
43. HONG W.K., ITRI L.M.; Retinoids and human cancer. In: SPORN, M.B., ROBERTS, A.B., GOODMAN, D.S. eds.; *The Retinoids: Biology, Chemistry, and Medicine*, 2nd ed., New York, Raven Press Ltd, 1994, p.597-630.
  44. JACOBS D.G., DEUTSCH N.L., BREWER M.; Suicide, depression, and isotretinoin: Is there a causal link? *J Am Acad. Dermatol*, St. Louis, v.45, n.5, p.S168 – S175, 2001.
  45. JALIL R., NIXON J.R.; Microencapsulation using poly (DL-lactic acid) I: Effect of preparative variables on the microcapsule characteristics and release kinetics. *J Microencapsul*, London, v.7, p. 229-244, 1990.
  46. JIANGA, W. GUPTA, R. K.; DESHPANDE, M. C.; SCHWENDEMAN, S.P.; Biodegradable poly (lactic-co-glycolic acid) microparticles for injectable delivery of vaccine antigens. *Adv Drug Deliv Rev*, Amsterdam, v.57, p.391-410, 2005.
  47. JONES DH. The role and mechanism of action of 13-cis-retinoic acid in the treatment of severe (nodulocystic) acne. *Pharmacol Ther*, London, v. 40, p.91-106, 1989.
  48. KANG H.J., SHIN H.Y., CHOI H.S., AHN H.S.; Novel regimen for the treatment of juvenile myelomonocytic leukemia (JMML). *Leuk Res*, Oxford, v.28, p.167-170, 2004.
  49. KIBBE, A. H. Handbook of excipients, 3ª edição, APHA, Washington , p. 13-17; 292-294, 2000.
  50. KNOBLER RM, TRAUTINGER F, RADASZKIEWICZ T, KOKOSCHKA EM, MICKSCHE M; Treatment of cutaneous T cell lymphoma with a combination of low dose interferon alfa-2b and retinoids. *J Am Acad Dermatol*, St Louis, v.24, p.247-52, 1991.
  51. KREUTER J.; Nanoparticles and nanocapsules--new dosage forms in the nanometer size range. *Pharm Acta Helv*, Zürich, v. 53, p.33-39, 1978
  52. KREUTER J., LIEHL E.; Long-term studies of microencapsulated and adsorbed influenza vaccine nanoparticles; *J Pharm Sci*, Easton, Pa. v.70, p.367-71,1981..

53. LAMPRECHT A.; UBRICH N.; PEREZ M.H.; LEHR C.M.; HOFFMAN M.; MAINCENT P.; Biodegradable monodispersed nanoparticles prepared by pressure homogenization-emulsification. *Int J Pharm*, Amsterdam, v.184, p. 97-105, 1999.
54. LASIC D.D.; Liposome Stability. In: *Liposomes in Gene Delivery*, CRC Press LLC, New York, p.97-98, 1997.
55. LIU J., HU W., CHEN H., WI Q., XU H., YANG X.; Isotretinoin – loaded solid lipid nanoparticles with skin targeting for topical delivery. *Int J Pharm*, Amsterdam, v.328, p. 191-195, 2007.
56. MAGALHÃES N.S.S., PONTES A., PEREIRA V.M.W, CAETANO M.N.P.; Colloidal carriers for benzathine penicillin G: Nanoemulsions and nanocapsules. *Int J Pharm*, Amsterdam, v. 208, p.71-80, 2000.
57. MAGENHEIM B. AND BENITA S.; Nanoparticle Characterization: a comprehensive physicochemical approach, *STP Pharma Sciences*, Washington, v.1, p.221-241, 1991.
58. MARCUS R., COULSTON A.M.; Vitaminas Lipossolúveis. In: GOODMAN A., GILMAN L.E.L., HARDMAN J.G., Goodman & Gilman – As bases farmacológicas da Terapêutica, 10<sup>a</sup> Ed., p. 1333-40, 2003, cap.64.
59. MARTIN, A.N.; Drug Product Design – Prodrugs e Drug Carriers. In: *Physical Pharmacy: physical chemical principles in the pharmaceutical science*, 4ed., 1993, pág 512- 548, cap.19.
60. MARTY, J.J., OPPENHEIN, R.C.; Colloidal systems for drug delivery. *J Pharm Sci*, Easton, v.6, p.65-76, 1977.
61. MASON, N., THIES, C., CÍCERO, T.J.; In vivo and in vitro evaluation of a microencapsulated narcotic antagonist. *J Pharm Sci*, Easton, v.65, p.847-850, 1976.
62. MATSUMOTO A.; MATSUKAWA Y.; SUZUKI T.; YOSHINO H.; Drug release characteristics of multi-reservoir microspheres with poly (DL-lactide-co-glycolide) and (DL-poly-lactide). *J Control Release*, Amsterdam, v.106, p.172-180, 2005.
63. MO Y., LIM L.Y.; Preparation and in vitro anti cancer activity of wheat germ agglutinin (WGA)-conjugated PLGA nanoparticles loaded with paclitaxel and isopropyl miristate. *J Control Release*, Amsterdam, v.107, p.30-42, 2005.

64. MOON, R.C., MEHTA, R.G., RAO, K.V.N.; Retinoids and câncer in experimental animals. In: SPORN, M.B., ROBERTS, A.B., GOODMAN, D.S. eds, *The Retinoids: Biology, Chemistry, and Medicine*, 2nd ed., p.573-593, Raven Press, New York, 1994.
65. MOON, T.E., LEVINE N., CARTMEL B., BANGERT J.L.; Retinoids in prevention of skin cancer. *Cancer Letters*, Amsterdam, v.114, p.203-205, 1997.
66. MU L., FENG S.S.; A novel controlled release formulation for the anticancer drug paclitaxel (Taxol®): PLGA nanoparticles containing vitamin E TPGS. *J Control Release*, Amsterdam, v. 86, p.33-48, 2003.
67. MULLER C.R., HAAS S.E., BASSANI V. L., GUTERRES S.S.; Degradação e Estabilização do diclofenaco em nanocápsulas poliméricas. *Química Nova*, São Paulo, Vol.27, n.4, p.555-60, 2004.
68. NANKERVIS R., DAVIS S.S., DAY N.H., SHAW P.N.; Studies on the intravenous pharmacokinetics of the three retinoids in the rat. *Int J Pharm*, Amsterdam, v. 101, n.3, p.249-56, 1994.
69. NAU H.; Teratogenicity of isotretinoin revisited: Species variation and the role of all-trans-retinoic acid. *J Am Acad Dermatol*, St.Louis, v.45, p.S183-S187, 2001.
70. NASTRUZZI C., WALDE P., MENEGATTI E., GAMBARI R.; Liposome – associated retinoic acid. Increased in vitro antiproliferative effects on neoplastic cells. *FEBS LET*, Amsterdam, v.259, p.293-296, 1990.
71. NISSEN, D. Isotretinoin, In : *Mosby`s Drug Consult* <sup>TM</sup>, Elsevier Science, St. Louis, p. 1579-1582, 2002.
72. O`HAGAN D.T., SINGH M., GUPTA R.K.; Poly(lactide-co-glycolide) microparticles for the development of single-dose controlled–release vaccines. *Adv Drug Deliv Rev*, Amsterdam, v.32, p.225-246, 1998.
73. PAGE–CLISSON M.E, ALPHANDARY H.P., OUREVITCH M., ANDREMONT A, COUVREUR P.; Development of ciprofloxacin-loaded nanoparticles: Physicochemical study of the drug carrier. *J Control Release*, Amsterdam, v.56, p.23-32, 1998.
74. PRISTA, L.N., ALVES, A.C., MORGADO, R. Formas farmacêuticas obtidas por operações complexas ou múltiplas, IN : *Tecnologia Farmacêutica*, 4ª Edição, Fundação Calouste Gul Benkian, Lisboa, v.3 , p. 1179, 1993 (A).

75. PRISTA, L.N., ALVES, A.C., MORGADO, R. Novos Sistemas Terapêuticos, IN : Tecnologia Farmacêutica, 4ª Edição, Fundação Calouste Gul Benkian, Lisboa, v.3 , p. 2055, 1993 (B).
76. QUADIR A.; Application of Micronized Poloxamer in Pharmaceutical Development. *AAPS Pharmaceutical Technologies*, San Antonio, 2006.
77. REIS C.P., NEUFELD R.J., RIBEIRO A.J., VEIGA F.; Nanoencapsulation: I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine* , New York, v. 2, p. 8-21, 2006.
78. RIBEIRO S., HUSSAIN N., FLORENCE A.T.; Release of DNA from dendroplexes encapsulated in PLGA nanoparticles. *Int J Pharm*, Amsterdam, v.298, p.354-360, 2005.
79. ROSSO, G.C., DE LUCA, L. , WARREN, C.D., AND WOLF, G. Enzymatic synthesis of mannosyl retinyl phosphate from retinyl phosphate and guanosine diphosphate mannose. *J Lipid Res*, Memphis, v.16, p.235-243, 1975.
80. SANTIS M., STRAFACE G., CAVALIERE A., NOBILI E., CARUSO A.; The need for restricted prescription of retinoic acid derivate isotretinoin to prevent retinoid teratogenicity; *Prev Med*, New York, v.45, pg. 243-244 , 2007
81. SANTOS N.P.S., NASCIMENTO S.C., SILVA J.F., PEREIRA E.C.G., SILVA N.H., HONDA N.K., MAGALHÃES N.S.S.; Usnic acid-loaded nanocapsules: an evaluation of citotoxicity. *J Drug Deliv Sci Technol* , Paris, v.15, p.355-361, 2005.
82. SANTOS N.P.S., NASCIMENTO S.C., WANDERLEY M.S.O., PONTES-FILHO N.T., SILVA J.F., CASTRO C.M.M.B., PEREIRA E.C., SILVA N.H., HONDA N.K., SANTOS-MAGALHÃES N.S.; Nanoencapsulation of usnic acid: An attempt to improve antitumor activity and reduce hepatotoxicity. *Eur J of Pharm Biopharm*, Stuttgart, v.64, p. 154-160, 2006.
83. SAXENA V., SADOQI M., SHAO J.; Indocyanine green-loaded biodegradable nanoparticles: preparation, physicochemical characterization and in vitro release. *Int J Pharm*, Amsterdam, v.278, p.293-301, 2004.
84. SILVER R.D., RIMELL F.L., ADAMS G.L., DERKAY C.S., HESTER R., Diagnosis and management of pulmonary metastasis from recurrent respiratory papillomatosis; *Otolaryngol Head Neck Surg*, Rochester, v.129, p.622-629, 2003.



85. SMITH W., SABA N.; Retinoids as chemoprevention for head and neck cancer: Where do we go from here?. *Crit Rev Oncol Hematol*, Boca Raton, v.55, p.143-152, 2005.
86. SINGH A.K., DAS J.; Liposome encapsulated vitamin A compounds exhibit greater stability and diminished toxicity. *Biophys Chem*, Amsterdam, v.73, p. 155-162, 1998.
87. SOPPIMATH, K. S., AMINABHAVI, T. M., KULKARNI, A. R., RUDZINSKI, W. E.; Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *J Control Release*, Amsterdam, v. 70, p.1-20, 2001.
88. SONG C.X., LABHASETWAR V., MURPHY H., QU X., HUMPHREY W.R., SHEBUSKI R.J., LEVY R.J.; Formulation and characterization of biodegradable nanoparticles for intravascular local drug delivery. *J Control Release*, Amsterdam, v.43, p.197-212, 1997.
89. SPEISER P.P.; *Microencapsulation: New Techniques and Applications*, T. Kondo, Ed. Techno Inc. Tokyo, Japan, 1979. In: MARTIN, A.N., *Physical Pharmacy: physical chemical principles in the pharmaceutical science*, 4ed., cap.19, Drug Product Design, Prodrugs e Drug Carriers, pág 512- 548, 1993.
90. SPEISER P.P. AND G. BIRRENBACH; Polymerized micelles and their use as adjuvants in immunology. *J Pharm Sci*, Easton, v.65, p.1763-6, 1976.
91. STOLL D., BINNERT C., MOOSER V., TAPPY L.; Short-Term Administration of Isotretinoin Elevates Plasma Triglyceride Concentrations Without Affecting Insulin Sensitivity in Healthy Humans. *Metabolism*, Philadelphia, v.53, n.1, p.4-10, 2004.
92. SWEETMAN S.C.; Dermatological Drugs, Tretinoin and Isotretinoin In: Martindale, *The complete drug reference*, 33ed, London, Pharmaceutical Press, 2002, p.1115 - 1127, (A).
93. SWEETMAN S.C.; Nutritional Agents and Vitamins, Vitamin A. In: Martindale, *The complete drug reference*, 33ed, London, Pharmaceutical Press, 2002, p. 1350-1384, (B).
94. TEIXEIRA M., ALONSO M.J., PINTO M.M., BARBOSA C.M.; Development and characterization of PLGA nanospheres and nanocapsules containing xanthone e 3-methoxyxanthone. *Eur J of Pharm Biopharm*, Stuttgart, v.59, p.491-500, 2005.
95. THOMSEN K.; Cutaneous T-cell lymphoma and calcitriol and isotretinoin treatment, *Lancet*, London, v.345, p.1583, 1995.

96. USP 30, NF 25, V. 2, p. 2428, 2007.
97. VAUTHIER, C.; DUBERNET, C., FATTAL G.; PINTO-ALPHANDARY, H.; COUVREUR, P.; Poly (alkylcyanoacrylates) as biodegradable materials for biomedical applications. *Adv Drug Deliv Rev*, Amsterdam, v.55, p.519-548, 2003.
98. WANG Y.M., SATO H., HORIKOSHI I.; In vitro and in vivo evaluation of taxol® release from poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres containing isopropyl myristate and degradation of the microspheres. *J Control Release*, Amsterdam, v.49, p.157-166, 1997.
99. WIEGAND U.W. and CHOU R.C.; Pharmacokinetics of oral isotretinoin. *J Am Acad Dermatol.*, St Louis, v.39, n.2, pg. S8-S12, 1988
100. WIN K.Y., FENG S.S.; In vitro and in vivo studies on vitamin E TPGS-emulsified poly(DL-lactic-co-glycolic acid) nanoparticles for paclitaxel formulation. *Biomaterials*, Guilford, v. 27, p.2285-2291, 2006.
101. XIONG X.Y., LI Y.P., LI Z.L., TAM K.C., LIU Z.Y., XIE G.X.; Vesicles from Pluronic/poly(lactic acid) block copolymers as new carriers for oral insulin delivery. *J Control Release*, Amsterdam, v.120, p. 11-17, 2007.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)