



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE FARMÁCIA**

Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

LUCIANA FERREIRA FONSECA RODOVALHO

***ESTUDO DA ENCAPSULAÇÃO DA ISOTRETINOÍNA NAS
FORMAS LIVRE E ASSOCIADA A CICLODEXTRINAS EM
NIOSSOMAS***

Goiânia – 2007

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.



Termo de Ciência e de Autorização para Disponibilizar as Teses e Dissertações Eletrônicas (TEDE) na Biblioteca Digital da UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás-UFG a disponibilizar gratuitamente através da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações – BDTD/UFG, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: **Dissertação** **Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Autor(a):	Luciana Ferreira Fonseca Rodovalho		
CPF:	-	E-mail:	luciana.rodvalho@hotmail.com
Seu e-mail pode ser disponibilizado na página? <input type="checkbox"/> Sim <input checked="" type="checkbox"/> Não			
Vínculo Empregatício do autor	NatuCharm Indústria de Cosméticos LTDA		
Agência de fomento:		Sigla:	
País:		UF:	
CNPJ:			
Título:	ESTUDO DA ENCAPSULAÇÃO DA ISOTRETINOÍNA NAS FORMAS LIVRE E ASSOCIADA A CICLODEXTRINAS EM NIOSSOMAS		
Palavras-chave:	Hpβciclodextrinas. Niossomas. Isotretinoína		
Título em outra língua:	Research of isotretinoin encapsulation on its free form and associated to HPβCyclodextrins in niosomes		
Palavras-chave em outra língua:	HPβCyclodextrins. Niosomes. Isotretinoin		
Área de concentração:	Fármacos e Medicamentos		
Data defesa: (dd/mm/aa)	18/12/2007		
Programa de Pós-Graduação:	Programa de Pós Graduação em Ciência Farmacêutica da UFG		
Orientador(a):	Profa. Dra. Eliana Martins Lima		
CPF:	-	E-mail:	emlima@farmacia.ufg.br
Co-orientador(a):	-		
CPF:	-	E-mail:	-

3. Informações de acesso ao documento:

Liberção para disponibilização?¹ total parcial

Em caso de disponibilização parcial, assinale as permissões:

Capítulos. Especifique:

Outras restrições: _____ Gostaria que não fosse divulgado os anexos.

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação. O Sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.

Data: 19 / 10 / 2009

Assinatura do(a) autor(a)

¹ Em caso de restrição, esta poderá ser mantida por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Todo resumo e metadados ficarão sempre disponibilizados.

LUCIANA FERREIRA FONSECA RODOVALHO

***ESTUDO DA ENCAPSULAÇÃO DA ISOTRETINOÍNA NAS FORMAS
LIVRE E ASSOCIADA A CICLODEXTRINAS EM NIOSSOMAS***

Dissertação apresentada à Faculdade de Farmácia/ UFG, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Fármacos e Medicamentos.

Orientadora: Prof^a.dra. Eliana Martins Lima

Goiânia – 2007

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(GPT/BC/UFG)

**Rodvalho, Luciana Ferreira Fonseca
R695e Estudo da encapsulação da isotretinoína nas
formas livre e associada a ciclodextrinas em niossomas
[manuscrito] / Luciana Ferreira Fonseca Rodvalho. –
2007.**

81 f. : il., figs., tabs.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Eliana Martins Lima.

**Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de
Goiás, Faculdade de Farmácia, 2007.**

BIBLIOGRAFIA: F.72-81.

Inclui lista de abreviaturas e sigla, figuras, tabelas.

- | | |
|-----------------|--------------------------|
| 1. ENCAPSULAÇÃO | 2. HIDROXIPROPIL-[BETA]- |
| CICLODEXTRINA | 3. NIOSSOMAS |
| ISOTRETINOÍNA | 4. |

II. TÍTULO.

CDU: 615.014.6

LUCIANA FERREIRA FONSECA RODOVALHO

***ESTUDO DA ENCAPSULAÇÃO DA ISOTRETINOÍNA NAS FORMAS
LIVRE E ASSOCIADA A CICLODEXTRINAS EM NIOSSOMAS.***

Dissertação apresentada à Faculdade de Farmácia/ UFG, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Fármacos e Medicamentos.

Aprovada em:

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. Eliana Martins Lima
Universidade Federal de Goiás

Profa. Dra. Nereide Stela Santos Magalhães
Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Clévia Ferreira Duarte Garrote
Universidade Federal de Goiás

A Deus, que permitiu e abençoou mais esse projeto. A todos os que incentivam a pesquisa e o crescimento intelectual.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal de Goiás, com o apoio do CNPQ (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), FUNAPE (Fundação de Apoio à Pesquisa) e FINEP (Financiadora de Estudos e Projetos), sob orientação da Prof. Dr^a. Eliana Martins Lima a quem muito agradeço pela orientação e incentivo.

À Prof^a. MSc. Danielle Guimarães Almeida Diniz pelos ensaios realizados no HPLC-MS/MS e apoio pessoal. Também à Prof^a. Dr^a. Kennia Rocha pela doação das ciclodextrinas. Ao Prof. Dr. Antônio Alonso pelas análises de EPR e doação das membranas de estrato córneo, sem esquecer de seu aluno Jorge Luiz Vieira. À Prof^a. Dr^a. Clévia Duarte Ferreira pela voz de incentivo. Aos demais professores do Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas que contribuíram com informações científicas durante as disciplinas ministradas.

Às minhas colegas: Lillian Soares, Flávia Néri Oliveira, Fabrícia Saba e Lidiane Brandão, pelos compartilhamentos e discussões científicas. À Fernanda Bellato pelas ajudas com a coluna de sephadex e tantas outras. À estagiária Lívia Mendes pela organização do laboratório e apoio técnico.

Aos meus pais tão queridos, Elisabete e Claudionor Rodovalho, que jamais deixaram de apoiar os estudos e a pesquisa. Às minhas irmãs, Érica Rodovalho Fife e Ana Cláudia Rodovalho, pelas traduções e correções ortográficas. Às minhas eternas amigas-irmãs Dr^a. Luciana Balestra e Prof^a. MSc. Rosana Marques pelos desabafos. Ao meu marido e companheiro, Silvio Mitani, que apoiou e compreendeu as ausências e sacrifícios em prol da pesquisa científica.

E finalmente, a todos que me deram apoio no Senhor.

RESUMO

Os niossomas, vesículas formadas por tensoativos não-iônicos, e as ciclodextrinas (HP β CDs) são sistemas capazes de alterar as características físico-químicas originais de diversos fármacos. O maior desafio da administração tópica de retinóides, como isotretinoína (ácido 13-cis-retinóico), é a manutenção de sua estabilidade em formulações capazes de reduzir a sua toxicidade durante o tratamento. A proposta deste trabalho foi desenvolver sistema para o transporte e liberação da isotretinoína com potencial para aplicação na terapêutica tópica da acne. Os niossomas foram formados a partir de Brij®30:Colesterol:DCP (50:25:10) pelo método de hidratação do filme lipídico. O complexo HP β Ciclodextrinas-isotretinoína foi obtido por agitação durante 8 dias em tampão fosfato pH 7,4. Os niossomas foram caracterizados sendo possível verificar grande variedade morfológica, estruturas flexíveis e membrana fluída após a inclusão da isotretinoína livre. A fluidez da membrana que contém isotretinoína permitiu o vazamento de fármaco quando em concentrações maiores que 5 mM. O complexo HP β CDs:isotretinoína (20:1) aumentou consideravelmente o tamanho das vesículas, também permitindo vazamentos. Os sistemas desenvolvidos possuem potencial para uso como carreadores da isotretinoína na aplicação tópica demonstrando comportamento de “sistema de liberação modificado”.

Palavras chaves: HP β Ciclodextrinas. Niossomas. Isotretinoína.

ABSTRACT

Non-ionic surfactant vesicles (niosomes) and cyclodextrins (CDs) are able to modify physical-chemical properties of incorporated drugs. One of the major challenges for the topical administration of retinoids, such as isotretinoin (31cisRA), is the stability of these compounds in formulations capable of reducing their toxicity during the treatment. The purpose of this research was to develop vesicular carries capable to transport and deliver isotretinoin for topical application during acne treatment. The niosomes were obtained from Bryj@30:Cholesterol:DCP (50:25:10) by the film hydration method. The HP β CDs:isotretinoin complex was obtained by agitation for 8 days in phosphate buffer pH 7.4. The vesicles were characterized and it was possible to encounter a large amount of morphological varieties, flexible structures and fluid membrane, after inclusion of free isotretinoin. The fluidness of the membrane that contains isotretinoin allowed leaking of the drug when in concentration above 5 mM. The HP β CDs:Isotretinoin (20:1) increased the vesicle size considerably, also allowing drug leaking. The systems developed presented themselves as potential carries of isotretinoin for topical application and played the roll of drug delivery system,

Key words: HP β Cyclodextrins. Niosomes. Isotretinoin.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

β CDs	β -Ciclodextrinas
2T//	Desdobramento hiperfino máximo
5-DSA	5-doxil-estearato
Brij®	Polioxietileno aquil ésteres
Brij® 30	Lauril éter (4) de polioxietileno
Brij® 35	Lauril éter (23) de polioxietileno
CDs	Ciclodextrinas
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLAE-EM-	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao
EM	Espectrômetro de Massas
DCP	Dicetil Fosfato
DLLS	Dinamic Laser Light Scattering
DPR	Desvio Padrão Relativo
EC	Etrato córneo
EE%	Eficiência de encapsulação expressa em porcentagem
EHL	Equilíbrio Hidrófilo - Lipófilo
FDA	Food and Drug Administration
G	Gauss
H	Altura equivalente ao número de pratos teóricos
HP β CDs	Hidropropil- β -Ciclodextrinas
ICH	International Conference on Harmonisation
LD	Limite de Detecção
Log RbarA	Logarítimo de freqüência rotacional de difusão do marcador na água
Log RbarM	Logarítimo de freqüência rotacional de difusão do marcador na membrana
LQ	Limite de Quantificação
LUV	Vesículas Unilamelares Grandes (<i>Large Unilamellar Vesicles</i>)
MLV	Vesículas Multilamelares (<i>Multilamellar Vesicles</i>)
mM	Milimolar
MO	Microscopia óptica
MVV	Vesículas Multivesiculares (<i>Multivesicular Vesicles</i>)
n	Número de pratos teóricos
nm	Nanômetro
Nm	Fração de marcador na membrana
NNI	National Nanotechnology Initiative
PC	Fosfatidilcolina
PdI	Índice de Poldispersão
PM	Peso Molecular
RPE	Ressonância Paramagnética Eletrônica
Rs	Resolução
s	Segundos
SUV	Vesículas Unilamelares Pequenas (<i>Small Unilamellar Vesicles</i>)
TEMPO	2,2,6,6-tetrametilpiperidina
UV/VIS	Ultravioleta / Visível

LISTA DE FIGURAS

	PÁGINA
Figura 01 - Vários tipos de nanossistemas com aplicação terapêutica. Fonte: DUNCAN, 2005.	1
Figura 02 - Estrutura esquemática de lipossoma formado de fosfolipídios. Fonte: Enciclopédia Britânica (2007).	3
Figura 03 - Estrutura esquemática dos diferentes tipos de lipossomas: multilamelares grandes (MLV), unilamelares grandes (LUV), unilamelares pequenas (SUV) e multivesiculares (MVV). Fonte: www.scf-online.com/.../daniels_3_25_d.gif	3
Figura 04 - Estrutura esquemática do lipossoma indicando o posicionamento do fármaco de acordo com sua afinidade: lipossolúveis – bicamada lipídica; hidrossolúveis – região hidrofílica. Fonte: www.buymdprorx.com/images/qusome_1.jpg – Adaptado.....	4
Figura 05 – Estrutura química geral das ciclodextrinas. Fonte: www.gerbras.com.br/images/estrutura-azonon.gif	7
Figura 06 – Estrutura química espacial das ciclodextrinas demonstrando sua forma cilíndrica cônica. Fonte: www.gerbras.com.br/images/estrutura-azonon.gif	7
Figura 07 – Representação topográfica das α , β e γ -ciclodextrinas. Fonte: www.lsbu.ac.uk/water/images/cyclodex.gif	8
Figura 08 - Interação do fármaco com ciclodextrinas para a formação do complexo CDs:Fármaco sob constante de dissociação (K).	8
Figura 09 - Fluxograma representativo da patogênese da acne.....	10
Figura 10 – Estruturas químicas dos derivados da vitamina A, incluindo a isotretinoína, o isômero tretinoína e demais produtos de degradação (DINIZ et al, 2002).	11
Figura 11 – Estrutura química da Isotretinoína (ácido 13-cis-retinóico).	14
Figura 12 – Estrutura química da Tretinoína (ácido 13-trans-retinóico).	14
Figura 13 - Estrutura química do marcador de spin 5-doxil-estearato.	15
Figura 14 - Estrutura química do marcador de spin TEMPO (2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxil).....	16
Figura 15 - Estrutura química do Brij 30 – Lauril éter (4) de polioxietileno.....	19
Figura 16 - Estrutura química do Brij 35 - Lauril éter (23) de polioxietileno.	20
Figura 17 - Estrutura química do colesterol.....	20
Figura 18 - Estrutura química do DCP – dicetil fosfato.....	21

Figura 19 - Estrutura química do fosfatidilcolina (PC).	21
Figura 20 - Metodologia de preparo de niossomas multilamelares. Fonte: www.avantilipids.com - Adaptado.	27
Figura 21 - Metodologia de preparação do complexo de inclusão HP β CD- isotretinoína.	27
Figura 22 – Esquema de preparo de niossomas contendo isotretinoína e o complexo HP β CDs – isotretinoína. Fonte: www.avantilipids.com - Adaptado.	28
Figura 23 - Zetasizer® Nano S da Malvern™.	29
Figura 24 – Microscópio Invertido de Fluorescência – Laboratório de Tecnologia Farmacêutica - UFG.	30
Figura 25 – Espectrômetro de Ressonância Paramagnética Eletrônica. Fonte: 155.33.32.224/.../engineering/spectrometer.html	30
Figura 26 - Célula de difusão “Enhacer Cell” utilizada para testes de liberação in vitro em dissolutor Varian – descrição do aparato.	31
Figura 27 - Célula de difusão “Enhacer Cell” utilizada para testes de liberação in vitro em dissolutor Varian – desmontada.	32
Figura 28 - Célula de difusão “Enhacer Cell” utilizada para testes de liberação in vitro em dissolutor Varian – aparato completo.	32
Figura 29 – Esquema que descreve o método de extração da isotretinoína do estrato córneo após o ensaio de liberação in vitro.	34
Figura 30 – Cromatograma de isotretinoína 50 μ g/ ml por CLAE - FM: Acetonitrila: Acetato de Amônio 1% (95:5); Coluna Chromospher C18, fluxo 1,0 ml/min., 342 nm.	36
Figura 31 - Cromatograma de isotretinoína 3,125 μ g/ ml por CLAE - FM: Acetonitrila: Acetato de Amônio 1% (95:5); Coluna Microsorb C8.....	37
Figura 32 - Cromatograma de isotretinoína 3,125 μ g/ ml por CLAE - FM: Acetonitrila : Metanol : Acetato de Amônio 1% (80: 15 : 5); Coluna Microsorb C8.	37
Figura 33 - Cromatograma de isotretinoína 3,125 μ g/ ml por CLAE - FM: Acetonitrila : Metanol : Acetato de Amônio 1% (90:5); Coluna Microsorb C8 – A: fluxo 0,7 ml/min; B: 0,8 ml/min; C: 0,9 ml/min.	38
Figura 34 – Cromatograma de isotretinoína 3,125 μ g/ ml em 3 injeções diferentes por CLAE - FM: Acetonitrila: Acetato de Amônio 1% (95:5) acidificado com ácido acético glacial para pH 6,8; Coluna Microsorb C8.	38

Figura 35 – Cromatograma de isotretinoína 12,5 µg/ ml por CLAE - FM: Acetonitrila : Acetato de Amônio 1% (95:5); Coluna Microsorb C8 – A: 60°C; B: 45°C.	38
Figura 36 - Cromatograma de isotretinoína 6,25 µg/ ml por CLAE - Coluna Microsorb C8; FM: Acetonitrila: Acetato de Amônio 1% (95:5); Fluxo 1,0 ml/min; 342 nm – tempo de retenção da isotretinoína 5,78 min. - final.	39
Figura 37 - Cromatograma da curva de calibração da isotretinoína por CLAE - Coluna Microsorb C8; FM: Acetonitrila: Acetato de Amônio 1% (95:5); Fluxo 1,0 ml/min; 342 nm – tempo de retenção da isotretinoína 5,78 min (amarelo: 50 µg/ml, verde: 25 µg/ml, vermelho: 12,5 µg/ml; azul: 3,125 µg/ml).	39
Figura 38 - Curva de calibração da isotretinoína pelo método em CLAE.	40
Figura 39 - Cromatograma por CLAE para determinação do ruído: pico principal – metanol. Altura do ruído 0,113 mAU - FM: Acetonitrila:Acetato de Amônio 1% (95:5); 1ml/min.; 342 nm; Coluna Microsorb C8 – tempo de retenção da isotretinoína 5,78 min. - final.	41
Figura 40 – Cromatograma de isotretinoína por CLAE demonstrando limite de quantificação igual 0,36 µg/ml.	41
Figura 41 - Cromatograma de isotretinoína por CLAE demonstrando limite de detecção igual 0,0936 µg/ml.	42
Figura 42 - Cromatograma obtido por CLAE – separação dos picos de isotretinoína e tretinoína dos demais isômeros. FM: Acetonitrila:Acetato de Amônio 1% (95:5); 1ml/min.; 342 nm; Coluna Microsorb C8.– A; isotretinoína (4 µg/ml) ; B: tretinoína (4 µg/ml).	42
Figura 43 - Cromatograma de isotretinoína 6,125 µg/ ml por CLAE demonstrando que a sensibilidade do método - FM: Acetonitrila:Acetato de Amônio 1% (95:5); fluxo 1ml/min.; 342 nm; Coluna Microsorb C8.	44
Figura 44 – Cromatograma de isotretinoína 4 µg/ ml por CLAE demonstrando que o método é robusto, sendo alterado para este cromatograma o aparelho – de um cromatógrafo com injeção automática, para um com injeção manual - FM: Acetonitrila:Acetato de Amônio 1% (95:5); 1ml/min.; 342 nm; Coluna Microsorb C8.	45
Figura 45 – Cromatograma de isotretinoína 1,25 µg/ ml por CLAE demonstrando que o método é robusto, sendo alterado para este cromatograma a coluna – de uma C8 para outra C8 - FM: Acetonitrila:Acetato de Amônio 1% (95:5); 1ml/min.; 342 nm.	45

Figura 46 - Modelo esquemático que indica o posicionamento da isotretinoína encapsulada pelos niossomas.....	47
Figura 47 - Modelo esquemático que indica como a isotretinoína fica posicionada no complexo com as ciclodextrinas na proporção 1:1 (HPβCDs:Iso). Fonte: www.chemie.uni-duesseldorf.de/.../research1.gif - adaptado.....	47
Figura 48 - Interação da isotretinoína com HPβCiclodextrinas para a formação do complexo HPβCDs-Isotretinoína sob a força de complexação (K).....	48
Figura 49 - Modelo esquemático que indica onde o complexo HPβCDs:Isotretinoína fica incluso após a formação das vesículas niossomais contendo isotretinoína. Fonte: www.immunovaccine.com/images/diagram-vaccimax.gif - adaptado.....	49
Figura 50 - Leitura pelo método de espalhamento de luz (DLS) – niossomas de Brij 35.	50
Figura 51 – Medida de tamanho e polidispersão da amostra de niossomas (Brij® 30: Col: DCP 50:25:10) contendo isotretinoína 5 mM.	50
Figura 52 - Fotomicrografia por MO das vesículas formadas a partir de: A – Brij 30; B – Brij 30 + Colesterol; C – Brij 30 + Isotretinoína; D – Brij 30 + Colesterol + DCP + Isotretinoína.	51
Figura 53 – Fotomicrografia por MO: A: Lipossomas de PC; B: Niossomas de Brij30:Colesterol:DCP (50:25:10).....	52
Figura 54 – Fotomicrografia por MO de niossomas contendo isotretinoína– vesículas gigantes – multi e unilamelares.....	52
Figura 55 – Fotomicrografia por MO dos niossomas contendo isotretinoína (características morfológicas): multilamelares, unilamelares, esféricos e alongados.....	53
Figura 56 – Fotomicrografia de niossomas contendo isotretinoína por MO – NdNs (Niosomas Dentro de Niosomas).....	53
Figura 57 – Fotomicrografia de niossomas contendo isotretinoína com marcador de fluorescência por microscopia óptica – leitura com luz florescente: formatos diferentes e NdNs.	54
Figura 58 – Fotomicrografia de niossomas contendo isotretinoína com marcador de fluorescência por microscopia de fluorescência – vesículas em movimento – (A):tempo zero;(B) tempo 1s; (C) tempo 2s;(D) tempo 3s.	54

Figura 59 – Fotomicrografia de niossomas contendo isotretinoína com marcador de fluorescência por microscopia de fluorescência – vesícula dobrada em movimento – (A):tempo zero;(B) tempo 2s.....	55
Figura 60 – Espectros de RPE de amostras marcadas com 5-DSA – o aumento do 2T// indica maior rigidez da membrana com a presença de colesterol e ainda maior com a adição do DCP.	56
Figura 61 – Espectros de RPE (marcador 5-DSA): a diferença dos valores do 2T// para os lipossoma e niossomas contendo isotretinoína 10 mM permaneceu dentro do erro experimental de 0,5 G.....	56
Figura 62 - Espectro de RPE para marcador TEMPO nas amostras: niossomas contendo 20mM de Isotretionína; niossomas brancos; niossomas contendo 40 mM de isotretionína. Análise realizada a 37°C.	57
Figura 63 - Espectro de RPE para marcador 5-DSA nas amostras: niossomas branco; niossomas contendo 40 mM de isotretionoína e niossomas contendo 20 mM de isotretinoína.....	58
Figura 64 - Eficiência de encapsulação de isotretinoína em niossomas em função de sua concentração molar.....	60
Figura 65 - Eficiência de encapsulação de isotretinoína em niossomas determinada por CLAE indicando a razão molar anfifílico estrutural:fármaco.....	60
Figura 66 - Eficiência de encapsulação de isotretinoína em niossomas expressa em porcentagem de fármaco incorporado ao sistema em relação à quantidade de fármaco inicial.	61
Figura 67 - Eficiência de formação do complexo de isotretinoína em hidroxipropilβciclodextrinas em função da concentração de CDs acrescida ao sistema.....	62
Figura 68- Cromatogramas por CLAE para o ensaio de liberação em membranas Coltran® A: 9705, B: 9715, C: 9725 3M™ - FM: ACN:Acetato Amônio 1% (95:5) -1ml/min -342 nm.	64
Figura 69 – Curva de calibração obtida pelo método em CLAE-EM-EM.	65
Figura 70 – Cromatograma da curva de calibração da isotretinoína por CLAE – EM-EM: Coluna Polaris RP C8; FM: Acetonitrila: Ácido Acético 0,5% (70:30); Fluxo 0,3 ml/min;detector 1600 watts, agulha 500 watts, shield 600 watts, pressão do ar 22 psi, ionização negativa – tempo de retenção da isotretinoína 5,18 min.....	65
Figura 71 – Espectro de massas da curva de calibração da isotretinoína por CLAE – EM-EM: Coluna Polaris RP C8; FM: Acetonitrila: Ácido Acético 0,5%	

(70:30); Fluxo 0,3 ml/min;detector 1600 watts, agulha 500 watts, shield 600 watts, pressão do ar 22 psi, ionização negativa – tempo de retenção da isotretinoína 5,18 min.....	66
Figura 72 - Perfil de permeação da isotretinoína em membrana sintética Coltran® 9715.	66
Figura 73 – Perfil de permeação da isotretinoína em membrana sintética Coltran® 9728.	67
Figura 74 – Perfil de permeação da isotretinoína em estrato córneo.	68
Figura 75 - Isotretinoína (%) extraída da membrana de estrato córneo após 2 horas de ensaio de permeação.	69

LISTA DE TABELAS

	PÁGINA
Tabela 01 - Parâmetros iniciais para o desenvolvimento do método cromatográfico por CLAE.....	23
Tabela 02 - Otimização do método cromatográfico inicial.....	23
Tabela 03 - Exemplos de métodos cromatográficos para quantificação da isotretinoína por CLAE (LIMA et al, 2005.).....	35
Tabela 04 - Curvas de calibração para isotretinoína por CLAE demonstrando linearidade do método.	40
Tabela 05 - Limites de quantificação e detecção encontrados pelo método de CLAE....	41
Tabela 06 - Determinação dos parâmetros de eficiência da análise cromatográfica definidos por cromatograma em condições isocráticas, conforme metodologia desenvolvida por CLAE.	43
Tabela 07 - Resultados intra-dia demonstrando a precisão (DPR menor que 5%) e exatidão (recuperação maior que 80%) do método.....	44
Tabela 08 - Controle da velocidade e do tempo de centrifugação de niossomas – centrifugação a 2000 rpm por 2 minutos.	46
Tabela 09 - Constante de inclusão do complexo HPβCDs:isotretinoína.....	48
Tabela 10 - Comparação dos tamanhos dos niossomas (Brij® 30: Col: DCP 50:25:10) formados: branco, com isotretinoína (5 mM) e com complexo HPβCDs:isotretinoína (20:1).....	51
Tabela 11 - Eficiência da formação de complexo de inclusão da isotretinoína em HPβCDs e sua encapsulação em niossomas.	63

SUMÁRIO

	PÁG.
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. NANOTECNOLOGIA	1
1.2. LIPOSSOMAS	2
1.3 NIOSSOMAS	5
1.4 CICLODEXTRINAS	7
1.5 ACNE	9
1.5.1 Acne e a Qualidade de Vida	9
1.5.2 Patogenesia da Acne	10
1.6 ISOTRETINOÍNA	11
1.6.1 Mecanismo de Ação	12
1.6.2 Indicações	12
1.6.3 Efeitos Colaterais da Isotretinoína	13
1.6.4 Estabilidade da Isotretinoína	13
1.7 MÉTODOS UTILIZADOS PARA A CARACTERIZAÇÃO DE MICRO E NANOSSISTEMAS CARREADORES DE FÁRMACOS	15
2.1. Determinação de Tamanho por Espalhamento de Luz	15
2.2. Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE)	15
2.3. ESTUDO DE LIBERAÇÃO IN VITRO	16
2.4. OBJETIVOS	17
3 MATERIAIS	18
3.1 EQUIPAMENTOS	18
3.2 SUBSTÂNCIAS E REAGENTES	19
3.2.1 Brij® 30	19
3.2.2 Brij® 35	20
3.2.3 Colesterol	20
3.2.4 Dicetil Fosfato (DCP)	20
3.2.5 Fosfatidilcolina (PC)	21
3.2.6 Membrana Cotran™ 9715 (3M™)	21
3.2.7 Membrana Cotran™ 9728 (3M™)	22
4 MÉTODOS	23
4.1 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO QUANTITATIVO DE ANÁLISE DA ISOTRETINOÍNA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)	23
4.1.1 Otimização do Método	23

4.1.2 Curva de Calibração da Isotretinoína	24
4.1.3 Perfil cromatográfico da tretinoína (principal isômero)	24
4.2 VALIDAÇÃO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO POR CLAE	25
4.3 PREPARO DAS VESÍCULAS DE LIPOSSOMAS-NIOSSOMAS	25
4.4 PREPARO DO COMPLEXO HPβCD - ISOTRETINOÍNA	27
4.5 PREPARAÇÃO DE NIOSSOMAS CONTENDO O COMPLEXO DE INCLUSÃO HPβCICLODEXTRINAS-ISOTRETINOÍNA	28
4.6 DETERMINAÇÃO TAMANHO POR ESPALHAMENTO DE LUZ	29
4.7 MICROSCOPIA ÓPTICA	29
4.8 MICROSCOPIA ÓPTICA DE FLUORESCÊNCIA	29
4.9 RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA (RPE)	30
4.10 LIBERAÇÃO IN VITRO	31
4.10.1 Quantificação da isotretinoína nos ensaios de liberação <i>in vitro</i>	33
4.10.2 Extração da isotretinoína do estrato córneo pós-ensaio de liberação <i>in vitro</i>	33
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
5.1 ENVOLVIMENTO MÉTODO CROMATOGRÁFICO POR CLAE	35
5.1.1 Otimização do Método Cromatográfico	36
5.1.2 Método Analítico Final	39
5.2 VALIDAÇÃO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO POR CLAE	39
5.2.1 5.2.1 Curva de Calibração (Linearidade)	39
5.2.2 Limite de Quantificação e de Detecção	41
5.2.3 Seletividade, Especificidade e Sensibilidade	42
5.2.3.1 Determinação do Pico da Tretinoína	42
5.2.3.2 Resolução (Rs) e Número de Pratos Teóricos	43
5.2.3.3 Sensibilidade	43
5.2.4 Precisão e Exatidão	44
5.2.5 Robustez	45
5.3 OBTENÇÃO DOS SISTEMAS PROPOSTOS CONTENDO ISOTRETINOÍNA	46
5.3.1 Niossomas-Isotretinoína	46
5.3.1.1 Controle da Velocidade e tempo de centrifugação de niossomas	46
5.3.1.2 Localização da Isotretinoína nas Vesículas	46
5.3.2 HP β Ciclodextrinas-Isotretinoína	47
5.3.3 HP β Ciclodextrinas-isotretinoína em Niossomas-Isotretinoína	49
5.4 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DAS VESÍCULAS FORMADAS	49
5.4.1 Determinação do Tamanho	49

5.4.2 Características Morfológicas	51
5.4.3 Monitoramento da Dinâmica Molecular dos Lipídeos na Membrana das Vesículas	55
5.5 EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO DE ISOTRETINOÍNA EM NIOSSOMAS	59
5.6 EFICIÊNCIA DA FORMAÇÃO DO COMPLEXO DE ISOTRETINOÍNA EM HIDROXIPROPILβCICLODEXTRINAS	61
5.7 EFICIÊNCIA DO COMPLEXO FORMADO: HPβCICLODEXTRINAS-ISOTRETINOÍNA EM NIOSSOMAS-ISOTRETINOÍNA	63
5.8 ENSAIO DE LIBERAÇÃO IN VITRO	64
5.8.1 Curva de Calibração para CLAE-EM-EM	64
5.8.2 Ensaio em Membranas Sintéticas	66
5.8.2.1 Ensaio em Membranas Coltran® 9715	66
5.8.2.2 Ensaio em Membranas Coltran® 9728	67
5.8.3 Ensaio em Membranas de Estrato Córneo	68
5.8.4 Extração de Isotretinoína no Estrato Córneo pós Ensaio de Liberação	69
6 CONCLUSÕES	71
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72

1. INTRODUÇÃO

1.1 NANOTECNOLOGIA

Segundo o National Nanotechnology Initiative (NNI) nanotecnologia é definida de um modo geral como sendo “a compreensão e o controle da matéria em dimensões de aproximadamente 1 a 100 nanômetros” (KOO *et al*, 2005). Freitas (2005) define nanotecnologia como sendo “a engenharia de estruturas moleculares precisas – tipicamente medindo 0,1 μm ou menores”.

Nanomedicina é definida como sendo a ciência e tecnologia para diagnosticar, tratar e prevenir a doença e o trauma, ou aliviar a dor, além de promover e preservar a saúde humana usando ferramentas moleculares e conhecimentos moleculares do corpo humano (European Science Foundation's, 2005) (figura 1).

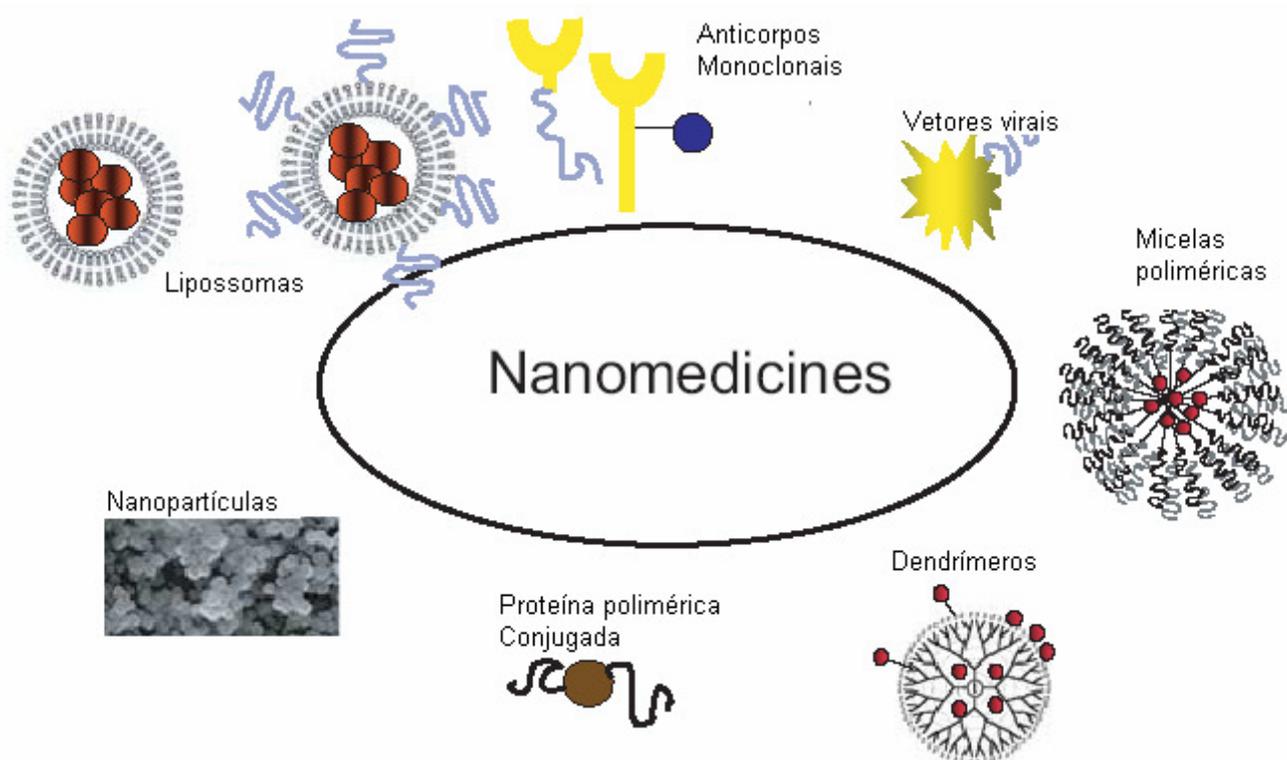


Figura 76– Vários tipos de nanossistemas com aplicação terapêutica. Fonte: DUNCAN, 2005.

A nanomedicina é a parte da nanotecnologia aplicada à saúde em sistemas de liberação de fármacos, sendo exemplos a tecnologia dos nanossistemas: os lipossomas, os imunolipossomas, os polimersomas, as nanocápsulas e nanoesferas

(DUNCAN, 2005). A tecnologia dos sistemas de liberação de fármacos, freqüentemente descritos como “drug delivery systems”, representa uma das fronteiras da ciência, a qual envolve diferentes aspectos multidisciplinares e pode contribuir muito para o avanço da saúde humana (AZEVEDO, 2002).

O uso de sistemas nanométricos carreadores de fármacos tem se estabelecido nas últimas décadas nas pesquisas clínicas e farmacêuticas, como os lipossomas, micelas, nanocápsulas, nanopartículas poliméricas, partículas lipídicas sólidas, niossomas, entre outros, aumentando a eficiência terapêutica de muitas substâncias, principalmente pelo aumento da estabilidade dos fármacos incluídos ao sistema e pelo direcionamento ao sítio alvo da ação farmacológica (TORCHILIN, 2006). Os sistemas nanoparticulados têm sido desenvolvidos a fim de reduzir o potencial tóxico, alterar a farmacocinética e modificar a liberação de fármacos com o intuito de prolongar sua ação (CORTESI *et al*, 2007). Uma das maiores vantagens da nanotecnologia para a medicina, é que estes sistemas possuem tamanhos bastante reduzidos, capazes de ultrapassar sem dificuldade certas barreiras biológicas, o que facilita a terapêutica em muitas patologias. Uma segunda vantagem é que dependendo da tecnologia empregada na obtenção destes sistemas, consegue-se obter diferentes propriedades de liberação dos agentes terapêuticos e reduzir os efeitos tóxicos de fármacos (FAHMY *et al*, 2005).

1.2. LIPOSSOMAS

Lipossomas são vesículas formadas pela auto-organização de fosfolipídios em água, sendo que sua membrana pode ter uma ou várias bicamadas lipídicas curvadas sobre si (figura 2). Os lipossomas têm sido estudados desde os anos 60 (SESSA e WEISSMANN, 1968). Um dos primeiros trabalhos utilizando lipossomas como um sistema de liberação de fármacos para administração tópica foi apresentado por Mezei e Gulasekharam (1980).

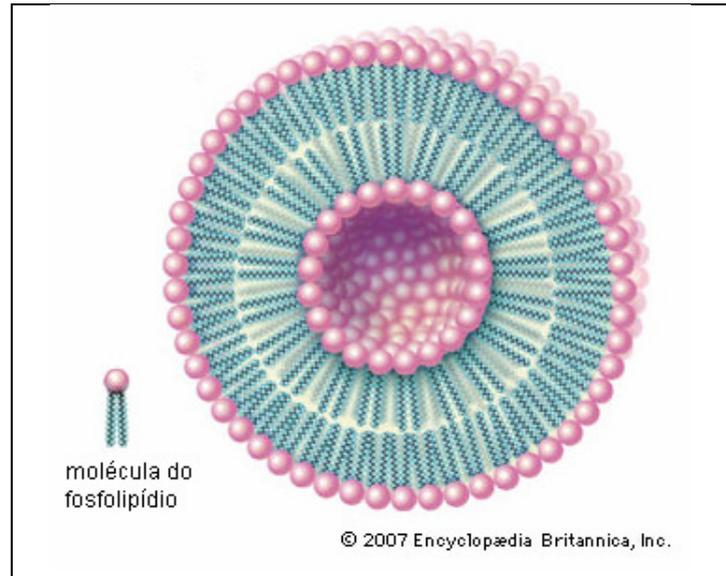


Figura 77 - Estrutura esquemática de lipossoma formado de fosfolípidios. Fonte: Enciclopédia Britânica (2007).

Lipossomas podem ser classificados quanto ao tamanho e número de bicamadas: vesículas multilamelares grandes (MLV) - vesículas que possuem mais de uma bicamada lipídica; vesículas unilamelares grandes (LUV) - vesículas que possuem apenas uma bicamada e diâmetro maior que 100 nm; e vesículas unilamelares pequenas (SUV) - vesículas que possuem apenas uma bicamada e diâmetro variando de 25 a 100 nm (ANDREO-FILHO *et al* 1999) (figura 3).

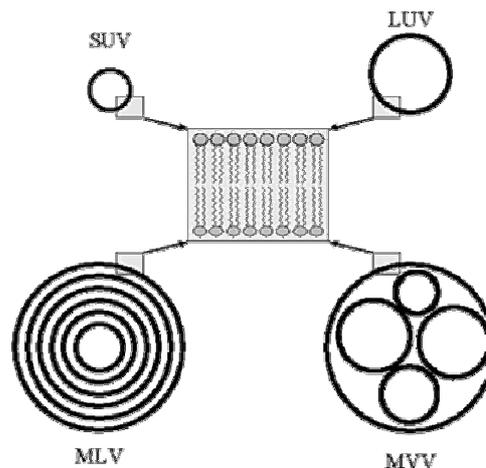


Figura 78 – Estrutura esquemática dos diferentes tipos de lipossomas: multilamelares grandes (MLV), unilamelares grandes (LUV), unilamelares pequenas (SUV) e multivesiculares (MVV). Fonte: www.scf-online.com/.../daniels_3_25_d.gif.

Os lipossomas podem conter o fármaco em diferentes localizações: na camada lipídica ou em sua região hidrofílica, dependendo da afinidade da substância encapsulada e sua polaridade (VEMURI e RHODES, 1995) (figura 4).

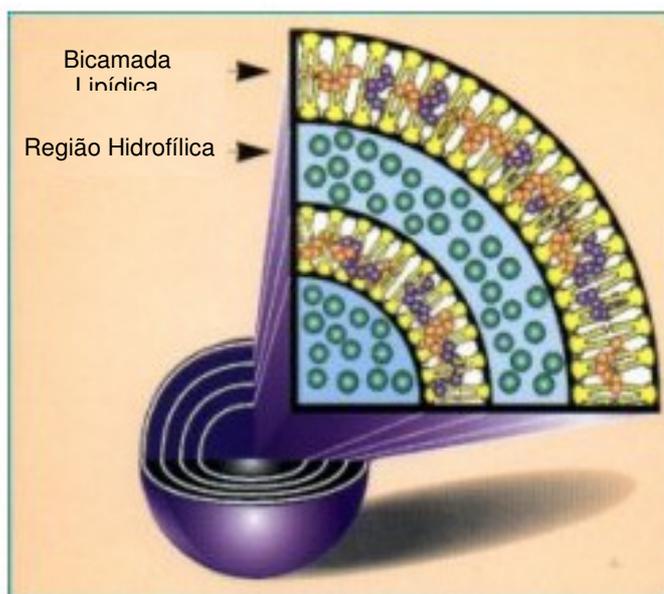


Figura 79 - Estrutura esquemática do lipossoma indicando o posicionamento do fármaco de acordo com sua afinidade: lipossolúveis – bicamada lipídica; hidrossolúveis – região hidrofílica. Fonte: www.buymdprorx.com/images/gusome_1.jpg – Adaptado.

Os lipossomas apresentam baixa toxicidade e imunogenicidade, são biodegradáveis e capazes de proteger os compostos encapsulados da diluição e degradação no sangue, de forma que, quando alcançam o tecido alvo, podem liberar doses concentradas da substância encapsulada, aumentando a eficácia do tratamento (AOKI *et al*, 1997).

A utilização de lipossomas como transportadores para a liberação de fármacos apresenta muitas vantagens, dentre as quais se citam (MACHY e LESERMAN, 1987):

- Lipossomas podem ser programados para a liberação controlada de fármacos durante um período prolongado de tempo.
- Lipossomas são pequenos o bastante para escaparem da circulação sangüínea para o tecido nos quais o endotélio capilar esteja danificado.
- Lipossomas são quimicamente similares a membrana celular de modo que são biologicamente compatíveis com outras células.
- Lipossomas conjugados com anticorpos ligam-se às células alvo com maior avidéz que a forma solúvel destes mesmos anticorpos.

- Lipossomas apresentam-se como método útil para proteger produtos lábeis biologicamente ativos, como proteínas e peptídeos, frente à sua inativação ou degradação no organismo.
- Lipossomas também podem prevenir o efeito tóxico de certas substâncias antes que elas atinjam o sítio de ação.
- A possibilidade de direcionar seletivamente os lipossomas para tipos celulares específicos através do emprego de anticorpos, hormônios, carboidratos ou outros ligantes abrem novas perspectivas para o transporte de fármacos encapsulados.

Em alguns casos, a encapsulação em lipossomas elevou a eficácia terapêutica do fármaco entre 700 a 1800 vezes em comparação com o fármaco livre (OSTRO e CULLIS, 1989). Os lipossomas revestidos por camada de polietilenoglicol (PEG) tornam-se “invisíveis” ao sistema imune, e permanecem por mais tempo no meio circundante, aumentando a vida útil do fármaco no organismo e aumentando a eficácia terapêutica do fármaco incluído ao sistema, por não permitir que o mesmo seja metabolizado e eliminado (KLIBANOV *et al*, 1990).

Lipossomas multilamelares podem liberar fármacos em até 30 minutos no estrato córneo, epiderme e derme com um aumento significativo das concentrações quando comparadas às preparações convencionais, por aumentar o conteúdo de água na pele, ou seja, melhorando a sua hidratação (BETZ *et al*, 2005).

1.3. NIOSSOMAS

As vesículas formadas por tensoativos não-iônicos, conhecidas como niossomas ou NSVs (*non-ionic surfactant vesicles*), foram introduzidas com objetivo de aumentar a estabilidade química das vesículas formadas a partir de fosfolipídios (PARDAKHTY *et al*, 2007, MANOSROI *et al*, 2003). Os niossomas têm se tornado uma alternativa importante como sistema de liberação controlada (GIRIGOSWAMI *et al*, 2006). Essas vesículas podem ser formadas por tensoativos, que podem ser de natureza sintética ou natural, associadas ou não a lipídios, dispersos em um meio aquoso constituindo assim vesículas anfifílicas. Estudos demonstraram que essas vesículas anfifílicas têm estabilidade química maior que as vesículas formadas por fosfolipídeos (KEMPS *et al*, 1988), além disso, podem ter um menor custo de produção, são de fácil armazenamento e mais atrativas que os lipossomas

tradicionais para a produção industrial tanto em cosméticos quanto para produtos farmacêuticos (UCHEGBU e VYAS, 1998).

Os niossomas são considerados vesículas elásticas e passíveis de ultra deformação sendo, portanto, potenciais carreadores de fármacos em aplicações transdérmicas, por serem capazes de atravessar os caminhos tortuosos do estrato córneo (MISHRA *et al*, 2007).

Alguns fármacos como a finasterida (TABBAKHIAN *et al*, 2006), acetazolamida (AGGARWAL *et al*, 2007), doxorubicina (GIANASI *et al*, 1997), tretinoína (MANCONI *et al*, 2006), e outras substâncias têm sido encapsuladas em niossomas com intuito de melhorar a biodisponibilidade, utilizando para tanto esse sistema carreador. Vários tensoativos têm sido testados com o objetivo de formar e caracterizar as vesículas de tensoativos não-iônicos, como os polissorbatos e ésteres de sorbitano (GIRIGOSWAMI *et al*, 2006) e os alquil éteres de polioxietileno (PARDAKHTY *et al*, 2007).

Diferentes composições para a formação de vesículas anfifílicas já foram descritas, como Brij30:Coolesterol:DCP (10:6:1) (MANCONI *et al*, 2003); niossomas preparados a partir de tween 20, 80 e span 20, 80 (GIRIGOSWAMI *et al*, 2006); vários tipos de polioxietileno alquil éter (Brij®) (PARDAKHTY *et al*, 2007); e associados a coolesterol (NASSERI, 2005). Esses estudos detalham, entre outras características, a eficiência de encapsulação de fármacos, assim como a estabilidade das vesículas formadas.

Alguns trabalhos já publicados utilizando o dodecil éter de polietilenoglicol (Brij 30®) e dicetil fosfato (DCP) em associação para a estabilização da tretinoína (isômero da isotretinoína) e para melhorar a sua penetração na pele demonstraram, em comparação com outros tensoativos não-iônicos (Span), efetiva melhora na eficiência de incorporação com a escolha dos primeiros anfifílicos (MANCONI *et al*, 2002, 2003 e 2006). Já a inclusão do coolesterol na formulação se deve às investigações feitas em vesículas lipossomais e niossomais, sobre o grau de rigidez que o coolesterol pode conferir ao sistema dependendo de sua concentração molar (NASSERI, 2005).

1.4. CICLODEXTRINAS

As ciclodextrinas (CDs) são oligossacarídeos estruturalmente relacionados, produzidos pela ciclização enzimática do amido catalizada pela enzima ciclodextrina-glicosil-transferase, formando uma espiral helicoidal de unidades de glicose (BIWER *et al*, 2002; SZEJTLI, 1988) (figura 5). Elas continuam a atrair interesse considerável no meio científico por terem aplicações interessantes relacionadas ao transporte de fármacos e à química supramolecular (NAIDOO *et al*, 2004; QI e SIKORSKI, 2001).

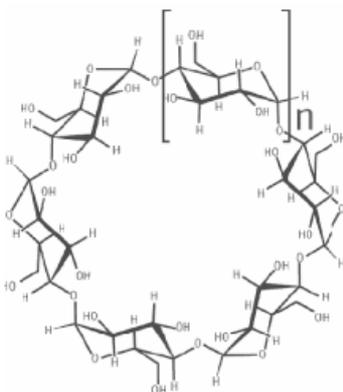


Figura 80 – Estrutura química geral das ciclodextrinas. Fonte: [www.gerbras.com.br/ images/estrutura-azelon.gif](http://www.gerbras.com.br/images/estrutura-azelon.gif)

Devido à falta de rotação livre das pontes de ligação das unidades de glicose, as CDs não são moléculas cilíndricas, tomando a forma tronco-cônica (RAMA *et al*, 2005). A estrutura das ciclodextrinas é constituída de uma cavidade hidrofóbica que permite a formação de complexos pela inclusão de uma variedade de moléculas orgânicas não-polares e de tamanho apropriado. A natureza hidrofílica da superfície externa da estrutura cíclica faz das ciclodextrinas estruturas solúveis em água (NASCIMENTO JR. *et al*, 2004) (figura 6).

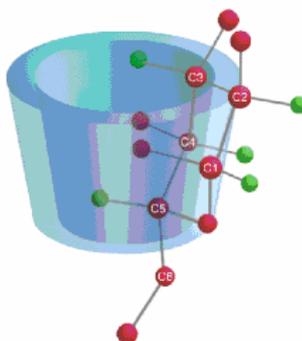


Figura 81 – Estrutura química espacial das ciclodextrinas demonstrando sua forma cilíndrica cônica. Fonte: [www.gerbras.com.br/ images/estrutura-azelon.gif](http://www.gerbras.com.br/images/estrutura-azelon.gif) .

As ciclodextrinas podem ser formadas por 6, 7 ou 8 unidades glicosídicas, sendo denominadas respectivamente de alfa (α), beta (β) e gama (γ) ciclodextrinas. As CDs naturais mais comuns são a α -ciclodextrina (ciclomalto-hexanose), β -ciclodextrina (ciclomalto-heptanose) e γ -ciclodextrina (ciclomalto-octanose), contendo unidades de α -1,4 glicopiranosose ligadas. Destes três derivados, a β -ciclodextrina (β -CD) parece ser a mais vantajosa para utilização farmacêutica como agente complexante, devido, entre outras propriedades, ao tamanho da sua cavidade (0,6 a 0,65 nm), disponibilidade e baixo custo (SZEJTLI, 1990; RAMA *et al*, 2005) (figura 7).

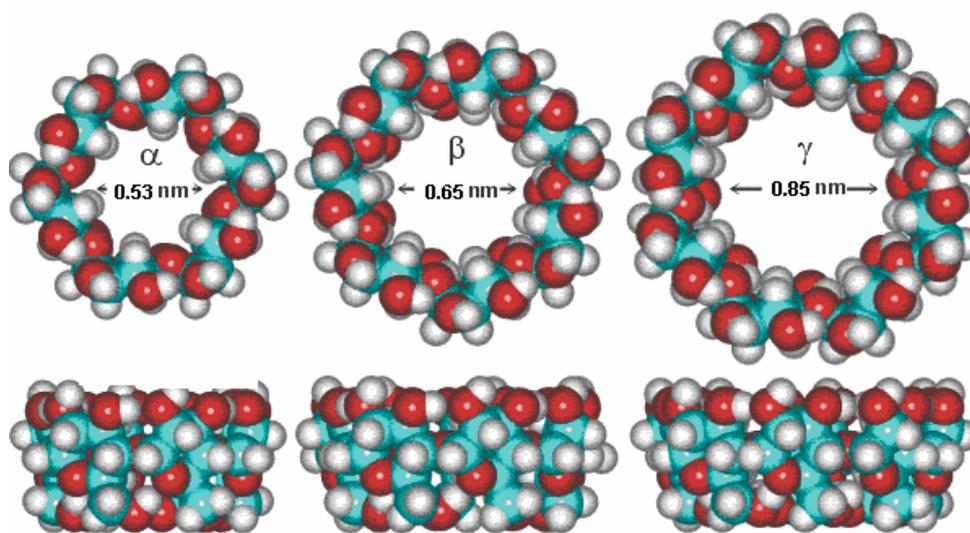


Figura 82 – Representação topográfica das α , β e γ -ciclodextrinas. Fonte: www.lsbu.ac.uk/water/images/cyclodex.gif.

A complexação de fármacos em ciclodextrinas aumenta as características de liberação sem interferir nas atividades da substância, pois sua complexação é um processo dinâmico rapidamente reversível (YAP *et al*, 2005). Assumindo que a complexação de ciclodextrina:fármaco ocorra na razão molar de 1:1, a associação geralmente ocorre como descrito no esquema da figura 8.

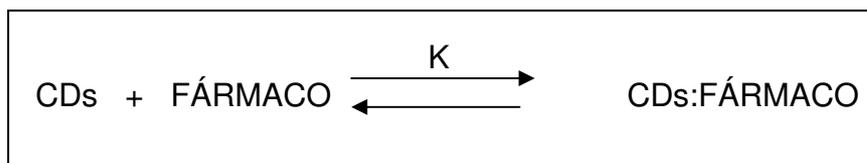


Figura 83 - Interação do fármaco com ciclodextrinas para a formação do complexo CDs:Fármaco sob constante de dissociação (K).

Dois parâmetros importantes podem ser definidos para o processo de inclusão: a força da complexação, ou constante de complexação (K); e o tempo de vida do complexo (τ). Sendo que a força de complexação depende da concentração de fármaco e de ciclodextrinas livres e de fármaco complexado a ciclodextrinas. A literatura descreve que o tempo de vida do complexo varia em torno de 2,5 a 7,9 microsegundos; e a constante de associação está entre $10^8 - 10^7$ /M/s, enquanto a de dissociação é de 10^5 /M/s. A complexação de moléculas em ciclodextrinas ocorre, com algumas exceções, através de ligações não-covalentes entre a molécula e a cavidade da ciclodextrina. Portanto, esse processo é dinâmico onde a molécula hóspede continuamente se associa e se desassocia da ciclodextrina hospedeira (STELLA *et al*, 1999).

As ciclodextrinas são usadas como excipientes farmacêuticos, como solubilizantes e agentes estabilizadores para substâncias lipofílicas em preparações aquosas (DUCHÊNE e WOUESSIDJEWE, 1996; STELLA e RAJEWSKI, 1997). As ciclodextrinas também têm efeito conhecido na estabilização de moléculas (LOFTSSON e BREWSTER, 1996). A solubilidade e a fotoestabilidade do fármaco encapsulado por ciclodextrinas podem ser afetadas por fatores como temperatura e pH (RAJEWSKI e STELLA, 2000), entretanto, Yap e colaboradores (2005) encontraram uma forma de incluir a isotretinoína em hidroxipropil- β -ciclodextrinas (um derivado mais solúvel das β -ciclodextrinas) de forma a garantir a estabilidade, solubilidade e fotoestabilidade do complexo formado. Outros pesquisadores também utilizaram as hidroxipropil- β -ciclodextrinas para a inclusão de retinóides como acitretina (LIU *et al*, 2003, 2004) e tretinoína (MONTASSIER *et al*, 1997).

1.5. ACNE

1.5.1. Acne e a Qualidade de Vida

O maior impacto das doenças de pele pode ser observado sobre a qualidade de vida, no que concerne ao fato de estar aparente e relacionada à auto-estima do paciente. Os efeitos da acne na aparência são os aspectos mais preocupantes da doença (GOLLNICK *et al*, 2003). Comparações com outras doenças crônicas têm demonstrado que pacientes acneicos têm níveis sociais, psicológicos e emocionais

prejudicados, similares aos pacientes com doenças mais graves, como asma, epilepsia, diabetes e artrite (MALLON *et al*, 1999). Aproximadamente 25% dos pacientes com desordens da pele têm distúrbios psiquiátricos significantes, como identificada pelo General Health Questionnaire. As desordens psiquiátricas mais comuns em pacientes com acne são ansiedade e depressão (AKTAN *et al*, 2000).

As terapias a base de retinóides têm um impacto benéfico para a qualidade de vida dos pacientes com essas afecções de pele. Isso se deve ao fato das respostas serem gradativas e relativamente rápidas (GOLLNICK *et al*, 2003).

1.5.2. Patogenesia da Acne

Recentemente, pesquisas têm buscado a entender a patogenesia dessa doença altamente difundida. Alterações no crescimento folicular, diferenciação e hiperplasia sebácea são as causas mais importantes, pois elas culminam a induzir a formação do micromedo – a primeira lesão da acne. O micromedo pode se desenvolver em um comedão não-inflamatório ou se tornar inflamado e se apresentar como pápula, pústula ou nódulo. A acne ocorre pela interação de fatores como hiperaqueratinização folicular; produção de sebo excessivo, hipercolonização do ducto por bactérias, inflamação resultante de resposta imune. O tratamento de acne com uso de retinóides é a escolha para pacientes que apresentam lesões inflamatórias acnéicas (Figura 09). Todos os retinóides afetam o micromedo e promovem uma diminuição das lesões inflamatórias e dos comedões (GOLLNICK *et al*, 2003).

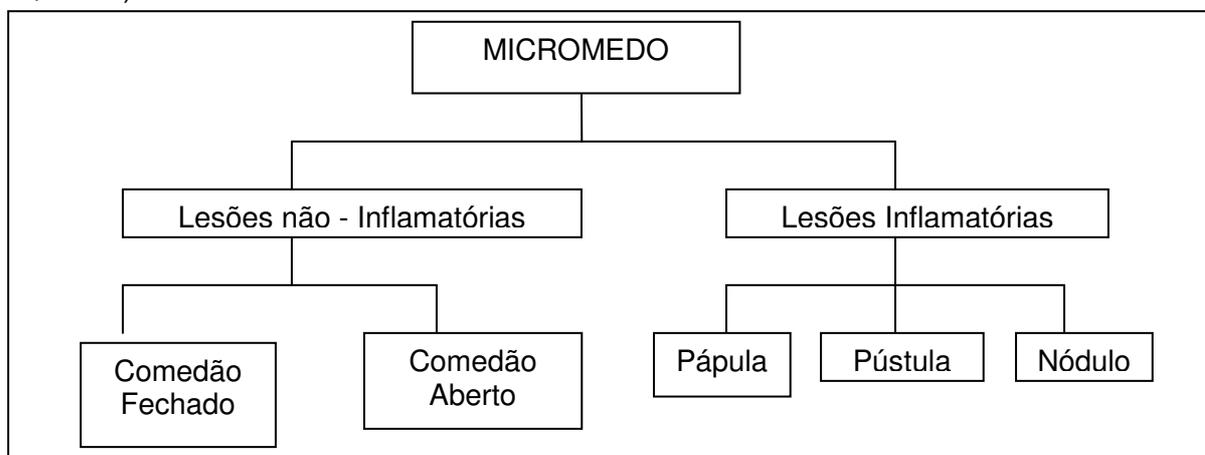


Figura 84 - Fluxograma representativo da patogenesia da acne.

Os retinóides tópicos pesquisados para essas aplicações são: a tretinoína, a isotretinoína, o adapaleno, o tazaroteno e o retiladeído, sozinhos ou em associação com outros compostos (QUEILLE-ROUSSEL *et al*, 2001; RIGOPOULOS *et al*, 2004).

1.6. ISOTRETINOÍNA

A isotretinoína, quimicamente conhecida como ácido-13-cis-retinóico (figura 10), faz parte do amplo grupo de compostos relacionados à vitamina A. É um estereoisômero sintético do ácido all-trans-retinóico (tretinoína) (DINIZ *et al*, 2002).

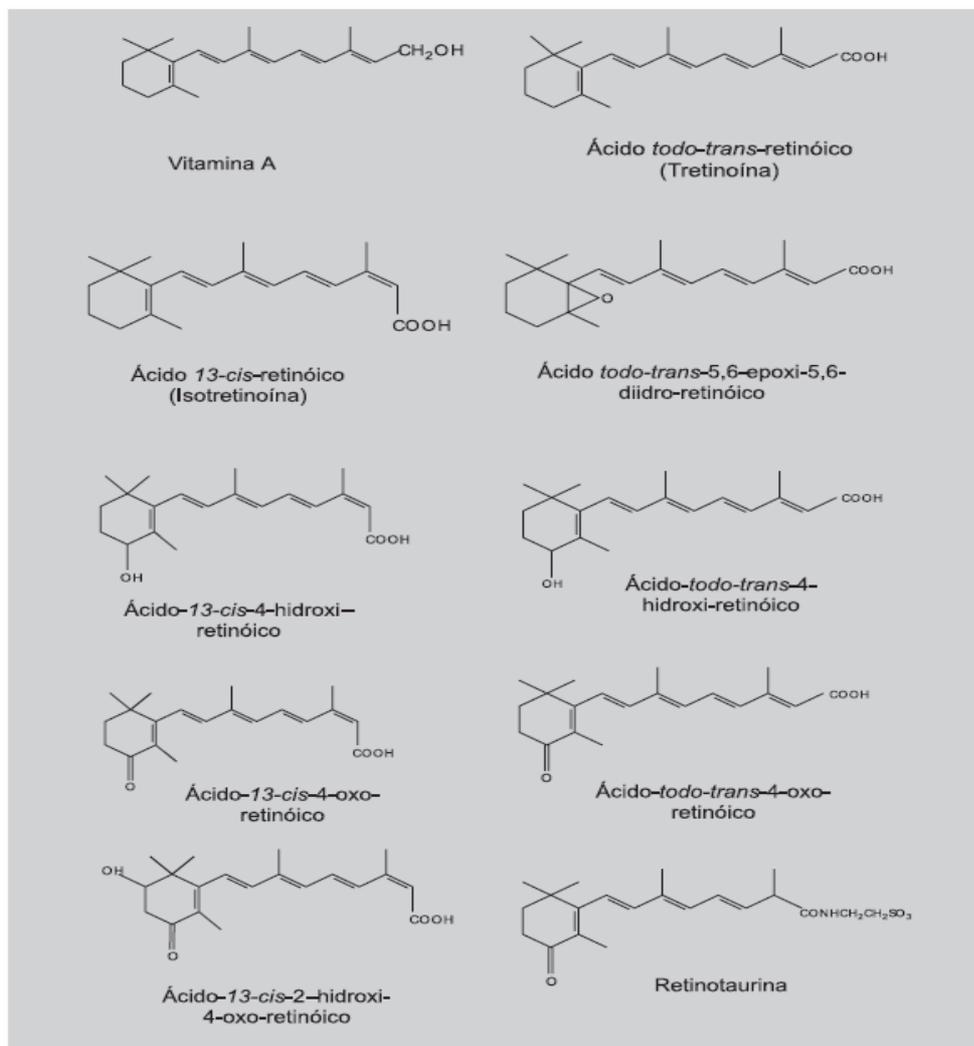


Figura 85 – Estruturas químicas dos derivados da vitamina A, incluindo a isotretinoína, o isômero tretinoína e demais produtos de degradação (DINIZ *et al*, 2002).

1.6.1. Mecanismo de Ação

A variedade biológica dos efeitos dos retinóides são o resultado de sua profunda ação na transcrição do DNA (ELLIS e KRACH, 2001).

Os receptores envolvidos no mecanismo de ação dos retinóides até hoje estudados são:

- CRABR: receptor celular ligante do ácido retinóico (cellular retinoic acid binding receptor)
- RARs: receptores do ácido retinóico (retinoic acid receptors)
- RXRs: receptores x retinóicos (retinoid X receptores)

Tanto a tretinoína, quanto a isotretinoína têm alta afinidade pelos receptores RARs e CRABR durante o transporte celular (PERSHING *et al*, 2003; LOWENSTEIN, 2002).

Autores propuseram que a isotretinoína tópica teria efeitos diferentes dos de quando administrada oralmente. Na formulação tópica a isotretinoína não reduz a secreção sebácea. De certa forma, age similarmente à tretinoína tópica, mas causa menor irritação a pele (CHALKER *et al*, 1987; HUGHES *et al*, 1992).

1.6.2. Indicações

A Isotretinoína é empregada particularmente no tratamento da acne cística e nodular e como inibidor da proliferação de células neoplásicas (SAURAT, 1997; SHALITA, 2004).

Também demonstra grande eficiência terapêutica relacionada à indução e controle da diferenciação epitelial nos tecidos secretores de muco ou queratinizantes; à produção de prostaglandina, de colágeno, de precursores da queratina (como os tonofilamentos e tonofibrilas) e ao controle da proliferação de *Propionibacterium acne*. Uma vez que o desenvolvimento das glândulas sebáceas e a exacerbação de sua atividade secretora são fatores essenciais para a ocorrência de lesão inflamatória associada à acne, o bloqueio na produção de sebo provocado pela isotretinoína constitui fator determinante de sua atividade farmacológica no tratamento desta afecção (ALLEN e BLOXHAM, 1989; FONSECA e PRISTA 1993; SAURAT, 1997; AHFS-DRUG INFORMATION, 1998; OMS, 1999; DRUGDEX, 2001).

Retinóides tópicos são efetivos no tratamento e reversão de danos cutâneos provocados pela exposição crônica ao sol (PIRARD *et al*, 1999; GILCHREST, 1992). Também são efetivos na diminuição do número de queratoses actínicas premalígnas com o mínimo de toxicidade (ODOM, 1998) e possuem indicação tópica para o tratamento de psoríase pustular (ELLIS e KRACH, 2001).

1.6.3. Efeitos Colaterais da Isotretinoína

A maioria dos efeitos adversos da isotretinoína quando administrada oralmente estão relacionados com a pele, membranas mucosas, sistema músculo-esquelético, sistema nervoso, sistemas hematopoiético e linfático, gastrointestinal, cardiorrespiratório e geniturinário (BIGBY e STERN, 1988; LEBOWITZ e BERSON, 1988).

Quando administrada no primeiro trimestre gestacional os efeitos teratogênicos apresentados pelo uso da isotretinoína tornam-se um fator limitante para o seu uso (ELLIS e KRACH, 2001). Retinóides de uso tópico não são recomendados para uso em gestantes, no entanto, estudos farmacológicos sugerem que a absorção per cutânea das aplicações tópicas nas terapias antiacne não alcançam a circulação sistêmica, sendo sua absorção mínima somente com efeito local (JOHNSON, 1997; GOLLNICK *et al*, 2003).

1.6.4. Estabilidade da Isotretinoína

A isotretinoína (figura 11) é uma substância muito alterável pela luz e pelo oxigênio. Sua manipulação é muito delicada e as amostras devem ser preparadas imediatamente antes de serem utilizadas (SANTANA, 1992).

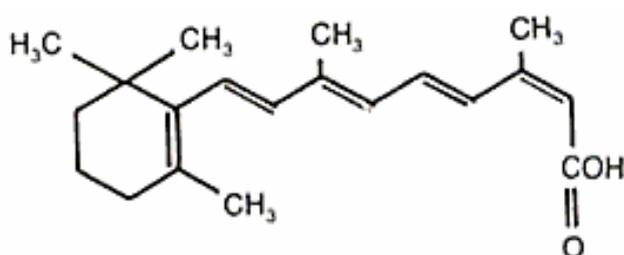


Figura 86 – Estrutura química da Isotretinoína (ácido 13-*cis*-retinóico).

Sob condições desfavoráveis, este fármaco sofre isomerização em tretinoína (figura 12) e demais produtos de degradação. Sua degradação depende majoritariamente de dois fatores: luminosidade e oxigênio (SANTANA, 1992).

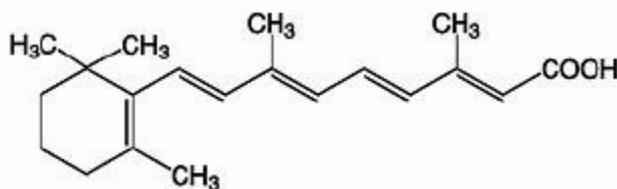


Figura 87 – Estrutura química da Tretinoína (ácido 13-*trans*-retinóico).

No estado sólido, quando armazenada protegida da luz e em temperatura de -20°C , sua estabilidade é satisfatória. Mas quando em solução, nas mesmas condições, a isomerização em tretinoína e geração de outros produtos de degradação é praticamente imediata (SANTANA, 1992).

Pesquisadores têm desenvolvido modificações farmacotécnicas para a isotretinoína de forma a melhorar a sua solubilidade e diminuir a instabilidade da dessa molécula, seja por meio de formação de complexos com ciclodextrinas, ou por inclusão em vesículas carreadoras (YAP *et al*, 2005; YOELE *et al*, 2005). Dessa forma a isotretinoína poderia ser posteriormente veiculada e administrada terapêuticamente (LIN *et al*, 2007).

No entanto, não foi encontrado na literatura nenhum trabalho que explore o potencial de inclusão do sistema vesicular e do complexo fármaco - ciclodextrinas em associação, com o intuito de aumentar a quantidade de fármaco carreado, e posteriormente a reduzir a dose a ser administrada. O sistema assim obtido possivelmente promoveria alteração na solubilidade do fármaco, estabilidade da molécula e principalmente incremento na renda da produção em escala industrial.

1.7. MÉTODOS UTILIZADOS PARA A CARACTERIZAÇÃO DE MICRO E NANOSSISTEMAS CARREADORES DE FÁRMACOS

1.7.1. Determinação de Tamanho por Espalhamento de Luz

Esse método de mede a intensidade de espalhamento de luz incidida sobre as partículas através de um feixe de *laser* e é influenciado pelo movimento Browniano. O índice de Polidispersão (Pdl) indica a proporção de estruturas em diferentes tamanhos, populações e volume (GIRIGOSWAMI, 2006).

1.7.2. Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE)

A técnica de RPE é utilizada para monitorar a dinâmica molecular de lipídeos, determinando a fluidez e mudanças estruturais da bicamada lipídica de lipossomas. Biomoléculas, como a fosfatidilcolina e o colesterol, que não possuem elétrons desemparelhados, podem ser estudados por RPE quando quimicamente ligadas a um radical livre estável, como o nitróxido. Essas biomoléculas marcadas com o nitróxido são denominadas marcadores de spin (CODERCH *et al*, 2000; SUKOWSKI *et al*, 2006).

Esses radicais livres ou marcadores de spin produzem um espectro de RPE que fornece informações sobre o ambiente molecular do marcador. Os marcadores mais indicados para as análises de EPR para vesículas lipossomais e niossomais são: o 5-doxil-estearato (5-DSA) e o TEMPO (2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxil) (figuras 13 e 14).

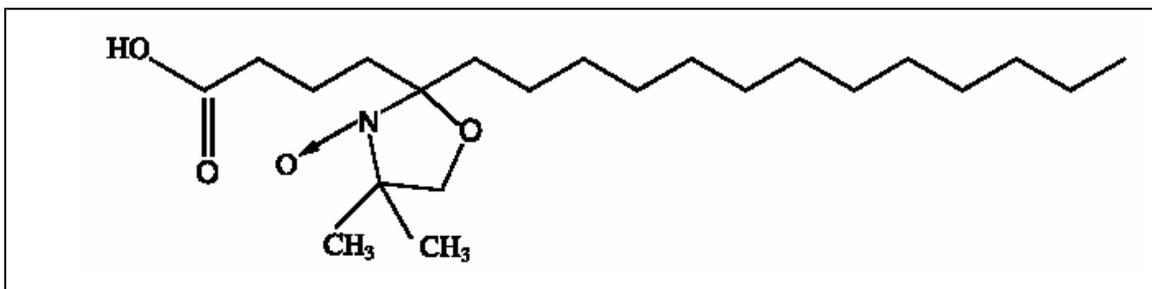


Figura 88 - Estrutura química do marcador de spin 5-doxil-estearato.

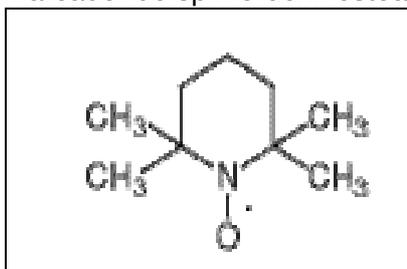


Figura 89 - Estrutura química do marcador de spin TEMPO (2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxil).

O marcador 5-DSA se insere na membrana refletindo sua dinâmica molecular e o marcador TEMPO, sendo uma molécula anfifílica, particiona entre a membrana e a região aquosa da amostra; nestes casos é possível obter o coeficiente de partição do marcador e os coeficientes de sua difusão rotacional no interior da membrana e na fase aquosa. Em geral, quando a membrana se torna mais fluida, a partição do marcador, assim como sua taxa de difusão na fase hidrocarbônica, aumenta (ALONSO, 2005).

1.8. ESTUDO DE LIBERAÇÃO IN VITRO

A utilização dos lipossomas, como sistemas carreadores de fármacos capazes de modificar a velocidade de liberação de fármacos na pele, tem sido investigada (SINICO, 2003). Esses estudos incluem a passagem de fármaco por membranas de silicone (SINICO *et al*, 2003), membranas de acetato de vinila (Coltran®) (BABU e PANDIT, 2005) ou ainda pela pele humana (ANSARI *et al*, 2006), sendo que para fármacos lipossolúveis foram utilizados meios de dissolução hidroalcoólicos (SINICO *et al*, 2003). Foi também demonstrado por ANJOS (2007) que a concentração de 10% de etanol em tampão não modifica a estrutura do estrado córneo.

O FDA (Food and Drug Administration), no Guia para Indústria – Produtos para Aplicação Dermatológica e Tópica (1998), permite a utilização de até 10% de etanol em meios de dissolução para testes de biodisponibilidade e bioequivalência para fármacos com baixa solubilidade no meio aquoso.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi desenvolver niossomas como sistema carreador para o transporte e liberação da isotretinoína com potencial para aplicação na terapêutica tópica da acne.

Objetivos específicos

- Avaliar os sistemas propostos e caracterizá-los físico-quimicamente, através de DLLS (*Dinamic Laser Light Scattering*), microscopia óptica, microscopia de fluorescência e espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (RPE).
- Determinar a eficiência de encapsulação do fármaco nos sistemas utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).
- Estudar a liberação do fármaco a partir dos sistemas propostos através de membranas semipermeáveis e de estrato córneo.

3. MATERIAIS

3.1. EQUIPAMENTOS

- Balança Analítica AG 200 - Gehaka
- Agitador Magnético TE 085 – Tecnal
- Agitador tipo vortex AP 56 – Phoenix
- Lavadora Ultrasônica USC1400 – Unique
- Centrífuga 3-18K – Sigma
- pHmetro PG 1000 – Gehaka
- Microscópio Óptico acoplado a câmera digital CCD - Leica
- Dissolutor VK 7000 com aparato “Enhancer Cell” - Varian
- Microscópio Invertido de Fluorescência CTR 4000, acoplado a câmera digital CCD - Leica
- Zetasizer Nano S ZEN 1600 – Malvern
- Cromatógrafo líquido ProStar 210 e detector UV/VIS 336 - Varian.
- Cromatógrafo líquido ProStar 240 com injetor automático 410 e detector UV/VIS 336 - Varian.
- Cromatógrafo líquido acoplado a detectores de massas 1200L triplo quádruplo - Varian
- Espectrômetro de EPR, modelo ESP 300 com cavidade ressonante ER 4102 ST, operando em banda X (9,4 GHz) - Bruker

3.2. SUBSTÂNCIAS E REAGENTES

- Lauril éter (4) Polioxietileno (Brij® 30) (Sigma – Aldrich)
- Lauril éter (23) polioxietileno (Brij® 35) (Sigma – Aldrich)
- Colesterol (Sigma – Aldrich)
- Dicetilfosfato (DCP) (Sigma – Aldrich)
- Fosfatidilcolina (Lipoid GMB)
- 2-hidroxiopropil-β-ciclodextrina (HPβCD) (Roquette LTDA)
- Isotretinoína (Sigma - Aldrich)
- Isotrex® (Lab. Stiefel)
- Membrana Cotran™ 9715 (3M™)
- Membrana Cotran™ 9728 (3M™)
- Membrana estrato córneo de camundongos recém natos
- Marcador de fluorescência PKH26 (Sigma-Aldrich)
- Demais reagentes de grau analítico ou superior

3.2.1. Brij® 30

Possui como denominação química “lauril éter (4) de polioxietileno” podendo ser apresentado com seu sinônimo químico “dodecil éter de polietilenoglicol” (figura 15). É um tensoativo não-iônico formado por uma cadeia carbônica com 20 carbonos, de peso molecular igual a 362 g/mol. É um líquido viscoso com densidade igual a 0,95 g/ml e índice de refração 1,451 (20°C) e EHL (Equilíbrio Hidrófilo Lipófilo) 9. Sua concentração micelar crítica (CMC) é de 4 μM (HAIT e MOULIK, 2001).

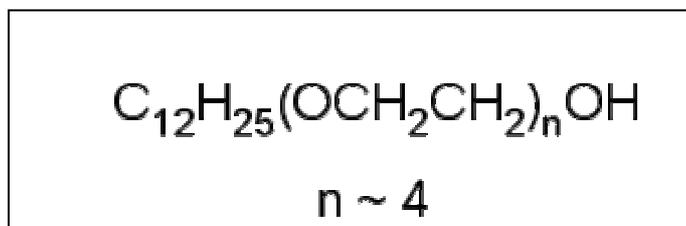


Figura 90 - Estrutura química do Brij 30 – Lauril éter (4) de polioxietileno.

3.2.2. Brij® 35

Tensoativo não iônico, denominado quimicamente como “lauril éter (23) de polioxietileno” (figura 16). Possui peso molecular de 1198 g/mol, concentração micelar crítica igual a 91 µM e EHL 17 (SIGMA-ALDRICH, 2006).

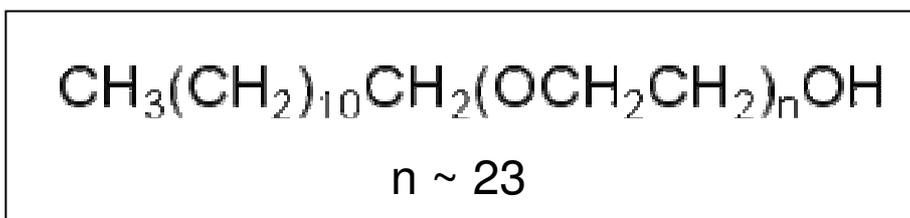


Figura 91 - Estrutura química do Brij 35 - Lauril éter (23) de polioxietileno.

3.2.3. Colesterol

O colesterol (figura 17) é um esteróide, sendo muito utilizado na formação de lipossomas.

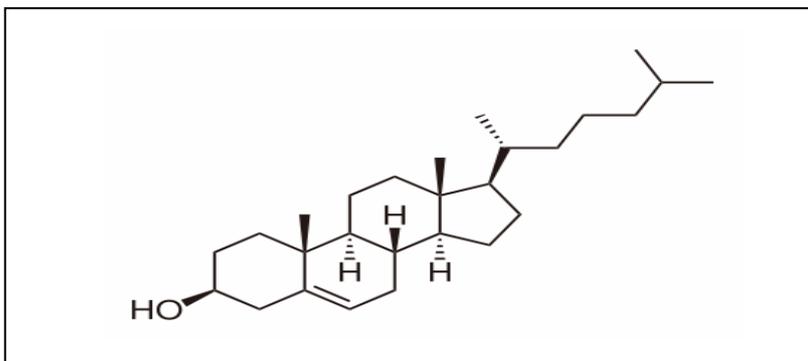


Figura 92 - Estrutura química do colesterol.

É responsável por melhorar as características de empacotamento da membrana (WEINER *et al*, 1989). Tanto no estado “gel” da membrana (ligações C-C na conformação “*toda-trans*”), quanto no estado “cristal-líquido” (com ligações C-C na conformação “*trans*” ou “*gauche*”) o colesterol aumenta a rigidez da membrana, anulando a transição de fase, e mantendo a membrana no estado de fluidez intermediária, reduzindo assim a sua permeabilidade (DEMICHELI *et al*, 2005).

3.2.4. Dicetil Fosfato (DCP)

Denominado como “Dicetil fosfato” (figura 18) é um tensoativo composto por um grupamento fosfato, e age como um indutor de carga, doando característica fracamente negativa à membrana, impedindo que haja agregação das vesículas (MANCONI *et al*, 2002).

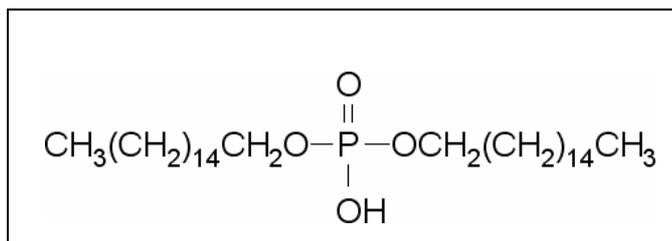


Figura 93 - Estrutura química do DCP – dicetil fosfato.

3.2.5. Fosfatidilcolina (PC)

A fosfatidilcolina de escolha para esse estudo foi a de soja (figura 19), composta por uma mistura de cadeia de ácidos graxos saturados:

- 17% de Acido Palmítico;
- 6% de Acido Esteárico;
- 13% Acido Oléico;
- 59% Acido Linoleico;
- 5% Acido Linolênico.

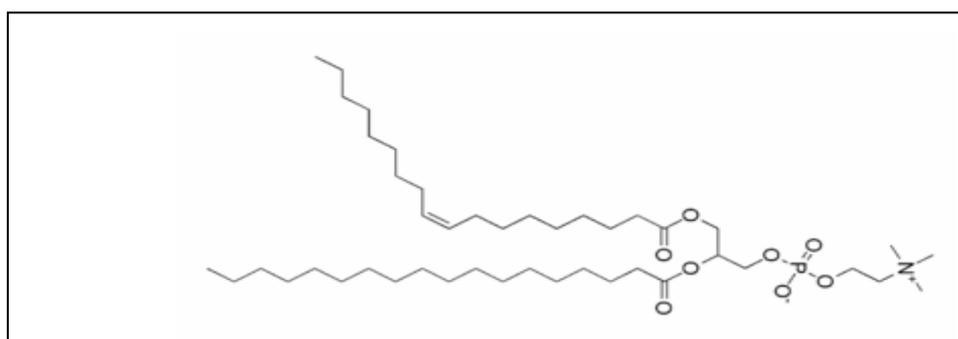


Figura 94 - Estrutura química do fosfatidilcolina (PC).

3.2.6. Membrana Cotran™ 9715 (3M™)

A membrana é constituída de acetato de vinila (EVA) de espessura controlada e uniforme, lipofílica e translúcida, comumente utilizada na fabricação de medicamentos transdérmicos, sendo suas especificações:

- Espessura: 76,2 μm ;
- Conteúdo de acetato de vinila: 19%;
- Medida da transmissão do vapor de umidade: 64,8 g/ m^2 / 24h

3.2.7. Membrana Cotran™ 9728 (3M™)

A membrana é constituída de acetato de vinila (EVA) de espessura controlada e uniforme, lipofílica e translúcida, comumente utilizada na fabricação de medicamentos transdérmicos, sendo suas especificações:

- Espessura: 50,8 μm ;
- Conteúdo de acetato de vinila: 19%;
- Medida da transmissão do vapor de umidade: 97,2 g/ m^2 / 24h.

4. MÉTODOS

4.1. DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO QUANTITATIVO DE ANÁLISE DA ISOTRETINOÍNA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

O método cromatográfico utilizado para quantificar a isotretinoína ao longo deste trabalho foi desenvolvido em cromatógrafo líquido modelo ProStar 240, com injetor automático 410 e detector UV/VIS 336 – Varian; e partiu do método descrito por Tan e colaboradores (1993) (tabela 01), seguido de vários procedimentos para sua otimização conforme detalhado a seguir.

Tabela 03 – Parâmetros iniciais para o desenvolvimento do método cromatográfico por CLAE.

Parâmetros	Especificações
Coluna	Cromospher C18 250 mm x 4,6 mm Varian
Fluxo	1,0 ml/min
Detector	UV
Comprimento de Onda	342 nm
Fase Móvel	Acetonitrila : Acetato de Amônio 1%

4.1.1. Otimização do Método

Durante a otimização do método, vários parâmetros foram alterados para buscar a redução do tempo de corrida e/ou melhorar a separação da isotretinoína de seu principal produto de degradação (tretinoína). Os parâmetros alterados foram: a fase estacionária, pH e composição da fase móvel, e temperatura da coluna (tabela 02).

Tabela 02 - Otimização do método cromatográfico inicial.

Parâmetros	Variações do método no processo de otimização									
	01		02		03		04		05	
Coluna	Microsorb	MV	Microsorb	MV	Microsorb	MV	Microsorb	MV	Microsorb	MV
	100-5	C8	100-5	C8	100-5	C8	100-5	C8	100-5	C8
	250		250		250		250		250	
	mm x 4,6	mm	mm x 4,6	mm	mm x 4,6	mm	mm x 4,6	mm	mm x 4,6	mm
	Varian		Varian		Varian		Varian		Varian	
Fluxo	1,0 ml / min		1,0 ml / min		0,7, 0,8, 0,9 e 1,0 ml / min		1,0 ml / min		1,0 ml / min	
Detector	UV		UV		UV		UV		UV	
Compr. Onda	342 nm		342 nm		342 nm		342 nm		342 nm	
Fase Móvel	acetoneitrila : acetato de amônio 1%		acetoneitrila : metanol : acetato de		acetoneitrila : acetato de amônio 1%		acetoneitrila : acetato de amônio 1%		acetoneitrila : acetato de amônio 1%	

	(95:5)	amônio 1% (80:15:5)	(95:5)	(95:5) – acidificado com 4,5% ácido acético glacial	(95:5)
Faixa de pH da coluna	2,0 a 8,0	2,0 a 8,0	2,0 a 8,0	2,0 a 8,0	2,0 a 8,0
pH da fase móvel	8,0	8,0	8,0	6,8	8,0
Temperatura	25°C (ambiente)	25°C (ambiente)	25°C (ambiente)	25°C (ambiente)	60°C; 45°C.

4.1.2. Curva de Calibração da Isotretinoína

Para a determinação da curva de calibração foram feitas diluições seriadas a partir de uma solução-mãe de 100 µg/ml, sendo escolhidas as seguintes concentrações dos demais pontos para construção da curva: 50 µg/ml, 25 µg/ml, 12,5 µg/ml, 6,25 µg/ml, 3,12 µg/ml e 1,56 µg/ml.

Tanto a solução-mãe quanto as demais diluições foram feitas com metanol em balão volumétrico de 10 ml protegido da luz (âmbar), obedecendo para tanto os critérios analíticos.

4.1.3. Perfil cromatográfico da tretinoína (principal isômero)

Para a elucidação do tempo de retenção e perfeita separação entre os picos da isotretinoína e da tretinoína, foi necessária a injeção de concentração conhecida de tretinoína nas condições cromatográficas estabelecidas após a otimização do método (vide item 5.1.2.) Para tanto, foi preparada uma solução de 50 µg/ml de tretinoína em balão volumétrico âmbar de 10 ml com metanol.

4.2. VALIDAÇÃO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO POR CLAE

A validação do método desenvolvido seguiu os critérios estabelecidos pelo Guia de Validação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) – Resolução - RE nº. 899, de 29 de maio de 2003 e Guia ICH Q2 (R1).

Primeiramente foram definidos os limites de quantificação e de detecção, a partir de diluições sucessivas em metanol a partir da concentração de 20 µg/ml, feitas em balão volumétrico âmbar de 10 ml, até a concentração de 0,0936 µg/ml.

Para a determinação da seletividade, especificidade e sensibilidade do método foram injetadas em diferentes momentos: branco (metanol), amostra (isotretinoína padrão) na concentração de 50 µg/ml, interferente (tretinoína padrão) na concentração de 50µg/ml, e a mistura de amostra e interferente (isotretinoína e tretinoína) em concentrações iguais (50µg/ml). Segundo o guia de validação, o método deve ser capaz de separar e o pico do interferente quando presente com área 20% menor que a área do pico da amostra.

Por conseguinte as análises foram novamente executadas em dias alternados e com outro pesquisador de forma a garantir a repetibilidade e reprodutibilidade do método desenvolvido, determinando para tanto a precisão interdia e intradia. As concentrações de 72 µg /ml, 20 µg/ml e 0,3 µg/ml, diluídas em metanol e preparadas em balões volumétricos âmbar de 10 ml, foram utilizadas como controle de qualidade alto, médio e baixo sucessivamente.

A concentração de 50 µg/ml de isotretinoína, diluída em metanol e preparada em balão volumétrico âmbar de 10 ml, foi injetada no cromatógrafo para a comprovação da robustez. O aparelho foi trocado do cromatógrafo Varian ProStar com injetor automático (modelo 410) e bomba composta de 03 módulos de pressão (modelo 240), para uma cromatógrafo com injeção manual Varian ProStar, e bomba com somente 01 módulo de pressão (modelo 210). Ambos os aparelhos acoplados a detector de UV/VIS. Os demais parâmetros foram mantidos.

4.3. PREPARO DAS VESÍCULAS DE LIPOSSOMAS E NIOSSOMAS

Os niossomas foram preparados por hidratação do filme lipídico seco contendo o fármaco em várias concentrações molares, de forma a definir qual seria

a de maior eficiência de incorporação. Para tanto, as concentrações de 2,5 mM, 5 mM, 10 mM e 20 mM de isotretinoína foram testadas.

Os niossomas foram preparados utilizando a razão molar de 50:25:10 (Brij 30: Colesterol: DCP), os quais foram pesados e colocados em um balão de fundo redondo, sendo posteriormente dissolvidos em clorofórmio. A isotretinoína, quando presente, também foi acrescida nesta fase. Posteriormente o solvente foi evaporado sob atmosfera de nitrogênio para a formação de filme lipídico na superfície interna do balão. O balão permaneceu em freezer a -20°C por 24 horas para garantir a completa remoção do resíduo do solvente orgânico.

O filme lipídico formado foi então hidratado com 2 ml tampão fosfato pH 7,4 por 1 hora e depois o balão foi levado ao agitador tipo vórtex por 2 minutos. Sob agitação, o filme lipídico se despreendeu das paredes do balão, e niossomas multilamelares (MLV) foram formados (figura 20).

A amostra foi posteriormente transferida para tubo falcon protegido da luz, e levado à centrifugação por 2 minutos a 2.000 rpm, para a remoção do fármaco não encapsulado, que é precipitado. Os controles da velocidade e do tempo de centrifugação foram necessários para garantir que as MLV não fossem precipitadas, mas somente os cristais de fármaco insolúveis.

Para a confirmação dos parâmetros de centrifugação, 2 ml de amostra foram centrifugados em tubo falcon, e alíquotas foram retiradas em duas porções utilizando micropipetador com ponteira. A 1ª alíquota (500 µl) foi retirada da porção superior; na 2ª análise, a alíquota retirada foi próxima ao botão no fundo do tubo falcon.

Após a centrifugação 50 µl do sobrenadante foi retirado e misturado a 950 µl de metanol para o rompimento das vesículas, promovendo desta forma a completa liberação do fármaco no meio hidroalcoólico circundante. A amostra foi filtrada em membrana de 0,45 µm, e posteriormente injetada no cromatógrafo líquido.

Lipossomas constituídos de fosfatidilcolina 10 mM foram preparados para testes de comparação físico-química com os niossomas propostos. A fosfatidilcolina (PC) foi dissolvida com clorofórmio. O restante da técnica foi igual à do preparo dos niossomas.

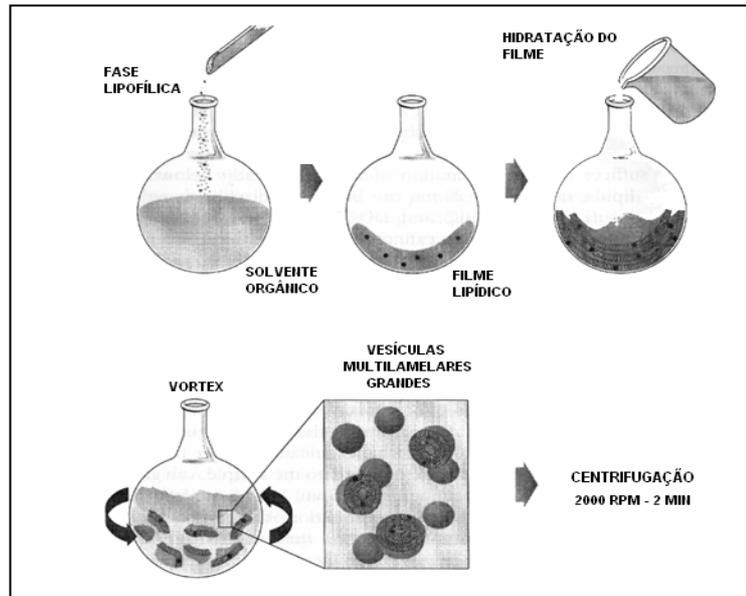


Figura 95 - Metodologia de preparo de niossomas multilamelares. Fonte: www.avantilipids.com - Adaptado.

4.4. PREPARO DO COMPLEXO HP β CD-ISOTRETINOÍNA

O complexo de inclusão da isotretinoína em ciclodextrinas foi obtido em solução tampão fosfato pH 7,4. As proporções de HP β CDs:Isotretinoína testadas foram 0,5:1, 1:1, 1,5:1, 2:1, 10:1, 20:1, 30:1, 40:1, 50:1 e 60:1 de forma a verificar o maior rendimento do complexo formado. Todas as amostras foram preparadas em 2 ml de tampão fosfato pH 7,4, por ser o meio para hidratação durante o preparo dos niossomas.

A isotretinoína e as HP β CDs foram pesadas e transferidas para vidro âmbar. O tampão fosfato pH 7,4 foi acrescentado e a suspensão foi submetida a agitação em agitador magnético por 8 dias a temperatura ambiente. A suspensão resultante foi filtrada em membrana de 0,45 μ m para obtenção de uma solução clara (figura 21).



Figura 96 - Metodologia de preparação do complexo de inclusão HP β CD-isotretinoína.

A quantificação da isotretinoína no complexo de inclusão foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

4.5. PREPARAÇÃO DE NIOSSOMAS CONTENDO O COMPLEXO DE INCLUSÃO HP β CICLODEXTRINAS-ISOTRETINOÍNA

A quantidade de isotretinoína acrescida na formação do filme lipídico foi a de melhor resultado das 5 (cinco) concentrações inicialmente estudadas e descritas no item 4.3, determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Os niossomas foram preparados utilizando o método de hidratação do filme lipídico, conforme item 4.3. A diferença da metodologia empregada nesta preparação para a técnica descrita no item 4.3 está na hidratação do filme lipídico, efetuada com solução do complexo HP β CDs-Isotretinoína (figura 22).

O preparo do complexo HP β CDs-Isotretinoína foi feito conforme descrito no item 4.4. A razão molar de HP β CDs:Isotretinoína utilizada para a hidratação do filme lipídico também foi dependente da quantidade de isotretinoína complexada às HP β CDs. A melhor eficiência do complexo formado, determinada após os ensaios iniciais nas razões molares anteriormente descritas (0,5:1; 1:1; 1,5:1, 2:1, 10:1; 20:1; 30:1; 40:1; 50:1; 60:1) quando quantificadas por CLAE, foi utilizada para a inclusão nos niossomas.

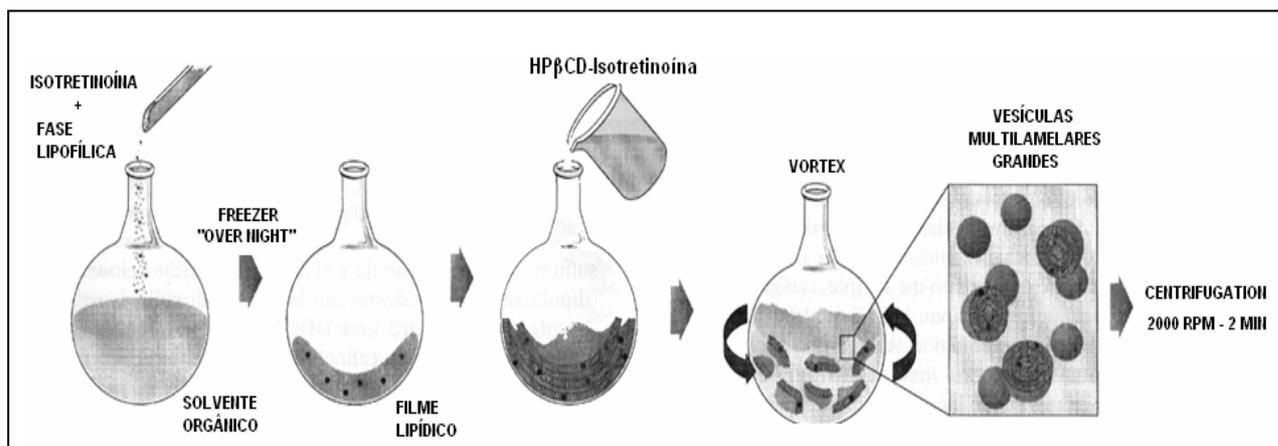


Figura 97 – Esquema de preparo de niossomas contendo isotretinoína e o complexo HP β CDs – isotretinoína. Fonte: www.avantilipids.com - Adaptado.

A fração de fármaco encapsulado foi determinada pelo método de CLAE, onde, após a centrifugação, 50 μ l do sobrenadante foram retirados e misturados a 950 μ l de metanol para o rompimento das vesículas, promovendo desta forma a

completa liberação do fármaco no meio hidroalcoólico circundante, que foi filtrado em 0,45 μm e depois injetado no cromatógrafo.

4.6. DETERMINAÇÃO DO TAMANHO POR ESPALHAMENTO DE LUZ

As amostras **contendo os niossomas** (1 ml) foram colocadas separadamente em cubetas de plástico e inseridas no aparelho. A leitura foi feita na temperatura ambiente (25°C). O método foi executado no aparelho Zetasizer® NanoS (Malvern™, UK) (figura 23).



Figura 98 - Zetasizer® Nano S da Malvern™.

4.7. MICROSCOPIA ÓPTICA

Para a execução deste método, uma gota de cada amostra contendo niossomas foi colocada em lâminas de vidro, e sobre cada lâmina colocada uma lamínula. As amostras então foram visualizadas em microscópio óptico Leica acoplado a câmera digital CCD em campo claro.

4.8. MICROSCOPIA ÓPTICA DE FLUORESCÊNCIA

As amostras de niossomas (100 μL) foram colocadas em tubos Ependorfs separados e identificados, e a eles foi acrescentado 1 μl de marcador de fluorescência PKH26 (Sigma-Aldrich). As amostras foram posteriormente agitadas em agitador tipo vórtex. Da mesma forma como descrito no item anterior, cada

amostra foi preparada sobre lâmina de vidro e observada em microscópio Invertido de Fluorescência CTR 4000 Leica acoplado a câmera digital CCD (figura 24).



Figura 99 – Microscópio Invertido de Fluorescência – Laboratório de Tecnologia Farmacêutica - UFG.

4.9. RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA (RPE)

O método foi executado em espectrômetro de EPR marca Bruker, modelo ESP 300 com cavidade ressonante ER 4102 ST, operando em banda X (9,4 GHz) (figura 25).



Figura 100 – Espectrômetro de Ressonância Paramagnética Eletrônica. Fonte: 155.33.32.224/.../engineering/spectrometer.html

Para ambos os marcadores o método preparo segue como o seguinte: em tubo de ensaio foi colocado 1 μ l de solução estoque de marcador a 10 mM em etanol. Após seco o solvente, 50 μ l de amostra contendo as vesículas suspensas foram

acrescidos no tubo de ensaio inicial. A amostra foi agitada em agitador tipo vórtex por 1 minuto.

Uma pequena parte da amostra marcada foi introduzida em tubo capilar, que posteriormente foi fechado utilizando um maçarico e levado ao aparelho para as medidas de RPE.

4.10. LIBERAÇÃO *IN VITRO*

Foram utilizadas membranas Coltran® da 3M™, aplicáveis em ensaios de liberação *in vitro* para testes de formas farmacêuticas transdérmicas (BABU E PANDIT, 2005). Também foram utilizadas membranas de estrato córneo extraídas de camundongos neonatos, não tendo, portanto, pêlo algum. Os estratos córneos utilizados foram **preparados e** gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Antônio Alonso, do Instituto de Física da Universidade Federal de Goiás.

Os ensaios de permeação cutânea foram executados em dissolutor VK 7000 Varian com aparato “Enhancer Cell”, que são células de difusão desenvolvidas para testes de produtos de aplicação tópica (figuras 26).



Figura 101 - Célula de difusão “Enhancer Cell” utilizada para testes de liberação *in vitro* em dissolutor Varian – descrição do aparato.

O aparato é constituído por minicubas para testes com volume entre 100 - 200 ml, que são posicionadas em suportes para encaixe no aparelho dissolutor. As minipás são adequadas para as minicubas devido ao seu tamanho. O enhancer cell possui volume interno máximo de 5 ml, e as membranas colocadas tiveram diâmetro máximo de 28,8 mm (a), sendo que a superfície de contato entre amostra e meio receptor foi de 15 mm (b) (figura 27).

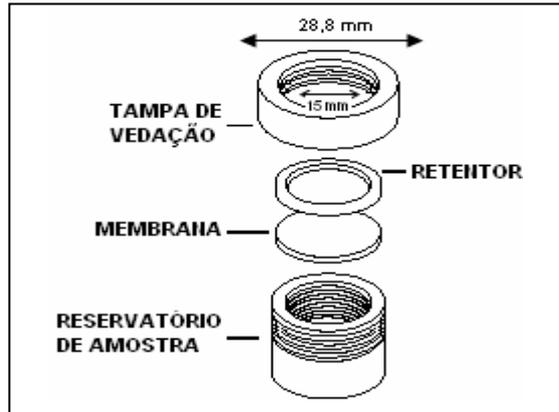


Figura 102 - Célula de difusão “Enhancer Cell” utilizada para testes de liberação in vitro em dissolutor Varian – desmontada.

Devido à distinção dos sistemas aqui testados, foi padronizada quantidade igual para todos eles. Um (1) g de amostra (niosomas-isotretinoína, HP β CDs-isotretinoína, niosomas-isotretionína + HP β CDS-isotretinoína, ou Isotrex[®]) foi colocado separadamente em receptores de amostras do “enhancer cell”. Sobre eles foram posicionadas as membranas, e posteriormente colocados o retentor e tampa de vedação para que não houvesse vazamentos. Foi utilizado 100 ml meio de dissolução (etanol 10% em água), a 37°C, com agitação a 100 rpm, e alíquotas de 1 ml do meio receptor foram retiradas nos tempos: 30, 60, 90, e 120 min (figura 28).

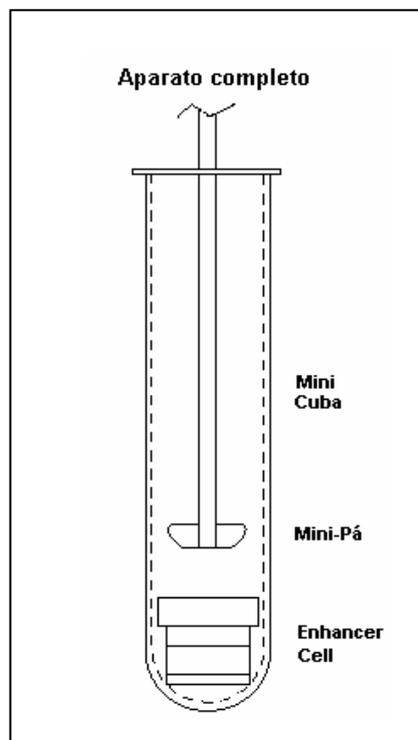


Figura 103 - Célula de difusão “Enhancer Cell” utilizada para testes de liberação in vitro em dissolutor Varian – aparato completo.

As análises foram feitas utilizando o Isotrex[®] (fórmula comercial de isotretinoína livre a 0,05% em gel alcoólico) como parâmetro de comparação para a

liberação dos sistemas propostos nas mesmas condições descritas para os sistemas testados.

4.10.1. Quantificação da isotretinoína nos ensaios de liberação *in vitro*

Para os ensaios de liberação, a metodologia analítica empregada para quantificar a isotretinoína no líquido receptor foi cromatografia líquida acoplada a detectores de massas utilizando o aparelho CLAE-EM-EM Varian com os seguintes parâmetros: coluna: Polaris RP 18 5µm 30 x 0,45 mm; ionização negativa ESI; detector 1600 watts; agulha 5000 watts; shield 600 watts; pressão do ar a 22 psi; gás seco; FM: acetonitrila: ácido Acético glacial 0,5% (70:30); fluxo: 0,3 ml/min; temperatura 30°C, método Scan.

4.10.2. Extração da isotretinoína do estrato córneo pós-ensaio de liberação *in vitro*

Este método foi desenvolvido com a finalidade de quantificar a isotretinoína que possivelmente possa ter sido retida no estrato córneo durante o ensaio de liberação *in vitro*.

Para tanto, após a finalização do ensaio descrito no item 4.10, a célula de difusão (enhancer cell) foi desmontada e a membrana retirada cuidadosamente com auxílio de pinça e espátula para ser lavada e ser isentada de residual de amostra. A membrana foi transferida para um tubo falcon, e 10 ml de água deionizada foram acrescentados. Este tubo foi agitado vigorosamente em agitador tipo vortex por 2 minutos. A membrana foi retirada e transferida para novo tubo falcon. Esse procedimento foi repetido 3 vezes.

Ao tubo falcon seco contendo a membrana já lavada foi acrescentado 1 ml de clorofórmio, que permaneceu em contato com a membrana sob agitação vigorosa e eventual por 1 hora. O tubo foi levado a centrífuga a 5000 rpm por 5 minutos, e o sobrenadante foi transferido para tubo de ensaio limpo e seco.

O clorofórmio foi evaporado sob atmosfera de nitrogênio até completa retirada do solvente e formação de filme residual na superfície do vidro do tubo de ensaio. A este tubo foi acrescentado 1 ml de metanol para solubilização do resíduo aderido a

superfície, que foi posteriormente filtrado a $0,45\mu\text{m}$ para ser analisado por CLAE (figura 29).

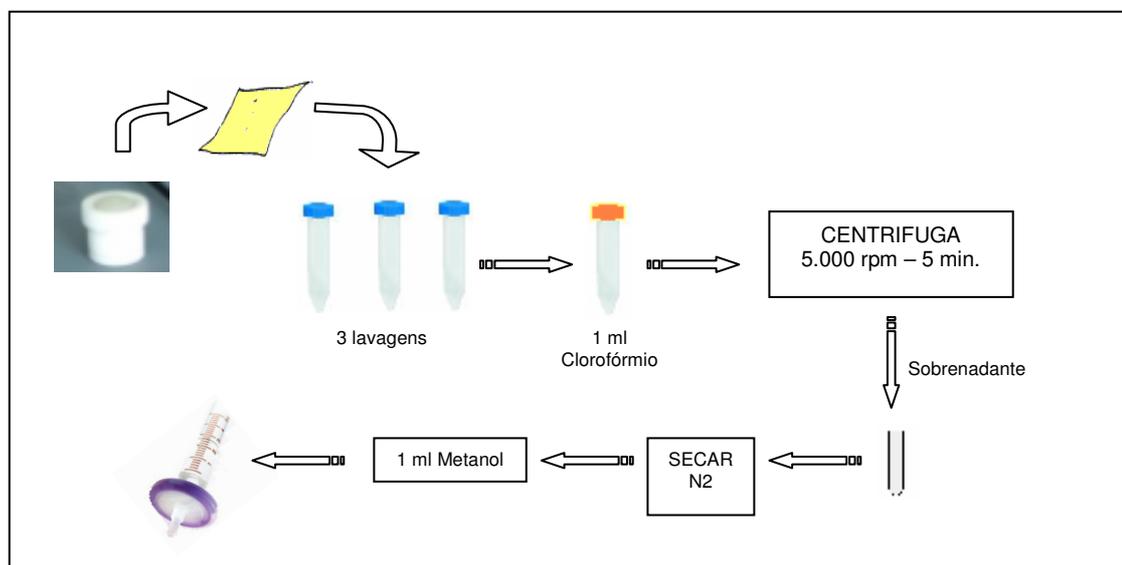


Figura 104 – Esquema que descreve o método de extração da isotretinoína do estrato córneo após o ensaio de liberação *in vitro*.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO POR CLAE

A cromatografia sempre representou a técnica analítica preferida para a análise dos retinóides e o CLAE tornou-se, paulatinamente, o método analítico predominante para a separação e quantificação dos retinóides, tanto em amostras biológicas quanto em formas farmacêuticas (LIMA *et al*, 2005). Muitos autores utilizam a análise cromatográfica por CLAE para determinação da isotretinoína e seus metabólitos, sendo mais comum a separação em fase reversa (tabela 3).

Tabela 3 - Exemplos de métodos cromatográficos para quantificação da isotretinoína por CLAE (LIMA *et al*, 2005.).

Sample origin	Pre-column	Stationary phase	Mobile phase (MP)	Detector
Drug	Used (not specified)	Hyperil [®] ODS C18 (4.6 × 15 cm)	Acetonitrile/ammonium acetate 1% (95:5)	UV λ = 280 nm
Drug	Not used	ZorbaxRx-Sil [®] (25 cm × 4.6 mm) 5 μm	Heptane/THF/acetic acid glacial (96.5:3.5:0.015)	UV λ = 365 EI mass 77 eV, 200 m/z
Plasma	Not used	Inertail SILICA [®] 100-105 (4.6 mm × 25 cm)	MPa: n-hexane/2-propanol/acetic acid glacial (1000:4.3:0.675) MPb: n-hexane/2-propanol/acetic acid glacial (1000:17.5:0.675)	UV λ = 350
Plasma	Not used	C18 5 μm (4.6 mm × 25 cm) da Alltech [®]	Methanol/0.1% ethanol e triethylamina (85:15)	UV λ = 245 nm
Pharmaceuticals	Lichrocart [®] (250 × 4 mm)	Lichrospher [®] 100 RP-185 μm	MPa: methanol/H ₂ O/acetic acid (75:12.5:1) MPb: acetonitrile/H ₂ O/acetic acid (80:20:1)	UV λ = 320-350 nm
Pharmaceuticals	Not used	Spherisorb ODS [®] 2 (250 × 4.6 mm)	Methanol/acetonitrile/acetic acid 0.05%(42.5:32.5:25)	UV λ = 360 nm

A partir dos cromatogramas obtidos com os parâmetros analíticos descritos por Tan e colaboradores (1993) foi possível calcular a resolução (Rs) e constatar a necessidade de otimização do método, pois o valor de Rs foi menor que 2,0, demonstrando que a separação foi parcial (figura 29).

$$R_s = \frac{2(T_{r2} - T_{r1})}{(L_1 + L_2)}$$

onde:

Rs = resolução

Tr = tempo de retenção

L = largura do pico

então:

$$R_s = \frac{2(10,196 - 7,768)}{2,4 + 1,1} = 1,38$$

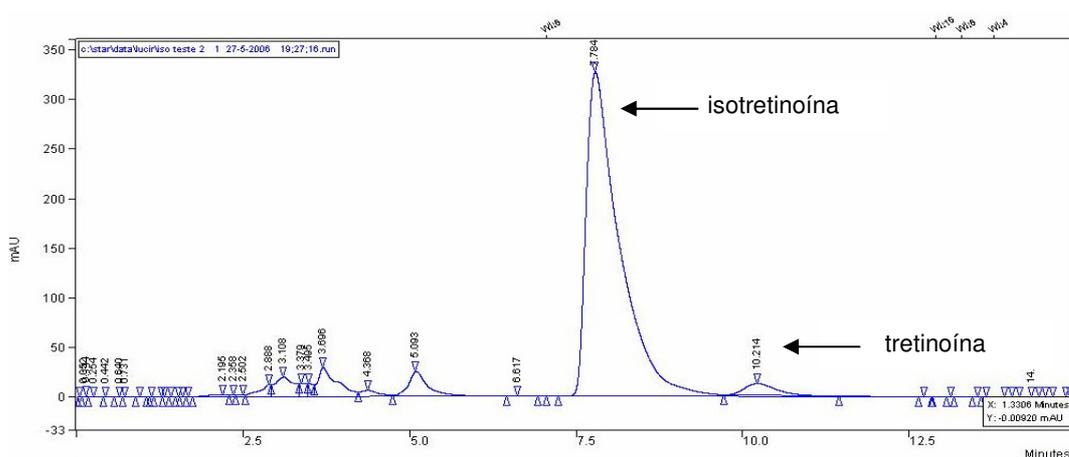


Figura 105 – Cromatograma de isotretinoína 50 µg/ ml por CLAE - FM: Acetonitrila: Acetato de Amônio 1% (95:5); Coluna Chromospher C18, fluxo 1,0 ml/min., 342 nm.

5.1.1. Otimização do Método Cromatográfico

Inicialmente houve a troca da coluna de C18 para uma coluna C8, a fim de melhorar a separação pelo aumento da afinidade do fármaco pela fase estacionária. Foi evidenciada uma melhora na separação dos picos da isotretinoína e seus isômeros (figura 30).

Em seguida houve a troca da fase móvel de Acetonitrila:Acetato de amônio 1% (95:5) para Acetonitrila:Metanol:Acetato Amônio 1% (80:15:5), numa tentativa de modificar a eluição da isotretinoína pela fase estacionária por mudança de polaridade da fase móvel (figura 31). Pequenas variações no fluxo (0,7, 0,8, 0,9 e 1,0 ml) também foram testadas, com a finalidade de melhorar a separação dos picos (figura 32). Numa tentativa de trabalhar com uma faixa de pH mais distante da faixa de pH limite da coluna (8,0), a fase móvel foi acidificada com 4,5% de ácido acético glacial até pH final igual a 6,8 (figura 33). No entanto, o resultado final não foi satisfatório para nenhuma dessas modificações.

Finalmente, foi alterada a temperatura da coluna para visualizar a influência na separação dos picos (fig. 34). No entanto, a melhor temperatura para separar os isômeros foi a ambiente (25°C).

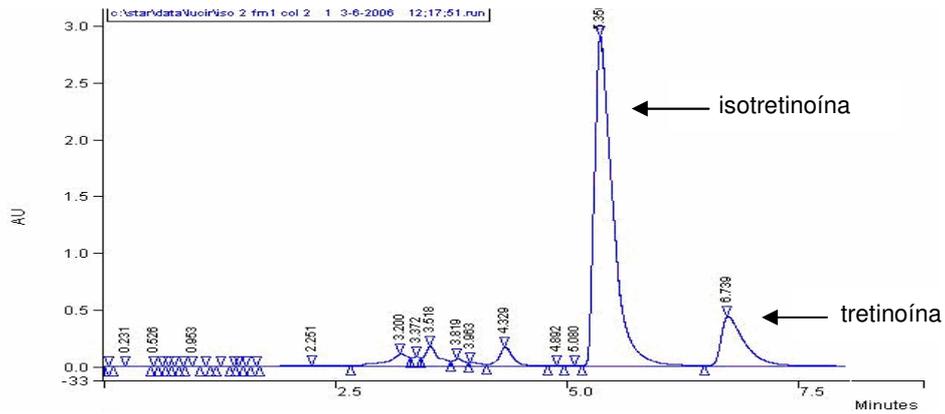


Figura 106 - Cromatograma de isotretinoína 12,5 µg/ ml por CLAE - FM: Acetonitrila: Acetato de Amônio 1% (95:5); Coluna Microsorb C8.

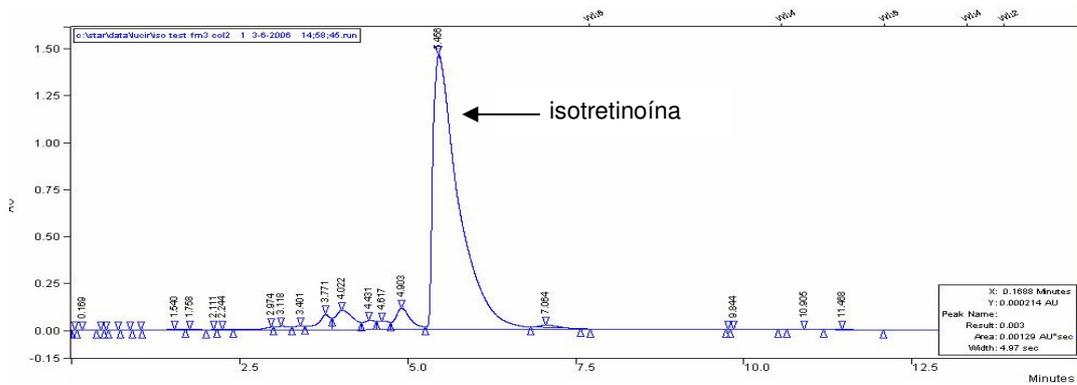
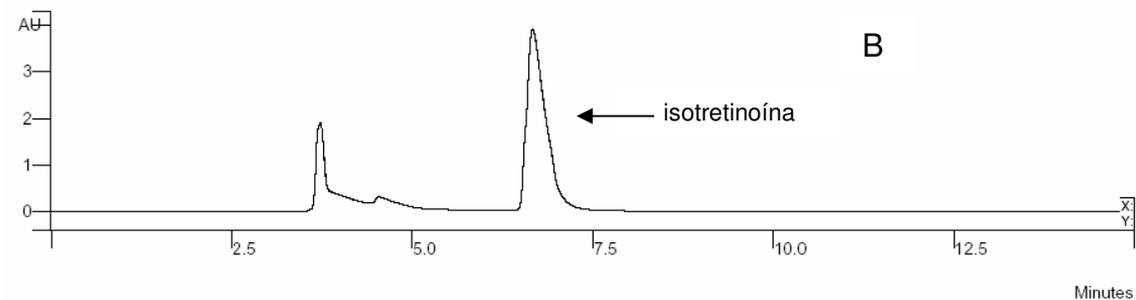
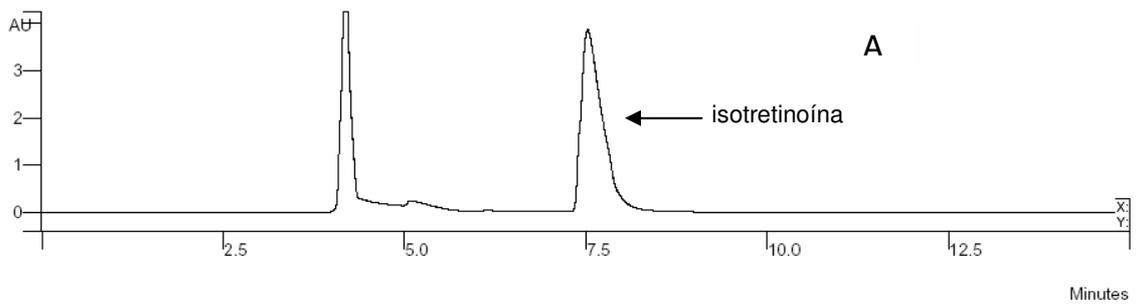


Figura 107 - Cromatograma de isotretinoína 12,5 µg/ ml por CLAE - FM: Acetonitrila : Metanol : Acetato de Amônio 1% (80: 15 : 5); Coluna Microsorb C8.



A

Minutes

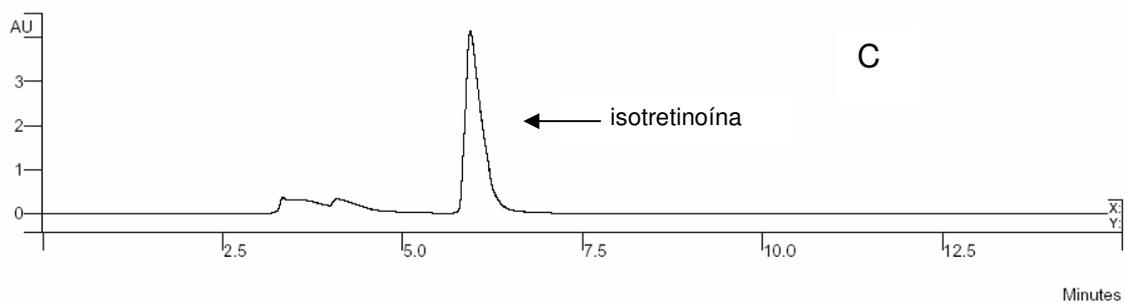


Figura 108 - Cromatograma de isotretinoína 12,5 µg/ ml por CLAE - FM: Acetonitrila : Metanol : Acetato de Amônio 1% (90:5); Coluna Microsorb C8 – A: fluxo 0,7 ml/min; B: 0,8 ml/min; C: 0,9 ml/min.

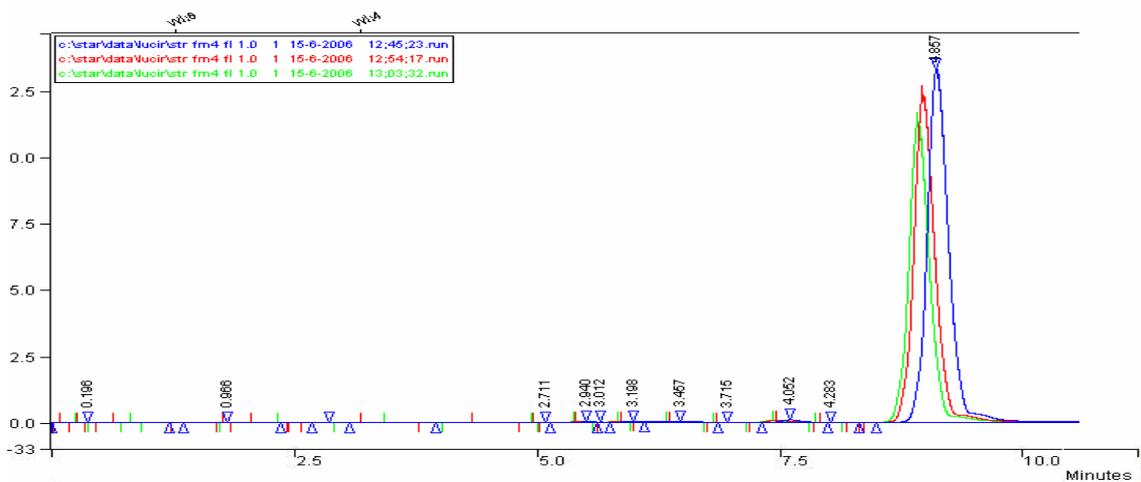


Figura 109 – Cromatograma de isotretinoína 12,5 µg/ ml em 3 injeções diferentes por CLAE - FM: Acetonitrila: Acetato de Amônio 1% (95:5) acidificado com ácido acético glacial para pH 6,8; Coluna Microsorb C8.

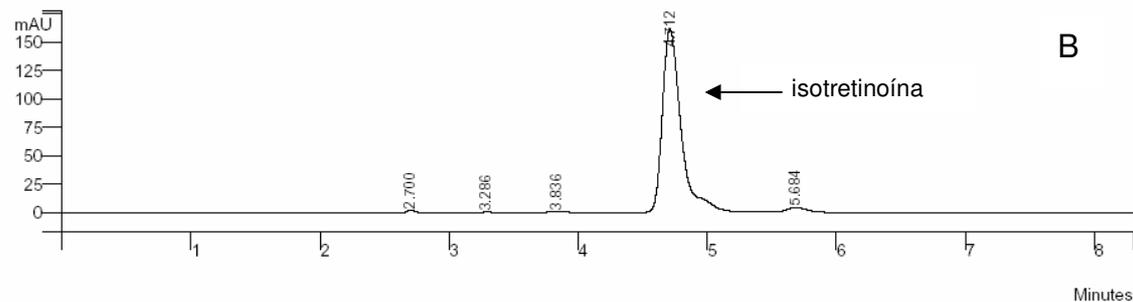
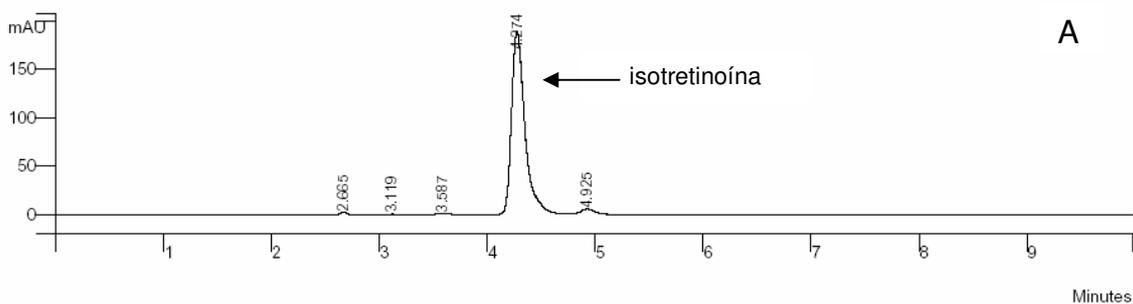


Figura 110 – Cromatograma de isotretinoína 25 µg/ ml por CLAE - FM: Acetonitrila : Acetato de Amônio 1% (95:5); Coluna Microsorb C8 – A: 60°C; B: 45°C.

5.1.2. Método Analítico Final

O método cromatográfico final desenvolvido para a determinação da eficiência de encapsulação da isotretinoína seguiu os seguintes parâmetros: coluna: Microsorb MV 100 5µm C8 (250 mm x 4,6 mm) – Varian; fluxo: 1,0 ml / min; detector: UV; comprimento de onda: 342 nm; fase móvel: acetonitrila : acetato de amônio 1% (95:5); faixa de pH da coluna: 2,0 a 8,0; pH da fase móvel: 8,0; temperatura: 25°C.

O método analítico final foi capaz de separar a isotretinoína da tretinoína (fig. 35).

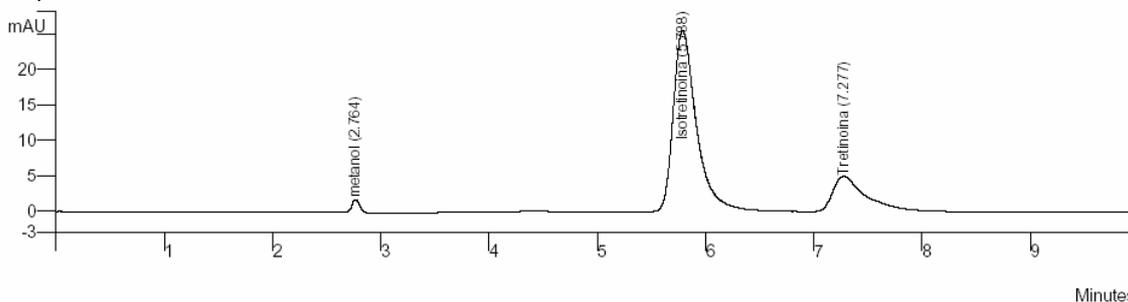


Figura 111 - Cromatograma de isotretinoína 12,5 µg/ ml por CLAE - Coluna Microsorb C8; FM: Acetonitrila: Acetato de Amônio 1% (95:5); Fluxo 1,0 ml/min; 342 nm – tempo de retenção da isotretinoína 5,78 min. - final.

5.2. VALIDAÇÃO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO POR CLAE:

5.2.1 Curva de Calibração (Linearidade)

A curva de calibração mostrou que o método é linear (figs.36 e 37).

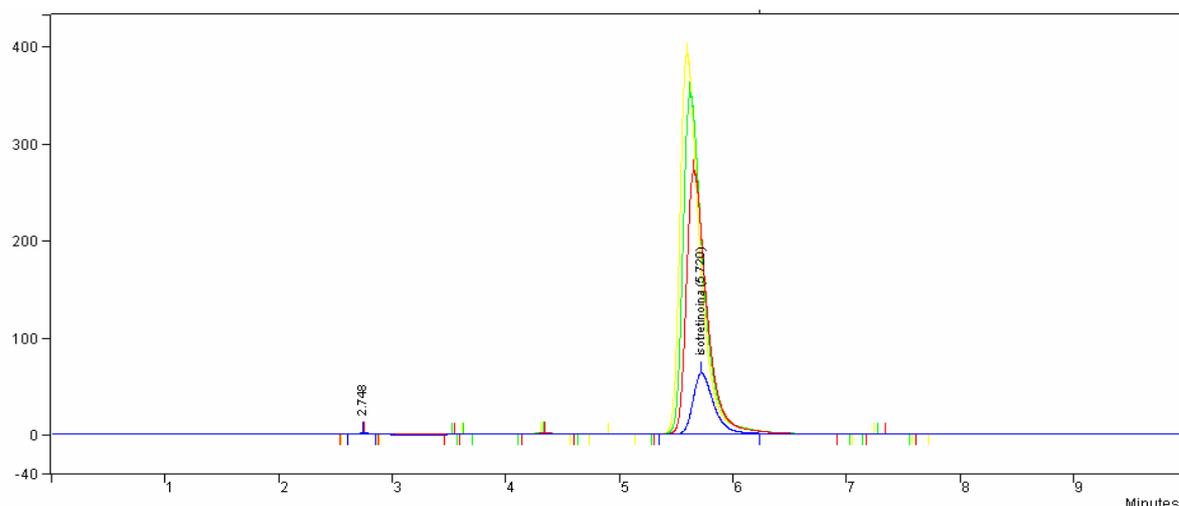


Figura 112 - Cromatograma da curva de calibração da isotretinoína por CLAE - Coluna Microsorb C8; FM: Acetonitrila: Acetato de Amônio 1% (95:5); Fluxo 1,0 ml/min; 342 nm – tempo de retenção da isotretinoína 5,78 min (amarelo: 50 µg/ml, verde: 25 µg/ml, vermelho: 12,5 µg/ml; azul: 3,125 µg/ml).

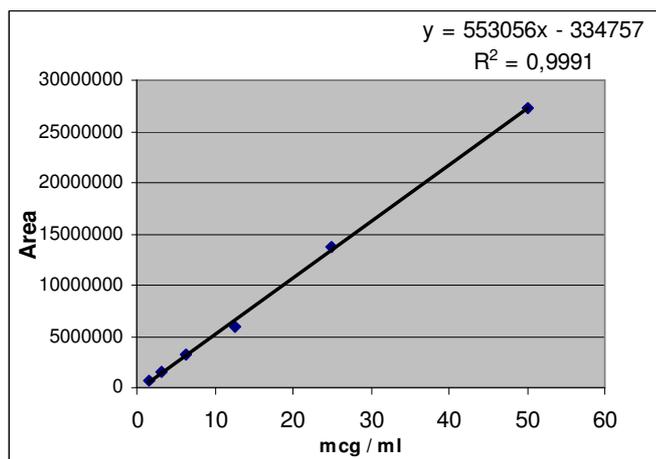


Figura 113 - Curva de calibração da isotretinoína pelo método em CLAE.

Outras 03 curvas de calibração foram feitas no aparelho em dias diferentes e os resultados obtidos confirmaram a linearidade do método.

Tabela 4: Curvas de calibração para isotretinoína por CLAE demonstrando linearidade do método.

1ª CURVA DE CALIBRAÇÃO $r^2 = 0,9999$					2ª CURVA DE CALIBRAÇÃO $r^2 = 0,991$				
Mcg/ml	Média Area	AREA	DP	DPR	mcg / ml	AREA	Média Area	DP	DPR
0,3125	7602	7301	365,85	4,81	1,5625	625884	710187,5	119223,15	16,79
		8009							
		7495							
0,625	14777	14021	923,28	6,25	3,125	1450582	1454479	5510,48	0,38
		15806							
		14504							
1,25	31127	31173	40,28	0,13	6,25	3371219	3296406	105801,56	3,21
		31100							
		31107							
3,125	77348	79139	1780,10	2,30	12,5	6115644	5953096	229878,29	3,86
		77326							
		75579							
6,25	160481	156184	4729,33	2,95	25	13659645	13659645	45881,33	0,34
		159710							
		165548							
12,5	326778	330321	8190,34	2,51	50	13724531	27359109	3377157,54	12,34
		317413							
		332601							
25	666373	668551	2030,67	0,30	29747120	664532	29747120		
		666035							
		666035							
3ª CURVA DE CALIBRAÇÃO $r^2 = 0,999$									
mcg/ml	AREA	Média Area	DP	DPR	mcg/ml	AREA	Média Area	DP	DPR
0,625	14122	14210	124,45	0,88	0,625	14298			
	31523								
1,25	30458	30990,5	753,07	2,43	1,25	76410	75503,5	1281,98	1,70
	74597								
3,125	149100	150977	2654,48	1,76	3,125	152854			
	300087								
6,25	292985	296536	5021,87	1,69	6,25	633587	633350	335,17	0,05
	633113								

5.2.2. Limite de Quantificação e de Detecção

O ruído foi determinado com 06 injeções consecutivas de branco (metanol), sendo o resultado final igual a 0,113 mAU (altura do ruído) (figura 38).

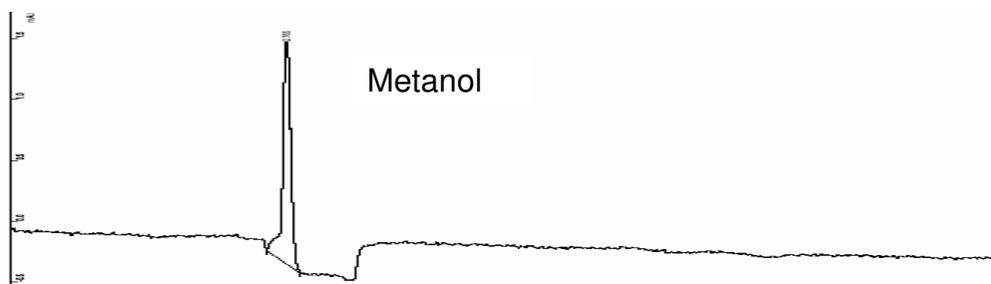


Figura 114 - Cromatograma por CLAE para determinação do ruído: pico principal – metanol. Altura do ruído 0,113 mAU - FM: Acetonitrila:Acetato de Amônio 1% (95:5); 1ml/min.; 342 nm; Coluna Microsorb C8 – tempo de retenção da isotretinoína 5,78 min. - final.

Os limites de quantificação (LQ) (tabela 03 e figura 39) e de detecção (LD) (figura 40) foram obtidos em função do ruído, onde o LQ é pelo menos 10 vezes maior que o ruído, e o LD é pelo menos 3 vezes maior que o ruído (tabela 3).

Tabela 4 – Limites de quantificação e detecção encontrados pelo método de CLAE.

Parâmetro	Altura do pico	Concentração
LQ	1,16 mAU	0,36 µg/ml
LD	0,408 mAU	0,0936 µg/ml

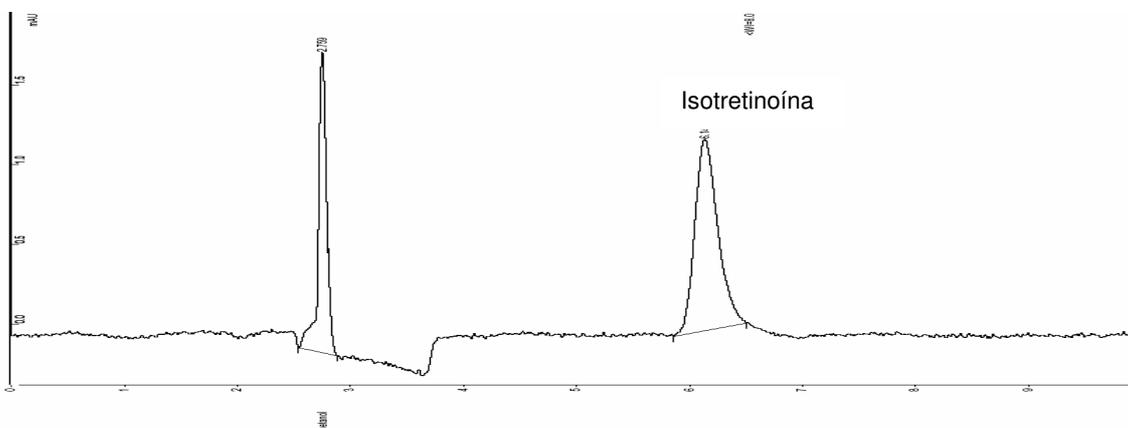


Figura 115 - Cromatograma por CLAE demonstrando limite de quantificação igual 0,36 µg/ml.

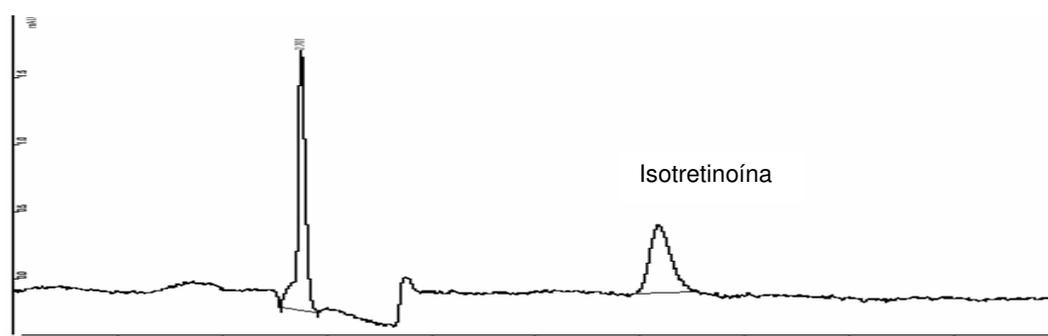


Figura 116 - Cromatograma por CLAE demonstrando limite de detecção igual 0,0936 µg/ml.

5.2.3. Seletividade, Especificidade e Sensibilidade

5.2.3.1. Determinação do Pico da Tretinoína

Com a injeção da mistura da substância de referência (isotretinoína) e seu principal isômero (tretinoína), foi possível obter um cromatograma com separação adequada entre os picos (figura 41).

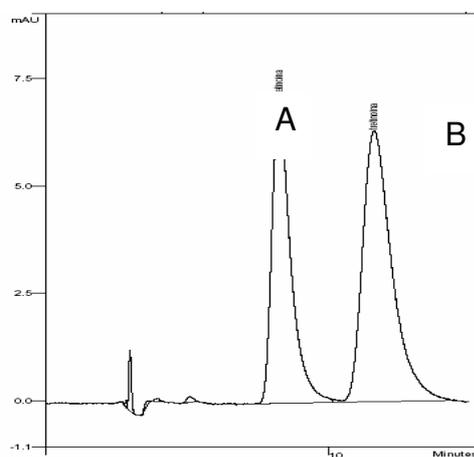


Figura 117 - Cromatograma obtido por CLAE – separação dos picos de isotretinoína e tretinoína dos demais isômeros. FM: Acetonitrila:Acetato de Amônio 1% (95:5); 1ml/min.; 342 nm; Coluna Microsorb C8.– A; isotretinoína ; B: tretinoína.

Ciola (2003) publicou que “*pequenas caudas podem ocorrer com certa frequência em cromatogramas de isômeros detectados em detectores de ultra-violeta (UV)*”. Isso pôde ser verificado nos cromatogramas onde aparecem os picos de isotretinoína degradada em tretinoína, ou ainda tretinoína propositalmente acrescida às amostras de isotretinoína nas análises realizadas com o método desenvolvido neste trabalho. Entretanto, as pequenas caudas que aparecem nos cromatogramas de isotretinoína não causaram prejuízo na qualidade dos resultados, já que a separação entre os picos foi total, como demonstrado na figura 42.

5.2.3.2. Resolução (Rs) e Número de Pratos Teóricos

Os cálculos da resolução (Rs) final e o número de pratos teóricos (n) foram efetuados através do software Star Workstation (Varian) a partir das informações recolhidas no cromatograma obtido pós injeção para determinação de sensibilidade do método analítico (tabela 06).

Tabela 06 - Determinação dos parâmetros de eficiência da análise cromatográfica definidos por cromatograma em condições isocráticas, conforme metodologia desenvolvida por CLAE.

Pico	Tr	N (>2000)	H	Rs (>2)
<i>Metanol</i>	2,764	6847	27389	-
<i>Isotretinoína</i>	5,799	4038	16151	12
<i>Tretinoína</i>	7,277	3615	14460	3,5

Segundo os parâmetros de conformidade do sistema definidos pela US Pharmacopeia (2007), o número de pratos teóricos (n) superior a 2000 indica que o processo de separação é eficiente.

Ao calcular a resolução (Rs) foi constatado que o valor de Rs foi maior que 2, demonstrando que as substâncias têm separação até a linha de base, sendo a separação entre os picos total, demonstrando adequada seletividade do método.

5.2.3.3. Sensibilidade

O cromatograma obtido com amostra contendo quantidade bem menor de interferente (tretinoína) que da substância principal (isotretinoína) mostrou que o pico do interferente teve área menor que 20% (área = 54203) do pico da amostra (isotretinoína – área = 195388) (figura 42), indicando a sensibilidade do método.

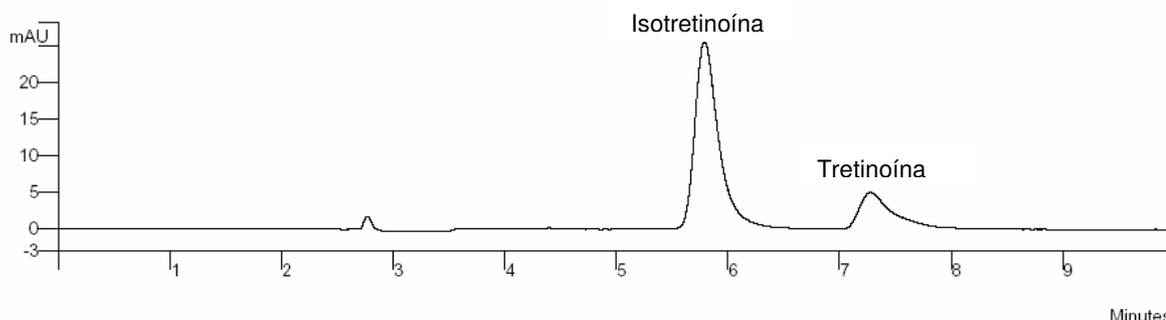


Figura 118 - Cromatograma por CLAE demonstrando que a sensibilidade do método - FM: Acetonitrila:Acetato de Amônio 1% (95:5); f1 ml/min.; 342 nm; Coluna Microsorb C8.

5.2.4. Precisão e Exatidão

O desvio padrão relativo, calculado a partir das áreas obtidas pelos cromatogramas, foi menor que 5%, o que demonstra que o método desenvolvido é preciso. Já a diferença entre o valor teórico (tomada de ensaio) e o experimental expresso em porcentagem permaneceu entre os 80 – 120% recomendados pelo ICH, o que demonstra que o método é exato (tabela 07).

Tabela 07 – Resultados intra-dia demonstrando a precisão (DPR menor que 5%) e exatidão (recuperação maior que 80%) do método.

	ÁREA	MÉDIA	CONC.µg/ml	DPR	RECUP.	%
1º triplicata						
1º injeção	1952585	1953271	72	0,59	72,67	100,93
2º injeção	1965045					
3º injeção	1942184					
1º injeção	533789	527535	20	2,21	19,55	97,75
2º injeção	534703					
3º injeção	514113					
1º injeção	10678	10484	0,3	3,92	0,28	94,94
2º injeção	10012					
3º injeção	10762					
2º triplicata						
1º injeção	1930649	1905953	72	2,02	70,91	98,48
2º injeção	1861609					
3º injeção	1925601					
1º injeção	524262	527150	20	0,85	19,54	97,68

2º injeção	524868					
3º injeção	532320					
1º injeção	10046	10313	0,3	3,15	0,28	92,82
2º injeção	10219					
3º injeção	10674					
3º triplicata						
1º injeção	1879274	1878223	72	0,17	69,88	97,05
2º injeção	1874576					
3º injeção	1880819					
1º injeção	519758	517577,7	20	0,40	19,18	95,89
2º injeção	517285					
3º injeção	515690					
1º injeção	10496	10438	0,3	2,20	0,28	94,37
2º injeção	10633					
3º injeção	10185					

5.2.5. Robustez

Com a troca do aparelho, conforme descrito na metodologia por CLAE (item 4.2) foi possível evidenciar que o método suporta pequenas variações (figura 44).

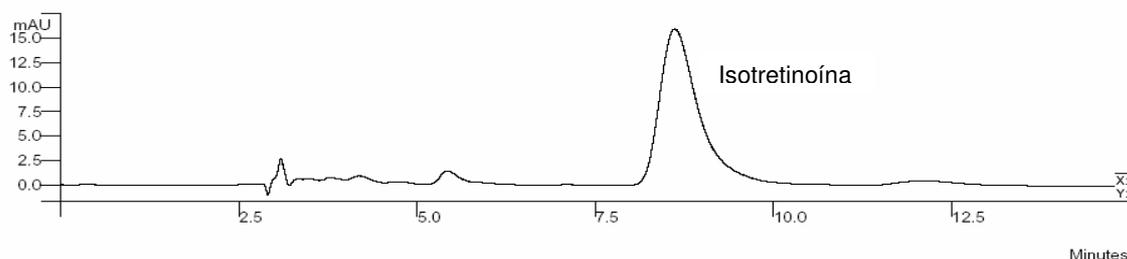


Figura 119 – Cromatograma por CLAE demonstrando que o método é robusto, sendo alterado para este cromatograma o aparelho – de um cromatógrafo com injeção automática, para um com injeção manual - FM: Acetonitrila:Acetato de Amônio 1% (95:5); 1ml/min.; 342 nm; Coluna Microsorb C8.

Ainda um segundo parâmetro foi alterado: a coluna foi trocada por outra coluna Microsorb C8 250 x 4,6 mm Varian

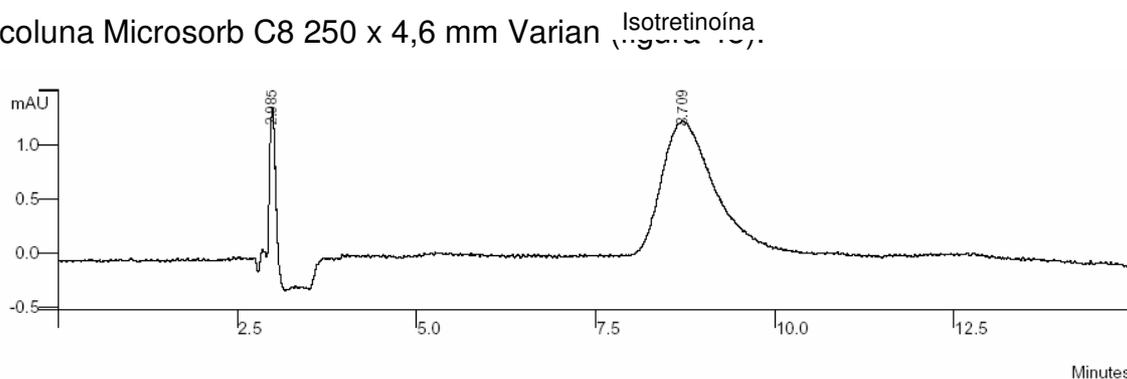


Figura 120 – Cromatograma por CLAE demonstrando que o método é robusto, sendo alterado para este cromatograma a coluna – de uma C8 para outra C8 - FM: Acetonitrila:Acetato de Amônio 1% (95:5); 1ml/min.; 342 nm.

Houve um pequeno alargamento no pico e deslocamento no tempo de retenção, porém ainda assim o método demonstrou ser robusto.

5.3. OBTENÇÃO DOS SISTEMAS PROPOSTOS CONTENDO ISOTRETINOÍNA

5.3.1. Niossomas-Isotretinoína

5.3.1.1. Controle da Velocidade e do tempo de centrifugação de niossomas

A análise para controle da velocidade e do tempo de centrifugação demonstrou que na velocidade de 2000 RPM durante 2 minutos não houve precipitação das vesículas grandes (tabela 08).

Tabela 08 – Controle da velocidade e do tempo de centrifugação de niossomas – centrifugação a 2000 rpm por 2 minutos.

<i>Amostra</i>	<i>Amostragem</i>	<i>Média de tamanho</i>	Pdl
Niossomas-Isotretinoína –	Alíquota superior	1530 nm	0,616
Niossomas-Isotretinoína –	Alíquota inferior próxima ao botão	1120 nm	0,580

A confirmação desses parâmetros foi necessária, pois as vesículas maiores possuem densidade superior que as vesículas de tamanho reduzido. Esta análise confirmou que, na velocidade e no tempo estabelecidos para a separação do fármaco não encapsulado, não ocorreu precipitação das vesículas maiores contendo a maior quantidade de fármaco encapsulado.

5.3.1.2. Localização da Isotretinoína nas Vesículas

A isotretinoína é um fármaco lipossolúvel. Portanto, ao ser encapsulada em niossomas fica posicionada na região lipofílica da membrana da vesícula (figura 46).

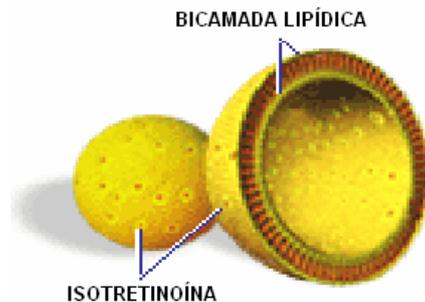


Figura 121 - Modelo esquemático que indica o posicionamento da isotretinoína encapsulada pelos niossomas.

A isotretinoína, por estar inserida na bicamada lipídica, exerce impacto sobre membrana do niossoma modificando seu comportamento, conforme demonstrado pelos ensaios de EPR descritos posteriormente.

5.3.2. HP β Ciclodextrinas-Isotretinoína

A literatura descreve a complexação de fármacos lipossolúveis em ciclodextrinas na proporção 1:1 (CDs-Fármaco), como o modelo descrito na figura 47, onde o fármaco lipossolúvel acomoda-se na cavidade hidrofóbica da molécula das CDs.



Figura 122 - Modelo esquemático que indica como a isotretinoína fica posicionada no complexo com as ciclodextrinas na proporção 1:1 (HP β CDs:Iso). Fonte: www.chemie.uni-duesseldorf.de/.../research1.gif - adaptado.

Apesar da maioria dos esquemas de complexação descreverem complexos na razão molar de 1:1 (CDs:Fármaco), para a complexação da isotretinoína em HP β CDs foi necessário a presença de várias moléculas hospedeiras (ciclodextrinas) para a reentrada do fármaco na cavidade hidrofóbica, por ser este processo dinâmico onde a molécula hóspede continuamente se associa e desassocia da molécula hospedeira (Figura 48).

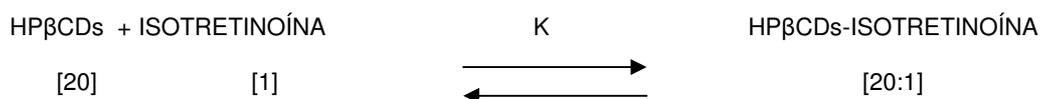


Figura 123 - Interação da isotretinoína com HPβCiclodextrinas para a formação do complexo HPβCDs-Isotretinoína sob constante de dissociação (K).

A estabilidade do complexo formado pode ser determinada pela força de complexação (K), a constante de associação (Ka) e a constante de desassociação (Kd), e depende de como a molécula-hóspede (isotretinoína) se encaixa na cavidade das HPβCDs. A força de complexação pode ser obtida pela seguinte fórmula:

$$K = K_a \div K_d$$

Onde:

$$K_a = [\text{HP}\beta\text{CDs:isotretinoína}]$$

$$K_d = [\text{HP}\beta\text{CDs}] [\text{isotretinoína}]$$

Considerando que quanto maior for a razão entre Ka e Kd, ou seja, quanto maior for K, maior é a estabilidade do complexo. Considerando os resultados de K descritos na tabela 09, podemos verificar que na proporção de 10:1 (HPβCDs:isotretinoína) foi obtido o maior valor de K (1843,15M⁻³), indicando a melhor proporção para a permanência da isotretinoína complexada às ciclodextrinas.

Tabela 09: Constante de inclusão do complexo HPβCDs:isotretinoína.

(HPβCDs:isotretinoína)*	mM HPβCDs	K (M ⁻³)
.0,5:1	2,5	0,584
.1:1	5	1603,04
.1,5:1	7,5	1403,52
.2:1	10	1596,16
.10:1	50	1843,15
.20:1	100	1520,13
.30:1	150	1038,42
.40:1	200	748,54
.50:1	250	631,58
.60:1	300	539,76

*Considerando Isotretinoína constante (5 mM).

O valor médio para a constante de inclusão do complexo HPβCDs:isotretinoína é de 1093,48M⁻³.

5.3.3. HP β Ciclodextrinas-Isotretinoína em Niossomas-Isotretinoína

A complexação da isotretinoína em HP β CDs modifica sua solubilidade, possibilitando sua preparação em meio aquoso. Portanto, o complexo HP β CDs-Isotretinoína fica encapsulado na região hidrofílica das vesículas de niossomas entre as lamelas (quando em vesículas multilamelares) e em seu núcleo (figura 49).

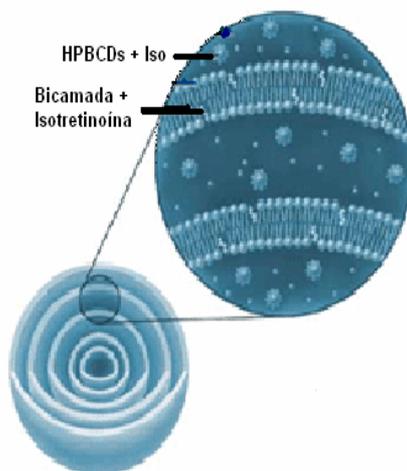


Figura 124 - Modelo esquemático que indica onde o complexo HP β CDs:Isotretinoína fica incluso após a formação das vesículas niossomais contendo isotretinoína. Fonte: www.immunovaccine.com/images/diagram-vaccimax.gif - adaptado.

5.4. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DAS VESÍCULAS FORMADAS

5.4.1. Determinação do Tamanho

A tentativa de formação de vesículas anfifílicas a partir do tensoativo Brij 35[®] não mostrou ser eficiente, já que a leitura pelo método de espalhamento de luz (DLS) demonstrou presença de partículas suspensas, fragmentos e bolhas, o que indica a não formação das vesículas (figura 50). É possível que tenha ocorrido a formação de um ambiente micelar, o que confirma o trabalho de Pardakhty (2007), que estudou niossomas, formados a partir de Brij[®], como sistema carreadores de insulina.

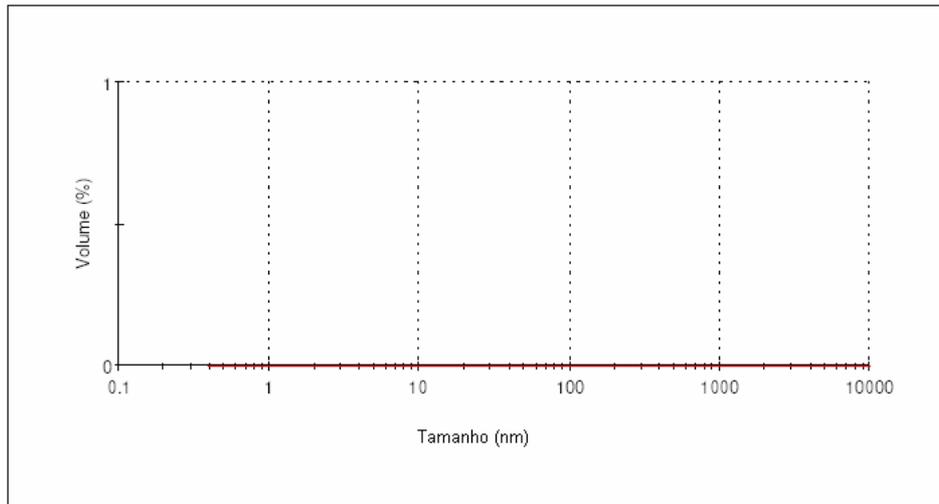


Figura 125 - Leitura pelo método de espalhamento de luz (DLS) – niossomas de Brij 35.

Isso se deve ao alto EHL (Equilíbrio Hidrófilo Lipófilo) do Brij® 35 (EHL = 17) o que caracteriza este tensoativo como detergente e não capaz de formar vesículas.

Já para as vesículas formadas a partir do Brij 30® foi possível determinar o tamanho médio das vesículas formadas pelo método de espalhamento de luz (DLS). As estruturas possuíam tamanho médio de 1500 nm, estando o índice de polidispersibilidade (Pdl) variando em torno de 0,6 para todas as análises (figura 51).

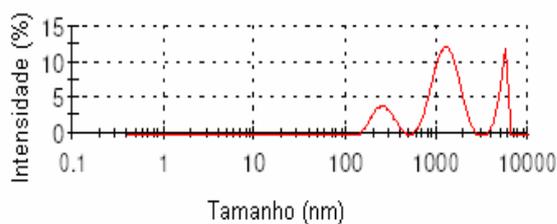


Figura 126 – Medida de tamanho e polidispersão da amostra de niossomas contendo isotretinoína.

Não houve diferença de tamanho para os niossomas com e sem fármaco encapsulado. Ambos apresentaram diâmetro próximo a 1500 nm. No entanto, foi observado um aumento considerável no diâmetro dos niossomas contendo ciclodextrinas e isotretinoína (2.220 nm) (tabela 10). Esses resultados concordam com outros trabalhos já publicados que demonstram o aumento no tamanho de lipossomas contendo o complexo ciclodextrinas-fármaco (Maestrelli *et al*, 2005).

Tabela 10 - Comparação dos tamanhos dos niossomas (Brij@30: Col: DCP 50:25:10) formados: branco, com isotretinoína (5mM) e com complexo HPβCDs:isotretinoína (20:1).

Amostra	Diâmetro médio	Pdl
Niossomas Brancos	1170 nm	0,576
Niossomas - Isotretinoína	1560 nm	0,698
Niossomas – Isotretinoína + Ciclodextrinas - Isotretinoína	2220 nm	0,528

Esse fato explica-se devido o alto peso molecular que as HPβCDs possuem (PM = 1380), que mutiplicado pelo número de moléculas necessárias para a formação de complexo com a isotretinoína (HPβCDs:Isotretinoína 20:1), resultam no tamanho aumentado dos niossomas que contém este complexo.

5.4.2. Características Morfológicas

As características morfológicas das vesículas formadas foram observadas por microscopia óptica (campo claro e fluorescência). Foi possível verificar que a presença do colesterol foi essencial para a formação das vesículas, tanto na presença quanto na ausência da isotretinoína (figura 52).

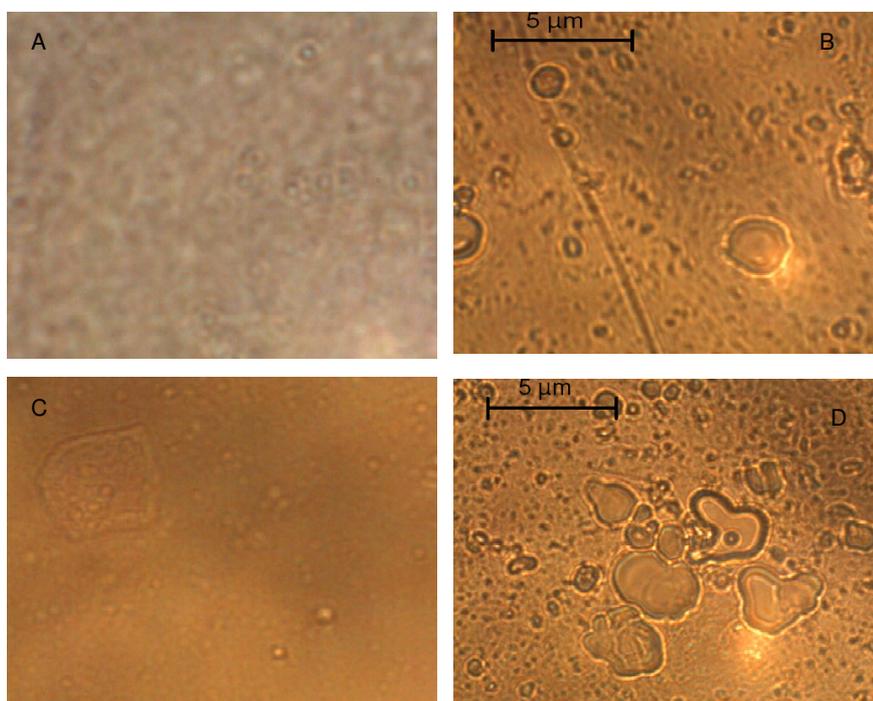


Figura 127 - Fotomicrografia por MO das vesículas formadas a partir de: A – Brij 30; B – Brij 30 + Colesterol; C – Brij 30 + Isotretinoína; D – Brij 30 + Colesterol + DCP + Isotretinoína.

Ao comparar morfologicamente as vesículas formadas a partir de fosfatidilcolina (lipossomas) com as vesículas de niossomas, foram verificadas diferenças no formato de ambas: enquanto as vesículas fosfolipídicas (lipossomas) apresentam-se com forma esférica, os niossomas apresentaram uma grande variedade de formatos (figura 53). Além do formato, foi também possível notar que lipossomas de fosfatidilcolina (PC) possuem tamanho reduzido quando comparados ao niossomas (Brij30:Coolesterol:DCP – 50:25:5) obtidos pelo mesmo método de preparação.

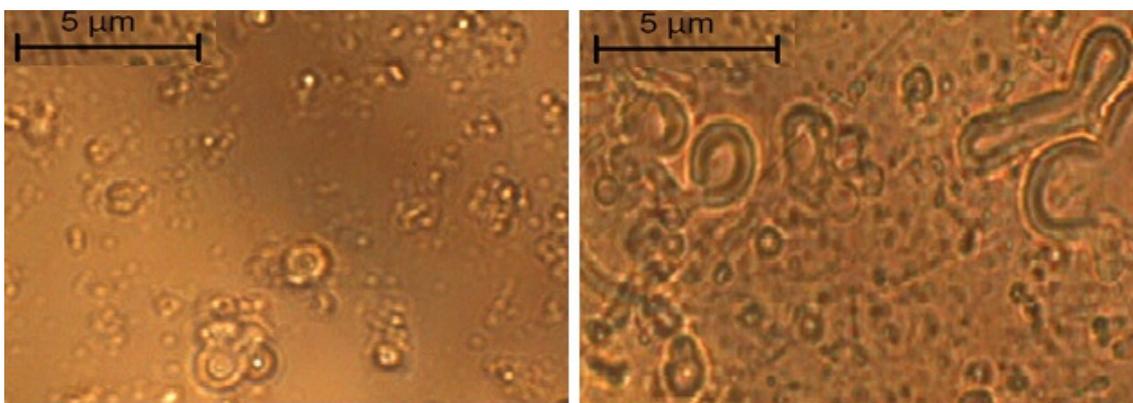


Figura 128 – Fotomicrografia por MO: A: Lipossomas de PC; B: Niossomas de Brij30:Coolesterol:DCP (50:25:10).

Foi possível observar na fotomicrografia de niossomas contendo isotretinoína uma grande variedade de vesículas multilamelares e de tamanhos que confirmam as medidas detectadas por DLLS (figura 54).

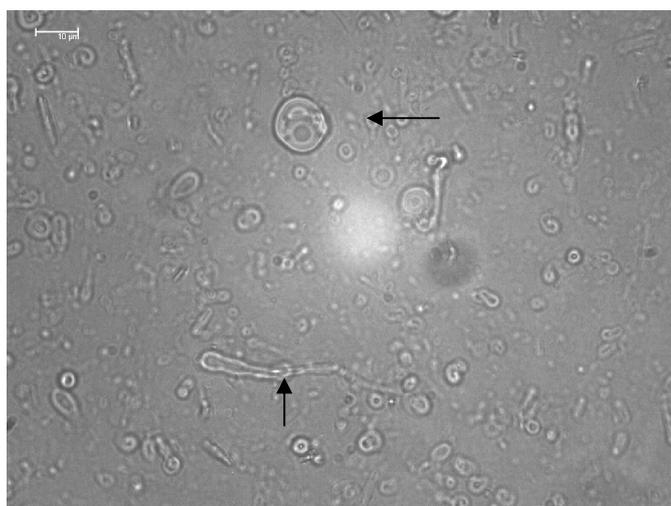


Figura 129 – Fotomicrografia por MO de niossomas contendo isotretinoína– vesículas gigantes – multi e unilamelares.

Formas multivariadas (esféricas, em bastão e polimórficas) (figura 55) foram evidenciadas. Essas variantes são típicas de vesículas formadas por tensoativos, conforme já detectadas por outros pesquisadores (Girigoswami et al, 2006). As diversas formas que as vesículas de niosomas assumem podem estar relacionadas com a estrutura da membrana (presença de tensoativos) e conseqüente flexibilidade.

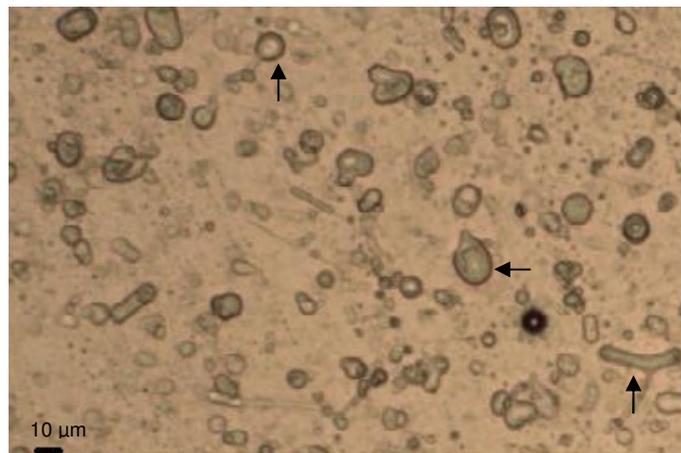


Figura 130 – Fotomicrografia por MO dos niosomas contendo isotretinoína (características morfológicas): multilamelares, unilamelares, esféricos e alongados.

Outro resultado comum nestas amostras foi a presença de vesículas dentro de outras vesículas, conforme apresentado na figura 56.

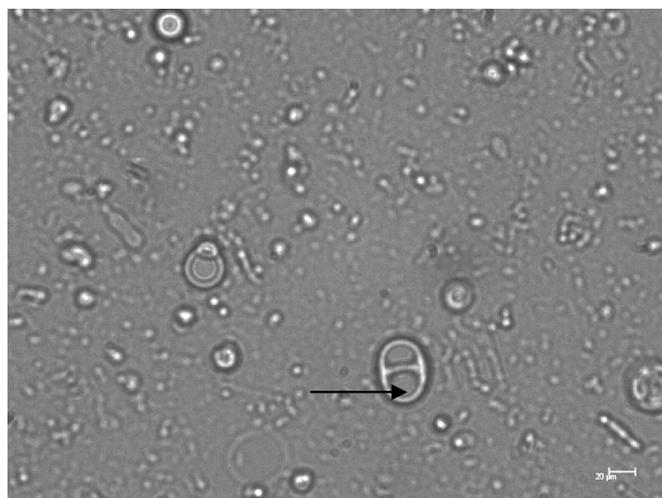


Figura 131 – Fotomicrografia de niosomas contendo isotretinoína por MO – NdNs (Niosomas Dentro de Niosomas).

Quando foi utilizado o marcador de fluorescência, foi possível observar a espessura da membrana niosomal, e evidenciar mais uma vez, os diferentes formatos que as vesículas apresentam (figura 57).

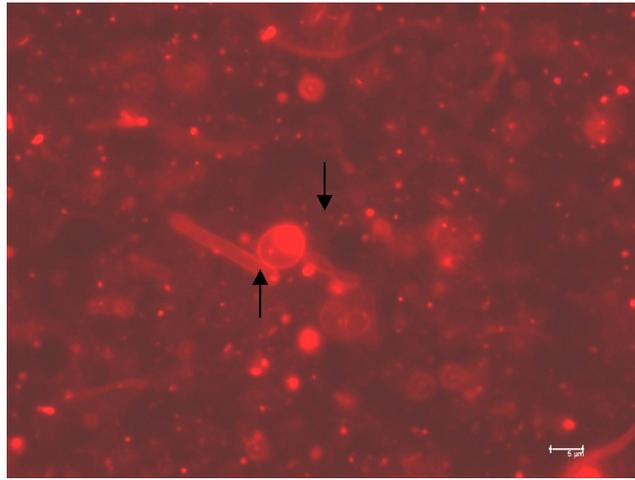


Figura 132 – Fotomicrografia de niosomas contendo isotretinoína com marcador de fluorescência por microscopia óptica – leitura com luz florescente: formatos diferentes e NdNs.

Os niosomas apresentaram ser vesículas com flexibilidade considerável, pois durante as observações por microscopia de fluorescência (figura 58) ou até mesmo pela microscopia óptica em campo claro, foi possível ver as vesículas se movimentando o modificando seu formato (figura 59).

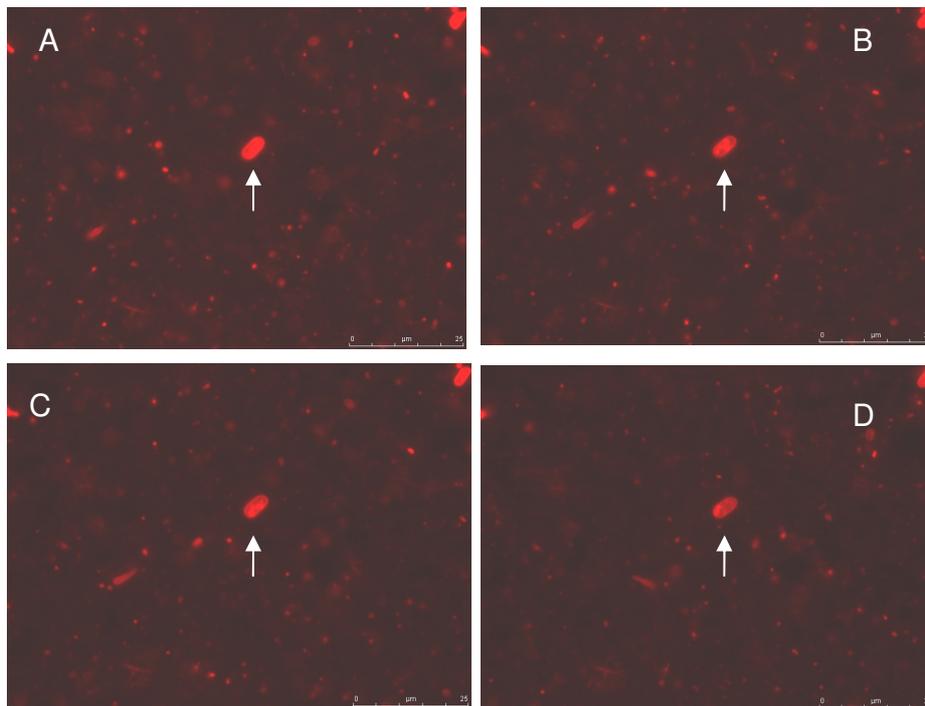


Figura 133 – Fotomicrografia de niosomas contendo isotretinoína com marcador de fluorescência por microscopia de fluorescência – vesículas em movimento – (A):tempo zero;(B) tempo 1s; (C) tempo 2s;(D) tempo 3s.

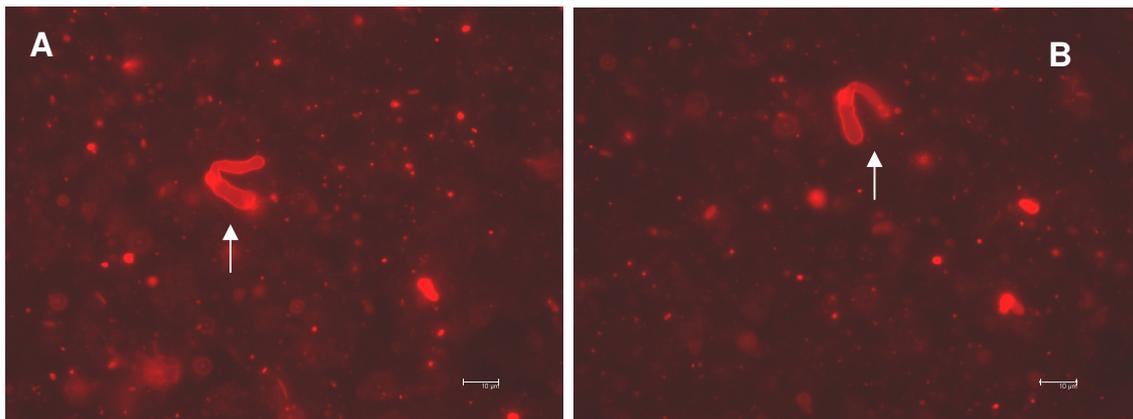


Figura 134 – Fotomicrografia de niossomas contendo isotretinoína com marcador de fluorescência por microscopia de fluorescência – vesícula dobrada em movimento – (A):tempo zero;(B) tempo 2s.

5.4.3. Monitoramento da Dinâmica Molecular dos Lipídeos na Membrana das Vesículas

Na Ressonância Paramagnética Eletrônica o parâmetro de RPE $2T_{//}$, desdobramento hiperfino máximo, é a separação em Gauss (G) do primeiro pico de ressonância do espectro até a última depressão, conforme indicado pelas duas linhas verticais tracejadas no caso do espectro de controle, comparando com os espectros obtidos nos resultados apresentados neste trabalho (figura 59).

Ao ser analisada a dinâmica dos lipídeos da membrana niossomal por RPE de lipídeos marcados, foi possível observar que a presença do colesterol deixa a membrana mais rígida. A rigidez foi ainda maior com a adição do DCP (5 mM) deixando a membrana mais estável que a membrana das vesículas formadas somente por Brij 30:Colesterol (50:25) (figura 60).

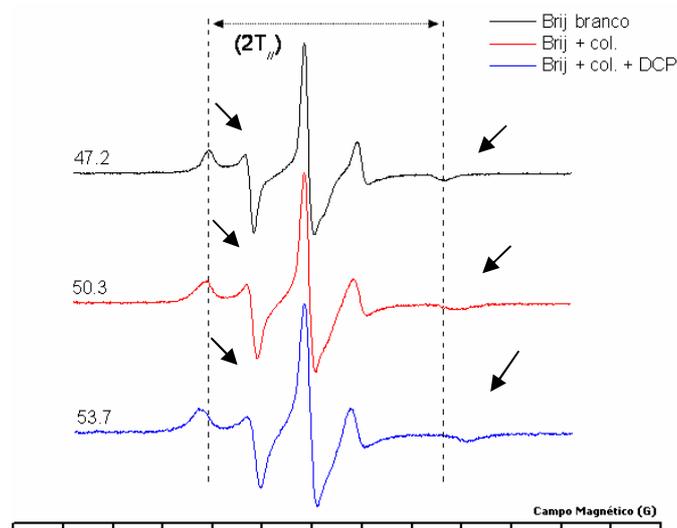


Figura 135 – Espectros de RPE de amostras marcadas com 5-DSA – o aumento do $2T_{//}$ indica maior rigidez da membrana com a presença de colesterol e ainda maior com a adição do DCP.

Quando os niossomas foram comparados aos lipossomas de fosfatidilcolina, as diferenças quanto à fluidez na membrana foram praticamente imperceptíveis, pois a diferença entre os valores do $2T_{//}$ dos lipossomas contendo isotretinoína e os niossomas com isotretinoína ficou dentro do erro experimental de 0,5 G (figura 61). Isso provavelmente se deve ao fato de que a presença do DCP na formação das vesículas de anfífilos sintéticos deixa a estrutura da membrana mais semelhante às membranas formadas pela fosfatidilcolina.

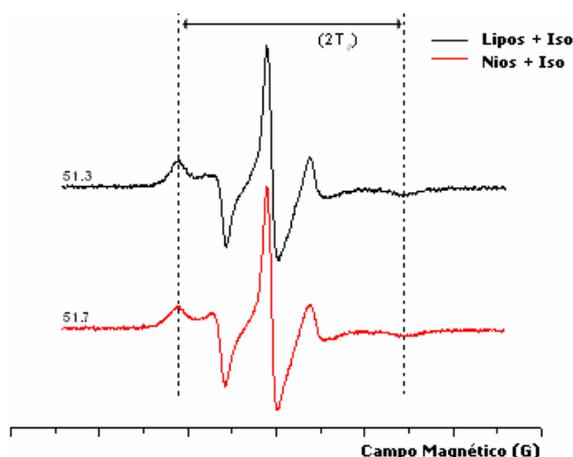


Figura 136 – Espectros de RPE (marcador 5-DSA): a diferença dos valores do $2T_0$ para as duas amostras permanece dentro do erro experimental de 0,5 G.

Foi possível verificar que o marcador TEMPO emite um pequeno sinal quando nos niossomas brancos, indicando sua maior partição na fase aquosa. Há, no entanto, uma mudança na partição do marcador quando a isotretinoína é incluída na formulação (figura 62).

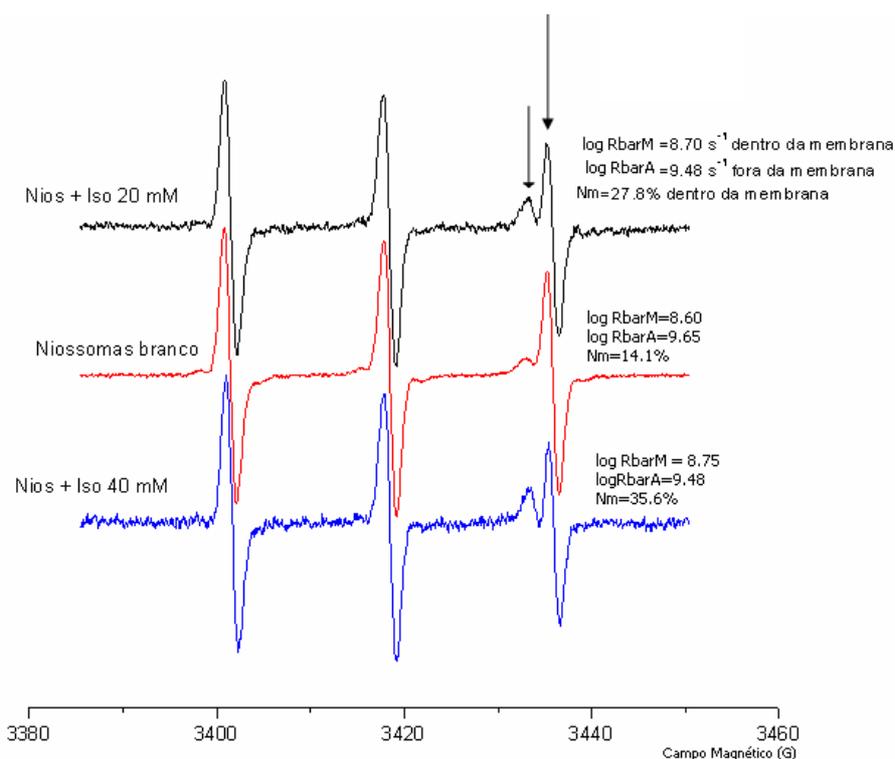


Figura 137 - Espectro de RPE para marcador TEMPO nas amostras: niossomas contendo 20mM de Isotretinoína; niossomas brancos; niossomas contendo 40 mM de isotretinoína. Análise realizada a 37°C.

O marcador TEMPO apresenta um espectro de RPE composto pela sobreposição de duas componentes espectrais de marcadores nas fases

aquosa e hidrocarbônicas. O espectro consiste de três linhas de ressonância com uma resolução na linha de campo alto: a seta maior indica a linha de ressonância que corresponde aos marcadores na membrana e a seta menor indica a linha dos marcadores na fase aquosa; Nm corresponde à fração de marcadores na membrana (14,1% para a amostra controle); log RbarM é o logaritmo da frequência rotacional de difusão na membrana; e log RbarA um parâmetro similar para o marcador na água. A adição de 20 mM de isotretinoína aumentou a partição e a dinâmica do marcador na membrana. Estes parâmetros aumentam ainda mais quando 40 mM de isotretinoína são adicionados.

Já para o marcador 5-doxyl foi possível notar que a presença do colesterol promove um aumento no desdobramento hiperfino paralelo, que é indicativo de aumento de rigidez na membrana. O parâmetro de EPR $2T//$ foi menor para a amostra de Niossomas com Isotretinoína a 40 mM indicando que a membrana ficou mais fluida na presença da isotretinoína (figura 63).

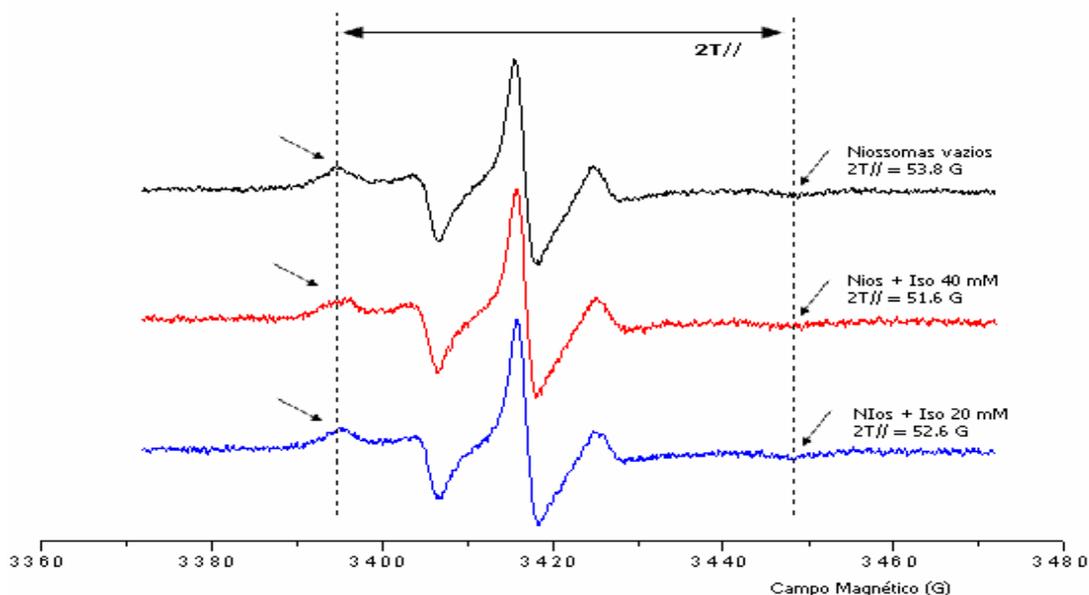


Figura 138 - Espectro de RPE para marcador 5-DSA nas amostras: niossomas branco; niossomas contendo 40 mM de isotretinoína e 20 mM de isotretinoína.

Ao se estudar a presença do fármaco na membrana das vesículas, foi possível observar que a presença da isotretinoína deixa a membrana mais fluida para os dois marcadores. Isso ocorre provavelmente pelo posicionamento da isotretinoína na membrana – enquanto a cabeça da molécula empacota a membrana (apolar) a cauda abre espaço (polar).

5.5. EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO DE ISOTRETINOÍNA EM NIOSSOMAS

Alves (2005) encapsulou a isotretinoína (2,5mM) em lipossomas unilamelares formados a partir de fosfatidilcolina medindo aproximadamente 100 nm. A eficiência de encapsulação de isotretinoína em niossomas foi superior àquela observada para lipossomas de fosfatidilcolina, onde somente 60% do fármaco acrescentado ao sistema (2,5 mM) foi efetivamente incorporado à membrana. Isso pode ter ocorrido devido ao tamanho e número de lamelas das vesículas niossomais obtidas, pois vesículas multilamelares grandes encapsulam quantidades maiores de fármaco que vesículas unilamelares pequenas.

Os resultados apresentados na figura 63 demonstram que a isotretinoína possui um comportamento diferenciado para a incorporação em vesículas de tensoativos não-iônicos, pois há um aumento crescente para a entrada do fármaco na bicamada lipídica na concentração de até 10 mM. É possível verificar, que ao aumentar a concentração de isotretinoína adicionada ao sistema, ocorre aumento respectivo de isotretinoína incorporada à membrana das vesículas (concentração de isotretinoína encapsulada).

No entanto, em concentrações molares acima de 10 mM, foi possível observar queda na quantidade de isotretinoína (mM) que permanece na membrana (concentração de isotretinoína encapsulada). Esse fato poderia ser explicado pelos resultados já apresentados por RPE, onde a presença da isotretinoína deixa a membrana mais fluida e essa fluidez é proporcional a quantidade de isotretinoína colocada no sistema. É provável que haja vazamento de fármaco em função da fluidez da membrana, o que também justifica a ocorrência de precipitado de fármaco insolúvel nas amostras obtidas com estas concentrações.

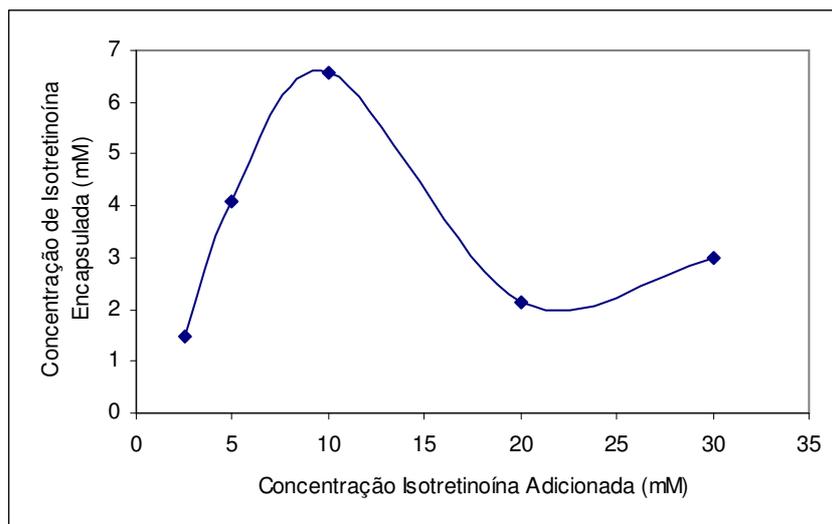


Figura 139 - Eficiência de encapsulação de isotretinoína em niossomas em função de sua concentração molar.

Para a concentração de 10 mM de isotretinoína encapsulada pelos niossomas, a razão de anfílico estrutural:fármaco necessário para a formação do sistema foi de 8:1; e para 5mM de isotretinoína adicionada a razão molar foi de 12:1 (anfílico estrutural:isotretinoína). Ou seja, para promover a inclusão de 5 mM de isotretinoína nos niossomas, foram necessárias 12 moléculas de tensoativo para cada molécula de isotretinoína. Enquanto que para promover a inclusão de 10 mM de isotretinoína nos niossomas, foram necessárias 8 moléculas de tensoativo para cada molécula de isotretinoína (figura 65).

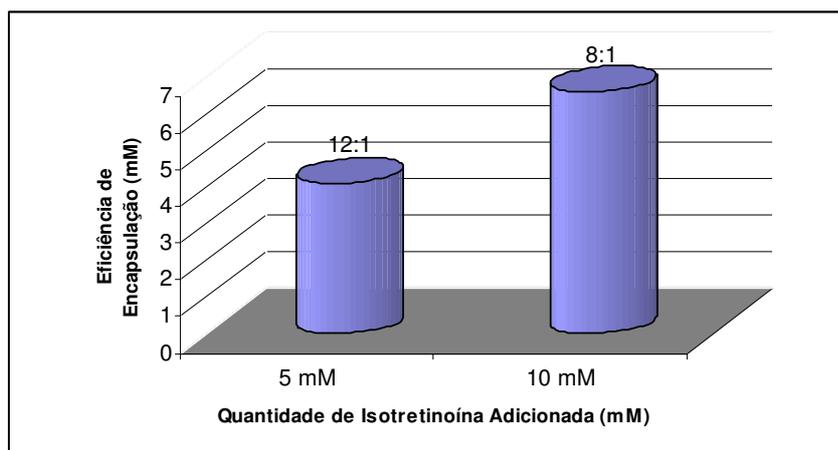


Figura 140 - Eficiência de encapsulação de isotretinoína em niossomas determinada por CLAE indicando a razão molar anfílico estrutural:fármaco.

Ao avaliar a eficiência de encapsulação por porcentagem de fármaco encapsulado em função da concentração de fármaco adicionada à formulação (EE%) foi possível verificar que, quando 5mM de isotretinoína foram adicionadas ao sistema a quantidade de fármaco encapsulado foi de 81,94% (4,1 mM); ao serem adicionados 10 mM de isotretinoína para a formação de niossomas, apenas 66% (6,6 mM) do fármaco foi encapsulado, ou seja, permaneceu na membrana (figura 66).

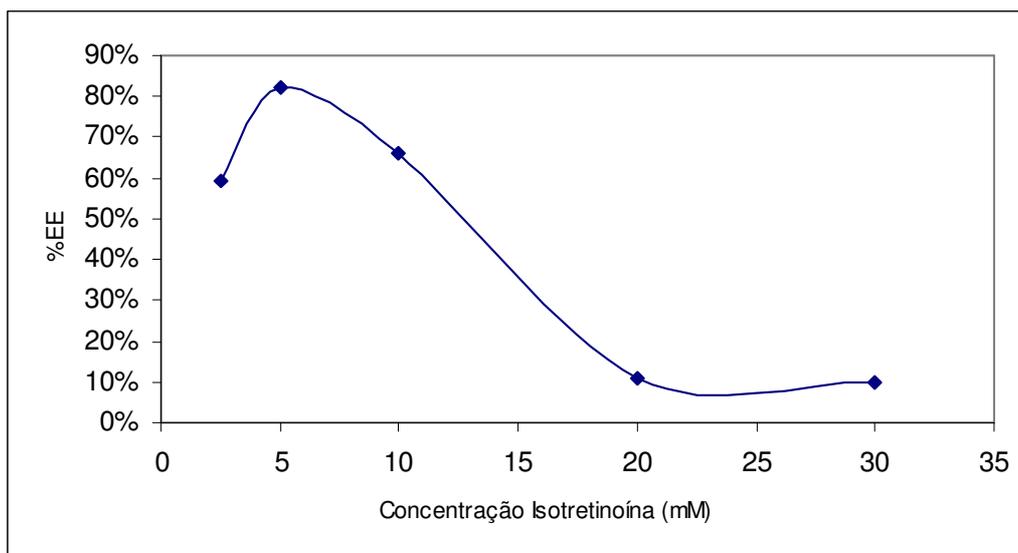


Figura 141 - Eficiência de encapsulação de isotretinoína em niossomas expressa em porcentagem de fármaco incorporado ao sistema em relação à quantidade de fármaco inicial.

Portanto, a melhor eficiência de encapsulação em função do aproveitamento do fármaco acrescido ao sistema está na concentração de 5 mM de isotretinoína.

5.6. EFICIÊNCIA DA FORMAÇÃO DO COMPLEXO DE ISOTRETINOÍNA EM HIDROXIPROPIL β CICLODEXTRINAS

Foi possível observar um aumento crescente na eficiência de incorporação da isotretinoína em ciclodextrinas em função da quantidade de HP β CDs acrescida ao sistema. Até a proporção de 20:1 (HP β CDs:Isotretinoína) o aumento foi gradativo, porém acima dessa razão molar, foi possível verificar a formação de um platô indicando que o máximo de inclusão foi atingido (figura 67).

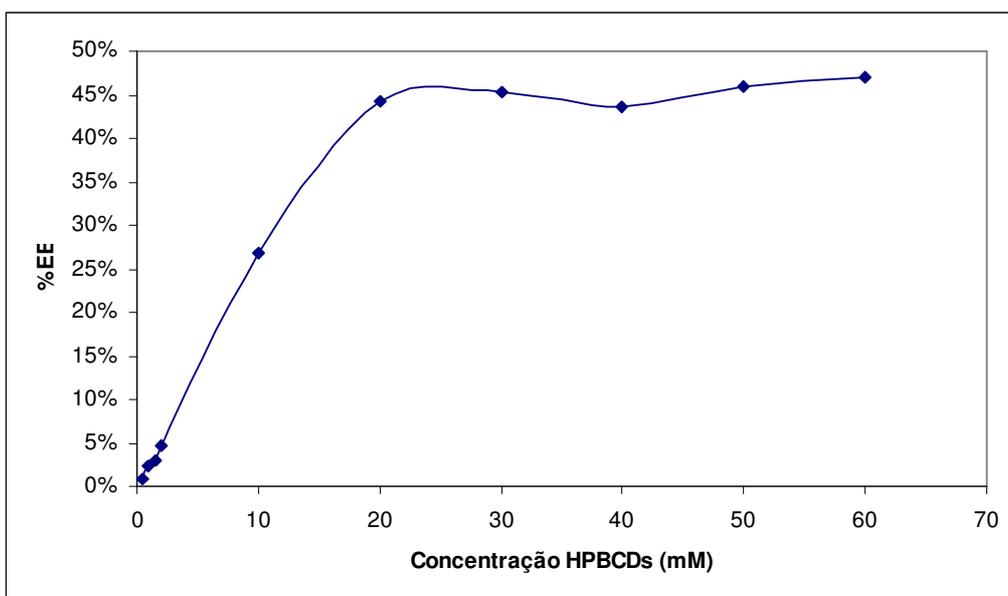


Figura 142 - Eficiência de formação do complexo de isotretinoína em hidroxipropilβciclodextrinas em função da concentração de CDs acrescida ao sistema.

Mesmo quando analisada a força de complexação da HPβCDs com a isotretinoína (item 5.3.2), cujo resultado mais satisfatório foi na razão molar de 10:1 ($K = 1843,15 \text{ M}^{-3}$), podemos observar que ainda na razão de 20:1 ($K = 1520,13 \text{ M}^{-3}$ de isotretinoína complexada) houve melhor aproveitamento do fármaco acrescido às ciclodextrinas (44,2% na razão de 20:1 contra 26,8% na razão de 10:1), sendo uma menor porção descartada de fármaco em função da não formação de complexo com ciclodextrinas.

Por essa razão, foi determinado que a melhor proporção de HPβCDs:Isotretinoína é a de 20:1, com uma eficiência de 44,2% de isotretinoína incluída em função da quantidade inicial no sistema e força de complexação contida em valores maiores que a média de K encontrados nas diversas proporções (média de $K = 1093,48 \text{ M}^{-3}$).

5.7. EFICIÊNCIA DO COMPLEXO FORMADO: HP β CICLODEXTRINAS-ISOTRETINOÍNA EM NIOSSOMAS-ISOTRETINOÍNA

A eficiência de encapsulação da isotretinoína nos sistemas obtidos neste trabalho pode ser observada na tabela 11.

Tabela 11 - Eficiência da formação de complexo de inclusão da isotretinoína em HP β CDs e sua encapsulação em niossomas.

Sistema	Isotretinoína adicionada		Isotretinoína encapsulada		
	mg	[mM]	mg	EE%	[mM]
HP β CD (20:1)	1,72	5,00	0,76	44,20	2,21
Niosomas ¹	1,72	5,00	1,40	81,94	4,10
Niosomas ²	2,48	7,20	1,88	75,96	5,47

¹ Isotretinoína adicionada em sol. clorofórmica na formação do filme lipídico (1,72 mg)

² Isotretinoína adicionada em sol. clorofórmica na formação do filme lipídico (1,72 mg) e incluída em ciclodextrinas no tampão para hidratação (0,76 mg)

Observa-se que o sistema final (HP β CDs:Isotretinoína em niossomas contendo isotretinoína) foi capaz de encapsular maior quantidade de isotretinoína que os demais sistemas (5,47 mM de isotretinoína encapsulada contra 4,10 em niossomas e 2,21 mM em ciclodextrinas). No entanto, a eficiência de encapsulação em porcentagem de fármaco incluso no sistema em função da quantidade de fármaco acrescido inicialmente foi melhor na formação dos niossomas com isotretinoína (81,94%). Esse resultado demonstra um aproveitamento maior do fármaco acrescido aos niossomas que nos demais sistemas desenvolvidos.

Teoricamente seria esperada uma maior eficiência de encapsulação no sistema final composto por niossomas:isotretinoína + HP β CDs:Isotretinoína. No entanto, foi possível observar que a eficiência de encapsulação (EE%) para o sistema HP β CDs:Isotretinoína em niossomas contendo isotretinoína foi de 75,96%, ficando próxima ao valor encontrado para niossomas contendo isotretinoína (81,94%) apenas na bicamada lipídica.

Valores de eficiência de encapsulação (EE%) próximos nos dois sistemas com vesículas podem ser explicados pelo marcado aumento no tamanho das vesículas quando em presença do complexo HP β CDs-Isotretinoína, somado à fluidez da membrana pela presença da isotretinoína, o

que pode ter dificultado sua permanência na membrana com conseqüente vazamento e perda na eficiência de encapsulação do fármaco.

5.8 ENSAIO DE LIBERAÇÃO IN VITRO

5.8.1. Curva de Calibração para CLAE-EM-EM

O método desenvolvido por CLAE não foi suficientemente sensível para detectar as frações permeadas pelas membranas sintéticas utilizadas nos testes preliminares, não sendo observado nenhum pico cromatográfico (figura 68).

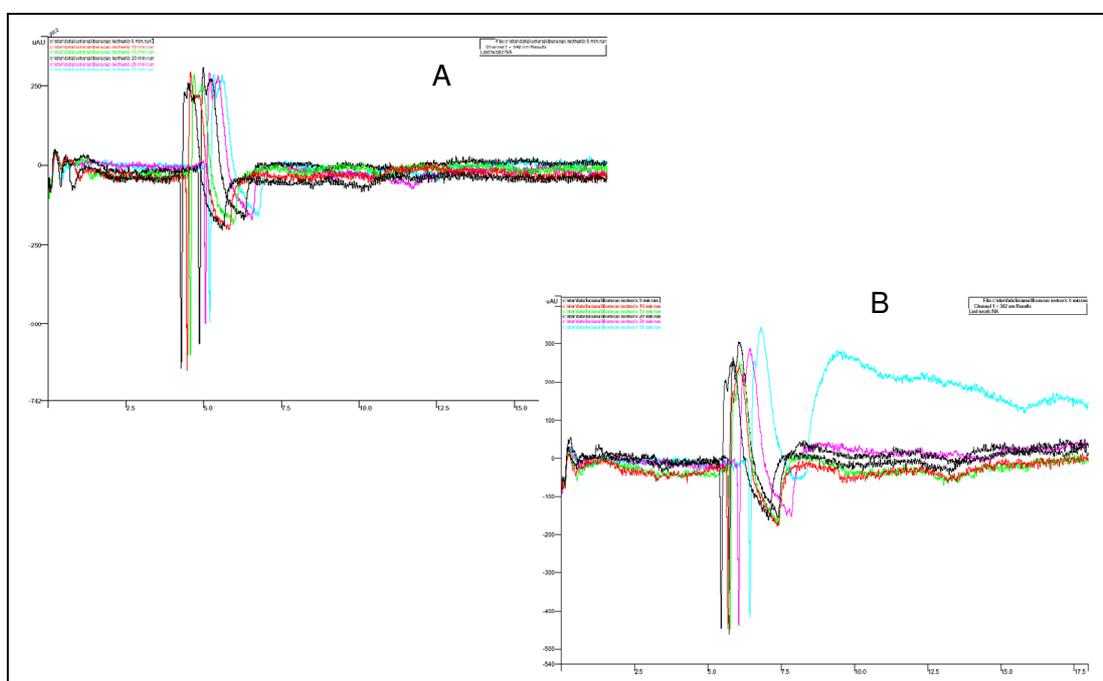


Figura 68 - Cromatogramas por CLAE para o ensaio de liberação em membranas Coltran® A: 9705, B: 9715, C: 9725 3MT™ - FM: ACN:Acetato Amônio 1% (95:5) - 1ml/min -342 nm.

Portanto, a quantificação da isotretinoína nos ensaios de liberação em membranas sintéticas Coltran® e de estrato córneo somente foi possível por CLAE-EM-EM.

Para a determinação da curva de calibração nos parâmetros já descritos, foram escolhidas as seguintes concentrações para os pontos: 800 ng/ml; 400 ng/ml; 200 ng/ml, 100 ng/ml, 50 ng/ml, 25 ng/ml e 12,5 ng/ml. As diluições seriadas foram feitas com metanol e em balão volumétrico protegido da luz (âmbar), obedecendo para tanto os critérios analíticos.

A equação da reta obtida a partir do tratamento dos dados obtidos pelo cromatograma foi a seguinte:

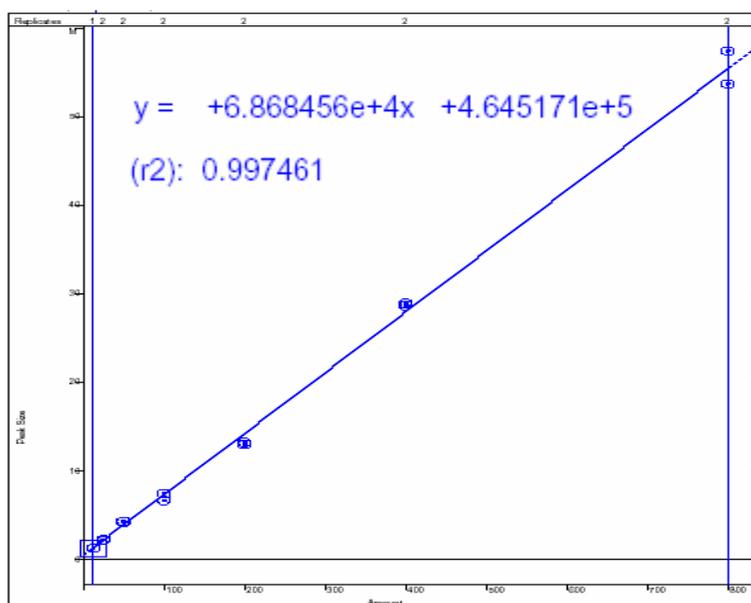


Figura 69 – Curva de calibração obtida pelo método em CLAE-EM-EM.

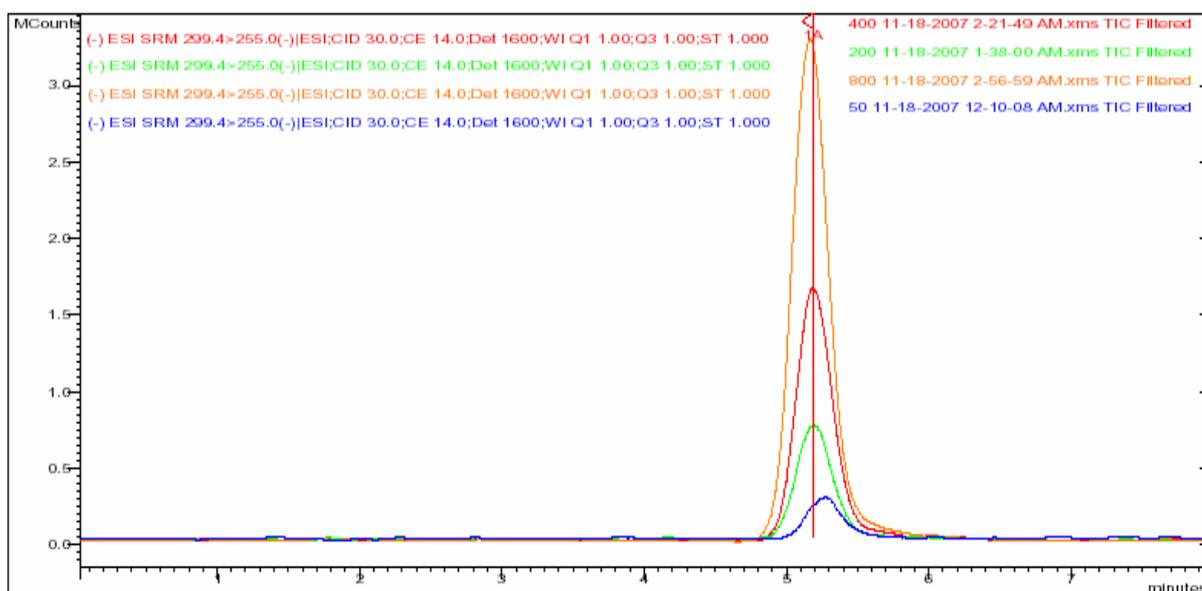


Figura 70 – Cromatograma da curva de calibração da isotretinoína por CLAE – EM-EM: Coluna Polaris RP C8; FM: Acetonitrila: Ácido Acético 0,5% (70:30); Fluxo 0,3 ml/min;detector 1600 watts, agulha 500 watts, shield 600 watts, pressão do ar 22 psi, ionização negativa – tempo de retenção da isotretinoína 5,18 min.

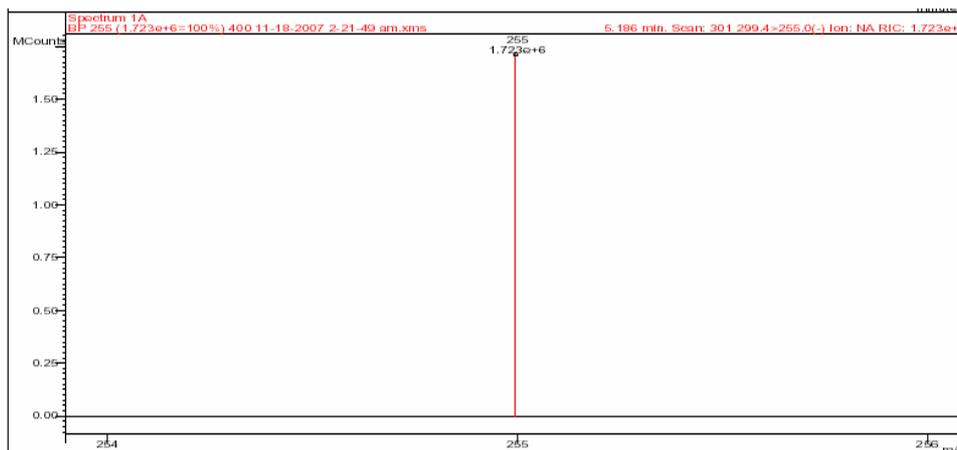


Figura 71 – Espetro de massas da curva de calibração da isotretinoína por CLAE – EM-EM: Coluna Polaris RP C8; FM: Acetonitrila: Ácido Acético 0,5% (70:30); Fluxo 0,3 ml/min; detector 1600 watts, agulha 500 watts, shield 600 watts, pressão do ar 22 psi, ionização negativa – tempo de retenção da isotretinoína 5,18 min.

5.8.2. Ensaio em Membranas Sintéticas

5.8.2.1. Ensaio em Membranas Coltran® 9715

O complexo HP β CDs-Isotretinoína foi capaz de permear as membranas a partir do tempo de 60 minutos de ensaio, indicando uma velocidade de permeação mais lenta que a dos niossomas contendo isotretinoína, cuja permeação foi imediata. A flexibilidade dos niossomas contendo isotretinoína pode ter facilitado a passagem desse sistema pelos poros da membrana Coltran® 9715 (figura 72).

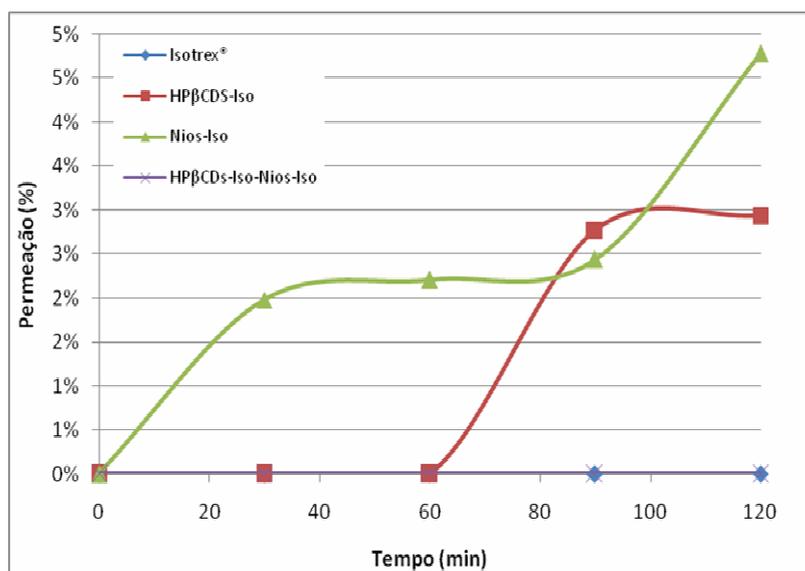


Figura 72 - Perfil de permeação da isotretinoína em membrana sintética Coltran® 9715.

A isotretinoína comercial (Isotrex®) não permeou a membrana Coltran® 9715, assim como o sistema final (HPβCDs-isotretinoína em niossomas contendo isotretinoína). O sistema final possui diâmetro de vesículas grandes (aproximadamente 2.000 nm), e apesar dos niossomas contendo isotretinoína demonstrarem flexibilidade, a inclusão das HPβCDs-Isotretinoína pode ter modificado a capacidade das vesículas de alterar sua forma para permear os orifícios da membrana sintética.

5.8.2.2. Ensaio em Membranas Coltran® 9728

A isotretinoína comercial não permeou a membrana Coltran® 9728, assim como o complexo HPβCDs-Isotretinoína (figura 73).

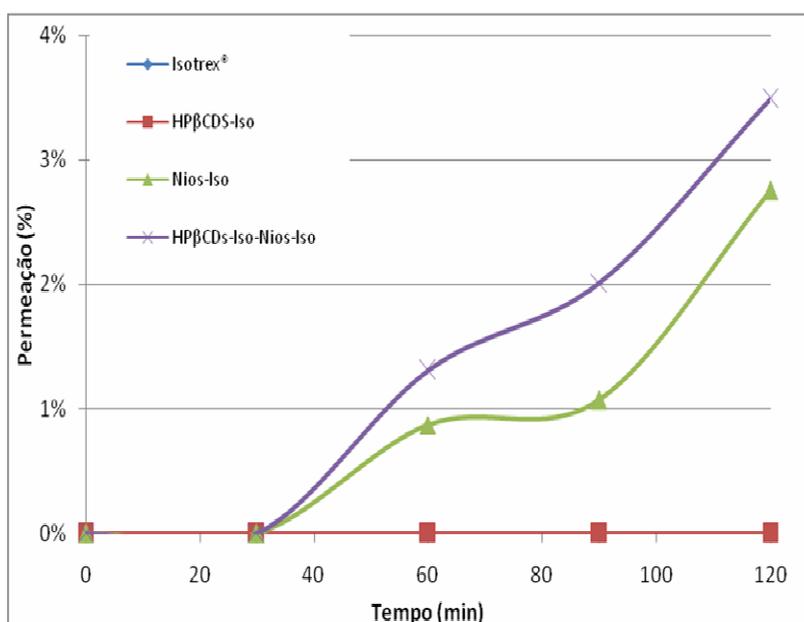


Figura 1433 – Perfil de permeação da isotretinoína em membrana sintética Coltran® 9728.

A membrana Coltran® 9728 possui índice de hidratação igual a 97,2 g/m²/24h, enquanto que a membrana Coltran® 9715 possui índice de hidratação menor (64,8 g/m²/24h). Esse índice de hidratação maior na Coltran® 9728 indica que é necessária maior quantidade de líquido para umedecer e saturar a membrana. Isto pode explicar a provável necessidade de tempo maior

de contato para que as HP β CDs-isotretinoína permeiem a membrana até o meio de dissolução.

Os niossomas contendo isotretinoína mostraram permeação menor quando comparados ao sistema final (HP β CDs-isotretinoína em niossomas contendo isotretinoína), e ambos mostraram permeação a partir de 30 minutos. A espessura da membrana Coltran® 9728 de 50,8 μ m é menor que da membrana Coltran® 9715 (76,2 μ m). Isso pode explicar a passagem do sistema final apenas pela Coltran® 9728..

67

5.8.3. Ensaio em Membranas de Estrato Córneo

No estrato córneo a isotretinoína nos sistemas testados permeou a membrana, como pode ser visto na figura 74.

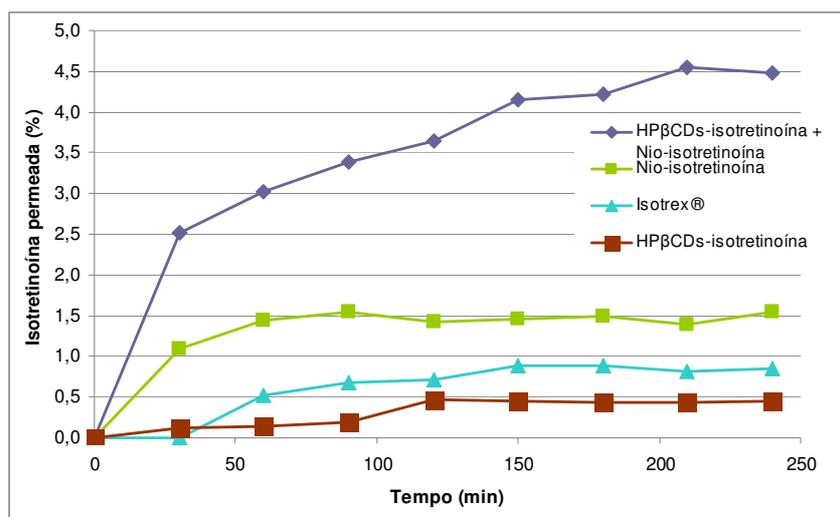


Figura 144 – Perfil de permeação da isotretinoína em estrato córneo.

A isotretinoína comercial (Isotrex®) foi permeada somente nesta membrana orgânica, sendo somente possível detectar isotretinoína após os 30 minutos iniciais da análise. Tal comportamento demonstra a lentidão desse sistema (isotretinína livre em gel alcoólico) em permear e disponibilizar a isotretinoína para efeito terapêutico.

Assim como no ensaio com membrana Coltran® 9728, a isotretinoína em niossomas demonstrou o segundo melhor perfil de liberação, entretanto

ainda menor que o sistema final (HP β CDs-isotretinoínas em niossomas contendo isotretinoína).

O complexo HP β CDs-Isotretinoína foi capaz de liberar a isotretinoína para a passagem pelo estrato córneo, porém em quantidade menor que os demais sistemas. Ao quantificar a isotretinoína na amostra contida no enhancer cell após o teste de liberação, foi possível verificar que a maior parte do fármaco permaneceu complexada às ciclodextrinas (97,9%), o que demonstra que o complexo formado não propiciou a passagem do fármaco pela membrana como os demais sistemas.

Já o sistema final (HP β CDs-isotretinoínas em niossomas contendo isotretinoína), teve o melhor perfil de liberação, sendo que a quantidade de isotretinoína permeada (4,5%) ficou próxima da concentração permeada na membrana Coltran® 9728 (3,5%). A provável explicação para este fenômeno está no fato de as vesículas niossomais possuírem flexibilidade e interação com a membrana, facilitando a penetração do fármaco complexado às HP β CDs ou incluso nas vesículas, e posterior liberação no meio receptor.

5.9.4. Extração de Isotretinoína no Estrato Córneo pós Ensaio de Liberação

Após o ensaio de permeação, a quantificação da isotretinoína retida nas membranas está demonstrada na figura 75.

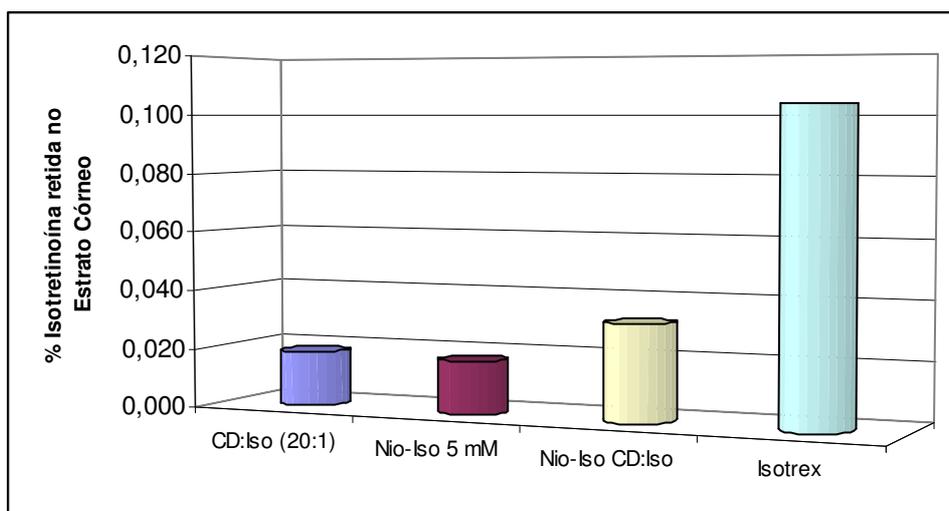


Figura 145 - Isotretinoína (%) extraída da membrana de estrato córneo após 2 horas de ensaio de permeação.

Foi possível observar que a isotretinoína comercial (Isotrex®) ficou mais retida na membrana do estrato córneo, quando comparadas às outras amostras aplicadas. Isso demonstra a eficiência dos sistemas vesiculares em transportar o fármaco através dos caminhos tortuosos do estrato córneo.

Quanto as HPβCDs-isotretinoína foi possível visualizar pequena porção de isotretinoína retida no estrato córneo. Quando analisada em associação a baixa concentração permeada, podemos verificar que o processo de permeação de fármacos complexados em ciclodextrinas ocorre em duas etapas: desassociação da ciclodextrina para posterior permeação do fármaco. É possível que, caso o tempo de ensaio fosse maior, quantidades ainda maiores de isotretinoína (antes complexada às HPβCDs) chegassem ao meior receptor. O inconveniente desse aumento no tempo do teste seria a baixa estabilidade do fármaco submetido às condições de ensaio.

Também foi possível verificar valores baixos para os niossomas contendo isotretinoína e niossomas-isotretinoína + HPβCDs-isotretinoína, demonstrando que ambos os sistemas permeiam bem a isotretinoína pelo estrato córneo, não ficando assim o fármaco retido na membrana.

Além disso, o sistema niossomas-isotretinoína + HPβCDs-isotretinoína mostrou comportamento diferenciado na liberação do fármaco quando comparado aos demais sistemas desenvolvidos, por potencialmente poder ser utilizado como carreadores da isotretinoína na aplicação tópica apresentando-se como modelo farmacêutico de “liberação prolongada”.

Parte da isotretinoína contida em todos os sistemas converteu-se em tretinoína, devido ao estresse ao qual foi submetido o fármaco (luz e temperatura de 37°C).

6. CONCLUSÕES

O método cromatográfico por CLAE desenvolvido para a separação e quantificação da isotretinoína inclusa nos sistemas propostos foi validado, sendo linear, sensível, seletivo, preciso, exato e robusto.

Não foi possível formar vesículas anfifílicas a partir do tensoativo Brij 35®.

A inclusão do complexo HP β Ciclodextrinas-Isotretinoína em niossomas aumenta consideravelmente o tamanho das vesículas niossomais.

Houve grande variedade morfológica nas vesículas formadas a partir de tensoativos não-iônicos (esféricas, em bastão e polimórficas).

A presença da isotretinoína modifica o comportamento da membrana dos lipossomas e da bicamada anfifílica dos niosomas deixando-a mais fluida.

O complexo de isotretinoína em ciclodextrinas foi melhor obtido na razão molar de 20:1 (CDs:ISO).

O melhor rendimento para a encapsulação de isotretinoína em niossomas foi na concentração molar do fármaco a 5 mM (81,94%).

A eficiência de encapsulação da isotretinoína em HP β CDs e posterior encapsulação em niossomas foi de 75,96%, quando utilizada a proporção de 20:1 de HP β CDs-Iso e 5mM de isotretinoína para a formação das vesículas.

O sistema final (HP β CDS-Isotretinoína em Niossomas-Isotretinoína) promoveu melhor permeação na membrana sintética Coltran® 9728 e no estrato córneo.

O sistema final (HP β CDS-Isotretinoína em Niossomas-Isotretinoína) mostrou perfil de liberação modificada quando comparada ao sistema convencional (isotretinoína comercial - Isotrex®) em membranas de estrato córneo.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHFS – DRUG INFORMATION. Skin and mucous membrane agentes: miscellaneous skin and mucous membrane agentes. Bethesda: **AHFS**, p. 2958-2963, 1998.

AGGARWAL D., PAL D., MITRA A. K., KAUR I. P. Study of the extent of ocular absorption of acetazolamide from a developed niosomal formulation, by microdialysis sampling of aqueous humor. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 338, p. 21-26, 2007.

AKTAN S., OZMEN E., SANLI B. Anxiety, depression and nature of acne vulgaris in adolescents. **International Journal of Dermatology**, Philadelphia, v. 23, p. 354-357, 2000.

ANDREO-FILHO N., ODA C. Y., SCARPA M. V., OLIVEIRA A. G. Quantitative determination of phosphatidylcholine by high performance liquid chromatography using silica column. **Revista de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 20, p.107-115, 1999.

ANJOS, J. L. V., NETO D. S., ALONSO A. Effects of ethanol/L-menthol on the dynamics and partitioning of spin-labeled lipids in the stratum corneum. Brazil. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, Stuttgart, v.67, p.406–412, 2007.

ALLEN , L. G., BLOXHAN, D. P. **The pharmacology and pharmacokinetics of the retinoids**. Pharmac. Ther., Oxford, V.40, n. 1, p. 1-27, 1989.

ALONSO A, DE QUEIROS WP, NETO DD. Dynamics and partitioning of spin-labeled steirates into the lipid domain of stratum corneum. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 106, p. 374-385, 2005.

ALVES C.P.I., LIMA. E.M. **Estudo e caracterização da encapsulação de isotretinoína em lipossomas unilamelares**. Dissertação de mestrado. Faculdade de Farmácia. Universidade Federal de Goiás. 2005.

ANSARI M., KAZEMIPOUR M., AKLAMLI M. The study of drug permeation through natural membranes. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 327, p. 6–11, 2006.

ANVISA. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução-Re N^o 899, de 29 de Maio de 2003 – Disponível em: www.anvisa.gov.br

AOKI H., TOTTORI T., SAKURAI F., FUJI K., MIYAJIMA K. Effects of positive charge density on the liposomal surface on disposition kinetics of liposomes in rats. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 156, p. 163-174, 1997.

AZEVEDO M. **Nanoesferas e a liberação controlada de fármacos**. LCES, UNICAMP. 2002. Disponível em: www.lges.igq.unicamp.br

BABU R.J., PANDIT J.K.. Effect of penetration enhancers on the release and skin permeation of bupranolol from reservoir-type transdermal delivery systems. **International Journal of Pharmaceutics**. Amsterdam, v. 288, p. 325–334, 2005.

BETZ G. ET AL. In vivo comparison of various liposome formulations for cosmetic application. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 296, p. 44-54, 2005.

BIGBY, M : STERN, R S. Adverse reactions to isotretinoin. A report from the Adverse Drug Reaction Reporting System. **Journal of the American Academy of Dermatology**, St. Louis, v. 18, p. 543-552, 1988.

BIWER, A.; ANTRANIKIAN, G.; HEINZLE, E. Enzymatic production of cyclodextrins. **Appl. Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, v.59, p.609-617, 2002.

CHALKER D., LESHNER J., SMITH J. Efficacy of topical isotretinoína 0,05% gel in acne vulgaris: results of multicenter double-blind investigation. **Journal of the American Academy of Dermatology**, St. Louis, v. 17, p. 251-254, 1987.

CIOLA R. **Fundamentos da Cromatografia Líquida de Alto Desempenho: HPLC**. 1^o edição, São Paulo, Edgar Blücher, 2003.

CODERCH L., FONOLLOSA J., DE PERA M., ESTELRICH J., DE LA MAZA A. Influence of cholesterol on liposome fluidity by EPR Relationship with percutaneous absorption. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 68, p. 85– 95, 2000.

CORTESI R., ESPOSITO E., CORRADINI F., SIVIERI E., DRECHSLER M., ROSSI A., SCATTURIN A., MENEGATTI E. Non-phospholipid vesicles as carriers for peptides and proteins: Production, characterization and stability studies. **International Journal of Pharmaceutics**. Amsterdam, v. 339, p. 52–60, 2007.

DEMICHELI C. FRÉZARDI F.,SCHETTINI D. A. ROCHA. O.G.F. Lipossomas: propriedades físico-químicas e farmacológicas, aplicações na Quimioterapia à base de antimônio. **Quim. Nova**, Vol. 28, No. 3, 511-518, 2005.

DINIZ D., LIMA E., ANTONIOSI FILHO N. Isotretinoína: perfil farmacológico, farmacocinético e analítico. **Brasilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 38, n. 4, p. 415 – 430, 2002.

DRUGDEX – DRUG EVALUATIONS. Isotretinoin. Disponível em: <http://www.edrompro.com.br/ufg>. Acesso em: 26 mar 2001.

DUCHÊNE, D., WOUESSIDJEWÉ D. **Pharmaceutical and medical applications of cyclodextrins**. In: **Polysaccharides in medicinal applications**. Marcel Dekker, New York, p. 575-602, 1996.

DUNCAN R. **Nanomedicine – gets clinical**. Nanotoday, August 2005.

ELLIS C. N., KRACH K. J. Uses and complications of isotretinoin therapy. **Journal of the American Academy of Dermatology**, St. Louis, v. 45 n. 5 p. S150-S156, 2001.

ESF, **Scientific Forward Look on Nanomedicine**. European Science Foundation Policy Briefing, February 23, 2005. Disponível em: www.esf.org Acesso em: fevereiro/ 2007.

FAHMY T. M., FONG P. M., GOYAL A., SALTZMAN W. M. Targeted for drug delivery. **Materials Today**, v. 8, p. 18-26, 2005.

FDA - Guidance **for Industry Topical Dermatological Drug Product NDAs and ANDAs — In Vivo Bioavailability, Bioequivalence, In Vitro Release and**

Associated Studies. 1998. Disponível em:
<http://www.fda.gov/CDER/guidance/4592fnl.pdf>: j:\!guidanc\2481dft.wpd.

FREITAS, R.A. Nanotechnology, nanomedicine and nanosurgery. **International Journal of Surgery**, London, v. 3, p. 243-246, 2005.

FONSECA, A., PRISTA, L. N. **Manual de terapêutica dermatológica e cosmetologia**. São Paulo: ROCA, p. 129, 273, 1993.

GIANASI E., COCIANCICH F., UCHEGBU I. F., FLORENCE A. T., DUNCAN R. Pharmaceutical and biological characterisation of a doxorubicin-polymer conjugate (PK1) entrapped in sorbitan monostearate Span 60 niosomes. **International Journal Pharrnaceutics**, Amsterdan, v. 148, p. 139-148, 1997.

GILCHREST B.A. Retinoids and photodamage. **British Journal of Dermatology**, Oxford, v. 127, p. 14-20, 1992.

GIRIGOSWAMI A., DAS S. DE S. Fluorescence and dynamic light scattering of niosomes-membrane mimetic systems. **Spectrochimica Acta Part A**, Oxford, v. 64, p. 859-866, 2006.

GOLLNICK ET AL. Management of acne – a report from a global alliance to improve outcomes in acne. **Journal of the American Academy of Dermatology**, St. Louis, v. 49, n. 1, p. S1-S37, 2003.

HAIT S. K., MOULIK S. P.. Determination of Critical Micelle Concentration (CMC) of Nonionic Surfactants by Donor–Acceptor Interaction with Iodine and Correlation of CMC with Hydrophile–Lipophile Balance and Other Parameters of the Surfactants. **Journal of Surfactants and Detergents**, v. 4, no. 3, 2001.

HUGHES B., NORRIS J., CUNLIFFE W. A double-blind evaluation of topical isotretinoína 0,05%, benzoyl peroxide gel 5% and placebo in patients with acne. **Clinical and Experimental Dermatology**, Oxford, v. 17, p. 165-168, 1992.

ICH - **VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES: TEXT AND METHODOLOGY Q2(R1)**. Current *Step 4* version Parent Guideline dated 27 October 1994 (Complementary Guideline on Methodology dated 6 November 1996 incorporated in November 2005).

KEMPS J.M.A., CROMMELIN D.J.A. Chemische stabiliteit van fosfolipiden in farmaceutische preparaten. I. Hydrolyse van fosfolipiden in waterig milieu. **Journal of Pharmaceutical Weekbl**, v. 123, p. 355–363, 1988.

KLIBANOV A. L., MARUYAMA K., BECKERLEG A. M., TORCHILIN V. P., HUANG L. Activity of amphipathic poly(ethylene glycol) 5000 to prolong the circulation time of liposomes depends on the liposome size and is unfavorable for immunoliposome binding to target. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, Amsterdam, v. 1062, p. 142-148, 1991.

KOO M. O. ET AL. Role of nanotechnology in targeted drug delivery and imaging: a concise review. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, New York, p. 193-212, 2005.

JOHNSON E. M. A risk assessment of topical tretinoin as a potential human developmental toxin based on animal and comparative human data. **Journal of the American Academy of Dermatology**, St. Louis, v. 36, n. 3, p. S86-S90, 1997.

LEBOWITZ M.A., BERSON D.S. Ocular effects of oral retinoids. **Journal of the American Academy of Dermatology**, St. Louis, v. 19, p. 209-211, 1988.

LIMA E.M., DINIZ D.G.A, ANTONIOSI-FILHO N.R. Development of a gas chromatography method for the determination of isotretinoin and its degradation products in pharmaceuticals. **Journal of Pharmaceutics - Biomedical Analysis**, Oxford, v. 38, p. 678–685, 2005.

LIN HS, LEONG W. W. Y., TANG J. A., LEE P., CHAN S. Y., HO P. C. Biopharmaceutics of 13-*cis*-retinoic acid (isotretinoin) formulated with modified β -cyclodextrins, **Int. J. Pharmaceut.** (2007), doi:10.1016/j.ijpharm.2007.03.050

LIU X., LIN H., THENMOZHIAL J. C., CHAN S. Y., HO P. C. Inclusion of acitretin into cyclodextrins: Phase solubility, photostability, and physicochemical characterization. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Easton, v. 92, p. 2449 – 2457, 2003.

LIU X., LIN H., CHAN S. Y., HO P. C. Biopharmaceutics of β -cyclodextrin derivative-based formulations of acitretin in sprague-dawley rats. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Easton, v. 93, p. 805 – 815, 2004.

LOFTSSON T., BREWSTER M. E. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 1. Drug solubilization and stabilization. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Easton, v. 85, p. 1017-1024, 1996.

LOWENSTEIN E.J. Isotretinoin made SMART and simple. **Cutis**, New York, v. 70, p. 115-120, 2002.

MACHY P., LESERMAN L. **Les liposomes en biologie cellulaire et pharmacologie**. Les Edition Inserm. John Libbey Eurotext. p. 1-25, 1987.

MAESTRELLI ET AL. Preparation and characterization of liposomes encapsulating ketoprofen-cyclodextrin complexes for transdermal drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v.208, p. 55-67, 2005.

MALLON E., NEWTON J.N., KLASSEN A., STEWART-BROWN S.L., RYAN T.J., FINLAY A.Y. The quality of life in acne: a comparison with general medical conditions using generic questionnaires. **British Journal of Dermatology**, Oxford, v. 140, p. 672-676, 1999.

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

MANCONI M., VELENTI D., SINICO C. Niosomes as carries for tretinoin. II. Influence of vesicular incorporation on tretinoin photostability. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 260, p. 261-272, 2003.

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

MANOSROI, A., WONGTRAKUL, P., MANOSROI, J., SAKI, H., SUGAWARA, F., YUASA, M., ABE, M.,. Characterization of vesicles prepared with various non-ionic surfactants mixed with cholesterol. **Biointerfaces**. Amsterdam, v. 30, p. 129–138, 2003.

MEZEI M., GULASEKHARAM V. Liposomes - a selective drug delivery system for the topical route of administration I. Lotion dosage form. **Life Sciences**, Oxford, v. 26, p. 1473-1477, 1980.

MISHRA D., MISHRA P. K., DUBEY V. V., DABADGHAO S., JAIN N. K. Evaluation of uptake and generation of immune response by murine dendritic cells pulsed with hepatitis B surface antigen-loaded elastic liposomes. **Vaccine**, Amsterdam, xxx, 2007.

MONTASSIER P., DUCHÊNE D., POELMAN MC.. Inclusion complexes of tretinoína with cyclodextrins. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 153, p. 199-209, 1997.

NAIDOO K.J., CHEN J.YJ., JANSSON J. L. M., WILDMALM G., MALINIAK A.. Molecular Properties Related to the Anomalous Solubility of β -Cyclodextrin. **Journal of Physics and Chemistry**, v. 108, p. 4236-4238, 2004.

NASSERI B. Effect of cholesterol and temperature on the elastic properties of niosomal membranes. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 300, p. 95 – 101, 2005.

NASCIMENTO JR. C. S., SANTOS H. F., ALMEIDA W. A. Theoretical study of the formation of the α -cyclodextrin hexahydrate. **Chemical Physics Letters**, Amsterdam, v. 397 p. 422-428, 2004.

ODOM R. Managing actinic keratoses with retinoids. **Journal of the American Academy of Dermatology**, St. Louis, v.132, p. 519-526, 1998.

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. **Acne vulgar. In: Modelo OMS de información sobre prescripción de medicamentos: Medicamentos utilizados em las enfermedades cutâneas.** Ginebra: OMS, 1999, p. 59-63.

OSTRO M. J., CULLIS P. R. Use of liposomes as injectable-drug delivery systems. **American Journal of Hospital Pharmacy**, Bethesda, v. 46, p. 1576-1587, 1989.

PARDAKTHY A., VARSHOSAZ J., ROUHOLAMINI A., In vitro of polyoxyethylene alkyl ether niosomes for delivery of insulin. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 328, 130-141. 2007.

PERSHING L.K., NELSON J.L., CORLETT J.L., ET AL. Assessment of a dermatopharmacokinetic approach in the bioequivalence determination of topical tretinoin gel products. **Journal of the American Academy of Dermatology**, St. Louis, v. 48, p. 740-751, 2003.

PIRARD G.E., KLIGMAN A.M., STOUDEMAYER T., LEVEQUE J.L. Comparative effects of retinoic acid, glycolic acid and a lipophilic derivative of salicylic acid of photodamaged epidermis. **Journal of Dermatology**, v. 199 p. 50-53, 1999.

QI H. Z., SIKORSKI C. T. Controlled delivery using cyclodextrin technology. **Pharmaceutical Technology European**, v. 13, p. 17-27, 2001.

QUEILLE-ROUSSEL C., PONCET M., MESAROS S., CLUCAS A., BAKER M., SOLOFF A.M. Comparison of the cumulative irritation potential of adapalene gel and cream with that of erythromycin / tretinoin solutions and gel and erythromycin / isotretinoin gel. **Clinical therapeutics**, Princenton, v. 23, n. 2, 2001.

RAJEWSKI R. A., STELLA V. J. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 2. in vivo drug delivery. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Easton, v. 85, p. 1142 – 1169, 2000.

RAMA A.C., VEIGA F., FIGUEIREDO I.V., SOUZA A., CARAMONA M.. Biopharmaceutical aspects of drug formulation for neonatology. Rational for indomethacin's complexation with hydroxypropyl- β -cyclodextrin to treat patent ductus arteriosus. **Revista Brasileira de Ciências Farmaceuticas**, v.41, n.3, 2005.

RIGOPOULOS, D. ET AL. Comparison of topical retinoids in the treatment of acne. **Clinics in Dermatology**, New York, v. 22, p. 408-411, 2004.

SANTANA D. P. Evaluation biopharmaceutique de diferents formulation galeniques de l'isotretinoine en gel. **Domaine de la Merci**. La Tonche. 1992.

SAURAT, J.H. Oral isotretinoin. Where now, where next? **Dermatology Basel**, Basel, v. 195, n. 1, p. 1-3, 1997.

SESSA G., WEISSMANN G. Phospholipid spherules (liposomes) as a model for biological membranes. **Journal of Lipid Research**, Memphis, 9:310-318, 1968.

SHALITA A. R. Acne: Clinical presentations. **Clinics in dermatology**, New York, v. 22, p. 385-386, 2004.

SIGMA ALDRICH – Catálogo Eletrônico. Disponível em: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search/ProductDetail/SIAL/P1254>. Acesso em: Janeiro2006

SINICO C, MANCONI M., PEPPI M., LAI F., VALENTI D., FADDA A. M. Liposomes as carriers for dermal delivery of tretinoin: in vitro evaluation of drug permeation and vesicle–skin interaction. **Journal of Controlled Release**. Amsterdam, v. 103, p. 123–136, 2003.

STELLA V.J., RAJEWSKI R. A. Cyclodextrins: their future in drug formulation and delivery. **Pharmaceutical Research**, Stuttgart, v. 14, p. 556-567, 1997.

STELLA V.J., RAO M. V., ZANNOU E.A., VAHID ZIA. Mechanisms of drug release from cyclodextrin complexes. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, v.36, p.3–16, 1999.

SUKOWSKI W. W., PENTAK D., NOWAK K., SUKOWSKA A. The influence of temperature and pH on the structure of liposomes formed from DMPC. **Journal of Molecular Structure**, Amsterdam, v. 792–793, p. 257–264, 2006.

SZEJTLI, J. **Cyclodextrin inclusion complexes**. In: SZEJTLI, J. Ed. Cyclodextrin Technology. London: Kluwer Academic Publishers, p. 79-185., 1988.

SZEJTLI, J. The cyclodextrins and their applications in biotechnology. **Carbohydrate Polymers**. Budapest, v. 12, p. 375-392, 1990.

TABBAKHIAN M., TAVAKOLI N., JAAFARI M. R., DANESHAMOUZA S. Enhancement of follicular delivery of finasteride by liposomes and niosomes 1. In vitro permeation and in vivo deposition studies using hamster flank and ear models. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 323, p. 1-10. 2006.

TAN X., MELTZER N., LINDENBAUM S. Determination of the kinetics of degradation of 13-*cis*-retinoic acid and all-*trans*-retinoic acid in solution. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Oxford, v. 11, p. 817-822, 1993.

TORCHILIN V. P. Multifunctional nanocarriers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, v. 58, p. 1532–1555, 2006.

USP 30 – NF 25 – United States Pharmacopeial Convention Inc., Rockville, 2007.

UCHEGBU, I.F., VYAS, S.P., Non-ionic surfactant based vesicles (niosomes) in drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 172, p. 33–70, 1998.

VEMURI S., RHODES C. T. Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**. Zurich, v. 70, p. 95-111, 1995.

WEINER A. L. Liposomes as carriers for polypeptides. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, v. 3, p. 307-341, 1989.

YAP K.L., LIU X., THENMOZHIAL, HO P.C. Characterization of the 13-*cis*-retinoic acid / cyclodextrin inclusion complexes by phase solubility, photostability, physicochemical and computational analysis. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, Amsterdam, v. 25 p. 49-56, 2005.

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](#)