



CENTRO UNIVERSITÁRIO FRANCISCANO
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO, PESQUISA E EXTENSÃO
ÁREA DE CIÊNCIAS TECNOLÓGICAS
Curso de Mestrado em Nanociências

MÁRCIA BRUSCHI

**FORMULAÇÕES TÓPICAS CONTENDO NANOCÁPSULAS DE ADAPALENO:
AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE E PERMEAÇÃO CUTÂNEA**

Santa Maria, RS

2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

MÁRCIA BRUSCHI

**FORMULAÇÕES TÓPICAS CONTENDO NANOCÁPSULAS DE ADAPALENO:
AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE E PERMEAÇÃO CUTÂNEA**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Nanociências do Centro Universitário Franciscano de Santa Maria como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Nanociências.

Orientador(a): Prof(a)Dr(a) **MARTA PALMA ALVES**

Santa Maria, RS

2010

ÁREA DE CIÊNCIAS TECNOLÓGICAS

Mestrado em Nanociências

A COMISSÃO EXAMINADORA, ABAIXO-ASSINADA, APROVA A DISSERTAÇÃO:

FORMULAÇÕES TÓPICAS CONTENDO NANOCÁPSULAS DE ADAPALENO:
AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE E PERMEAÇÃO CUTÂNEA

Elaborada por

MÁRCIA BRUSCHI

COMISSÃO EXAMINADORA



Prof^a. Dr^a. Marta Palma Alves - UNIFRA



Prof^a. Dr^a. Solange Binotto Fagan – UNIFRA



Prof^a. Dr^a. Eliana Martins Lima – UFG/GO

Santa Maria, 23 de agosto de 2010.

Ficha Catalográfica

B912f

Bruschi, Márcia

Formulações tópicas contendo nanocápsulas de adapaleno: avaliação da estabilidade e permeação cutânea / Márcia Bruschi ; orientação Marta Palma Alves. – Santa Maria, 2010.

96f. : il.

Dissertação (Mestrado em Nanociências) – Centro Universitário Franciscano.

1. Nanocápsulas 2. Adapaleno 3. Permeação cutânea 4. Estabilidade 5. Formulações semisólidas
I. Alves, Marta Palma. II. Título.

CDU 615.262.1:62-181.4

*Dedico este trabalho à minha família, que em todos os momentos da minha vida , me apoiou e ajudou. A eles que acreditaram nos meus sonhos e apoiaram cada iniciativa, investiram nos meus estudos e contribuíram para minhas conquistas pessoais e profissionais.
Aos que estiveram sempre ao meu lado, amigos, colegas,
pela ajuda e apoio nesses anos de estudo.*

AGRADECIMENTOS

Às colegas farmacêuticas Isabel e Gabriela F. por todo apoio e ajuda prestada e principalmente pela amizade.

À Prof^a Dr^a Marta Palma Alves pela atenção, orientação e ensinamentos, apoiando todos os passos desta pesquisa.

À Prof^a Renata Raffin, à Prof^a Luciane Varini Laporta e à Prof^a Sandra Cadori pela atenção e por serem pessoas dispostas a ajudar.

Às colegas e amigas Adrienne, Danieli, Danielle, Gabriela M, Jerusa, Nara, Rafaeli e Thaís pelo constante apoio nas horas de alegria e principalmente de desânimo.

Às funcionárias Ana, Denise, Franciele e Rosane pelas conversas de descontração e pelo constante bom humor.

Ao pessoal do Laboratório de Controle de Qualidade de Medicamentos, especialmente ao Flábio, pela ajuda prestada durante o estudo.

À professora Ivana Zanella, coordenadora do Mestrado, e a professora Solange Fagan pela ajuda durante o tempo em que foi coordenadora do mestrado, aos professores do programa de Pós Graduação da UNIFRA - Mestrado de Nanociências.

À CAPES pelo apoio financeiro prestado através da concessão de bolsa.

À Rede de Nanotecnologia/Nanocosméticos – CNPq/MCT – UFRGS, pelo apoio e incentivo.

E a todas as pessoas que de uma forma ou de outra contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

A acne é uma doença crônica com desordem inflamatória do folículo pilosebáceo, caracterizada por comedões, pápulas, pústulas e nódulos. Um dos fármacos utilizados para o tratamento é o adapaleno, uma molécula sintética que apresenta menos efeitos colaterais quando comparado a outros retinóides, exercendo uma atividade comedolítica e antiinflamatória apropriada. Mesmo com essas vantagens sobre os demais retinóides, ainda torna-se relevante a administração mais direcionada no sítio de ação, os queratinócitos, objetivando um aumento da atividade do fármaco e uma redução dos efeitos colaterais. Em vista disso, sistemas nanocarreadores têm sido bastante estudados com objetivo de melhorar a seletividade e a eficiência das formulações. Este trabalho teve como objetivo desenvolver, caracterizar e avaliar a estabilidade físico-química, bem como a permeação cutânea de uma formulação semissólida com base de Carbopol 940® contendo adapaleno na forma nanoencapsulada. Para isso, foi necessário um conhecimento em física, química, matemática e farmácia, uma vez que a Nanociência apresenta um caráter interdisciplinar. Todos os estudos foram realizados comparando o adapaleno na forma nanoencapsulada com a forma livre. As amostras foram armazenadas à temperatura ambiente (25 ± 2 °C), geladeira (-4 ± 2 °C) e em estufa (40 ± 2 °C e $75 \pm 5\%$ UR) durante 90 dias e analisadas em 0, 7, 14, 30, 60 e 90 dias com relação às características físico-químicas, organolépticas, reológicas e teor do fármaco. O tamanho médio das partículas ($201,1 \pm 32,8$ nm) armazenadas em temperatura ambiente e geladeira mantiveram-se estáveis durante os noventa dias de análises. Os valores de potencial zeta ($-23,4 \pm 0,2$ mV) e pH ($5,94 \pm 0,16$) permaneceram estáveis para todas as formulações independente da temperatura de armazenamento. As formulações semissólidas independente da forma de dispersão do fármaco apresentaram fluxo não-newtoniano, comportamento pseudoplástico e mantiveram seus valores de doseamento (85 a 98 %) sem alterações durante os 90 dias de experimento. Para os testes de permeação cutânea, foi observado que a maior parte do fármaco ficou retida na superfície e estrato córneo da pele, porém para o fármaco nanoencapsulado ($1,23 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) obteve-se uma maior permeação até a derme e epiderme quando comparada com a forma livre ($0,84 \mu\text{g}/\text{cm}^2$). Através dos resultados, pode-se concluir que a incorporação das suspensões contendo nanocápsulas de adapaleno em uma formulação semissólida utilizando como veículo o Carbopol 940® apresentou características físico-químicas e estabilidade adequada, representando viabilidade tecnológica.

Palavras-chave: nanocápsulas, adapaleno, permeação cutânea, estabilidade, formulações semissólidas.

ABSTRACT

Acne is a chronic disease with an inflammatory disorder of the pilosebaceous follicle, characterized by open and closed comedones, papules, pustules and nodules. One of the drugs used to treat it is adapalene, which has fewer side effects compared to other retinoids, exerting an appropriate anti-inflammatory and comedolytic activity. Even with these advantages over other retinoids it is relevant the use in the exact site of action, the keratinocytes, focusing an increase of the drug activity and a reduction of side effects. As a result, nanocarrier systems have been extensively studied to improve the selectivity and efficiency of the formulations. This study presents as objective developing, characterize and evaluate the physical and chemical stability as well as the release and skin permeation of a semisolid topical formulation with base of Carbopol 940® containing adapalene-loaded nanocapsules. For this, they were needed physics, chemical, mathematics and pharmacy knowledgements, once Nanoscience presents a multidisciplinary character. All studies were performed comparing adapalene-loaded nanocapsules with the free form. The samples were stored at room temperature (25 ± 2 °C), refrigerator (-4 ± 2 °C) and oven (40 ± 2 °C and $75 \pm 5\%$ RH) for 90 days and analyzed at 0, 7, 14, 30, 60 and 90 days in relation to physical-chemical characteristics organoleptic, rheological and drug contents. The average particle size was (201.1 ± 32.8 nm) and was maintained at refrigerator temperature and remained stable during the ninety days of analysis. The values of zeta potential (-23.4 ± 0.2 mV) and pH (5.94 ± 0.16) remained stable for all formulations regardless of storage temperature. The semisolid formulations, independent of the dispersion of the drug, exhibited a non-Newtonian behavior presenting pseudoplastic characteristics and determination of their values (85 a 98 %) remained unchanged during the 90 days of experiment. For release assays and skin permeation it was observed that most of the drug was retained on the surface and stratum corneum of the skin, but the adapalene-loaded nanocapsules obtained a higher permeation into the dermis and epidermis when compared with the free form. Through the results, we can conclude that the incorporation of nanocapsules of adapalene in a semisolid formulation in Carbopol® gels showed satisfactory physical-chemical stability, representing technological feasibility.

Keywords: nanocapsules, adapalene, skin permeation, stability, semi-solid formulations

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Componentes utilizados na preparação das suspensões contendo nanocápsulas de adapaleno	32
Tabela 2 – Composição do gel hidrofílico contendo nanocápsulas de adapaleno.....	33
Tabela 3 – Curva padrão usada para determinação do adapaleno nas suspensões.....	37
Tabela 4 – Valores referentes à caracterização físico-química das suspensões contendo nanocápsulas de adapaleno (NCA) e nanocápsulas sem adapaleno (NCB)	41
Tabela 5 – Diâmetro médio (nm) e índice de polidispersão das nanocápsulas contendo adapaleno após incorporação nas bases semissólidas.....	43
Tabela 6 – Diâmetro médio (nm) e índice de polidispersão das nanocápsulas sem adapaleno após incorporação nas bases semissólidas	44
Tabela 7 – Valores referentes à determinação do potencial zeta para as suspensões contendo nanocápsulas de adapaleno após a incorporação nas formulações semissólidas durante os 90 dias sob armazenamento em temperatura ambiente (TA), geladeira (GE) e estufa (ES).....	45
Tabela 8 – Parâmetros referentes à aparência, cor e odor das formulações semissólidas contendo adapaleno nanoencapsulado e na forma livre armazenados em temperatura ambiente (TA), geladeira (GE) e estufa (ES).....	48
Tabela 9 – Valores de viscosidade (mPa.s) apresentados pelas formulações semissólidas, contendo adapaleno na forma livre e nanoencapsulada durante armazenamento temperatura ambiente (TA), geladeira (GE) e estufa (ES) durante os 90 dias de experimento.....	52
Tabela 10 – Valores referentes ao índice de plasticidade (<i>n</i>) e coeficiente de consistência (<i>k</i>) para as formulações semissólidas contendo adapaleno nanoencapsulado e na forma livre durante 90 dias de armazenamento em temperatura ambiente (TA), geladeira (GE) e estufa (ES)	53
Tabela 11 – Valores referentes à espalhabilidade das formulações contendo adapaleno na forma livre e na forma nanoencapsulada durante 90 dias de armazenamento em temperatura ambiente (TA), geladeira (GE) e estufa (ES)	56
Tabela 12 – Valores referentes ao teor de adapaleno, incorporado nas formulações semissólidas sob armazenamento em temperatura ambiente (TA), geladeira (GE) e estufa (ES)	59
Tabela 13 – Concentração de adapaleno ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) nas diferentes camadas da pele, para as formulações semissólidas contendo o ativo na forma nanoencapsulada e na forma livre (n=9)65	

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química do adapaleno	18
Figura 2 – Fluxograma das metodologias propostas para a realização deste trabalho	31
Figura 3 – Valores iniciais referentes à distribuição do diâmetro (nm) das formulações semissólidas contendo nanocápsulas de adapaleno (NCA) e sem adapaleno (NCB)	43
Figura 4 – Valores referentes ao potencial zeta (-mV) das formulações contendo nanocápsulas de adapaleno (NCA), em 0 (A) e 90 dias de armazenamento em temperatura ambiente (B), geladeira (C) e estufa (D)	45
Figura 5 – Valores referentes ao pH para as formulações semissólidas armazenadas em temperatura ambiente, geladeira e estufa durante os 90 dias de experimento.....	47
Figura 6 – Formulações semissólidas contendo adapaleno nanoencapsulado em 0 dias (A) e após 90 dias de armazenamento em temperatura ambiente (B), geladeira (C) e estufa (D)	49
Figura 7 – Formulações semissólidas contendo adapaleno na forma livre em 0 dias (A) e após 90 dias de armazenamento em temperatura ambiente (B), geladeira (C) e estufa (D).....	50
Figura 8 – Reograma para as formulações contendo nanocápsulas de adapaleno referentes aos valores iniciais e após 90 dias de armazenamento em temperatura ambiente (TA), geladeira (GE) e estufa (ES).....	54
Figura 9 – Reograma para as formulações contendo adapaleno na forma livre referentes aos valores iniciais e após 90 dias de armazenamento em temperatura ambiente (TA), geladeira (GE) e estufa (ES).....	55
Figura 10 – Valores referentes a espalhabilidade apresentada pelas formulações contendo nanocápsulas de adapaleno durante 90 dias de armazenamento em temperatura ambiente (TA), geladeira(GE) e estufa(ES)	56
Figura 11 – Valores referentes a espalhabilidade apresentada pelas formulações contendo adapaleno na forma livre durante 90 dias de armazenamento em temperatura ambiente (TA), geladeira (GE) e estufa (ES).....	57
Figura 12 – Curva padrão do adapaleno obtida por CLAE	59
Figura 13 – Valores referentes ao teor do adapaleno para forma livre e nanoencapsulada durante os 90 dias de análises em temperatura ambiente (TA), geladeira (GE) e estufa (ES). 60	
Figura 14 – Concentração do adapaleno em função do tempo para a formulação semissólida contendo o fármaco na forma livre.....	62
Figura 15 – Concentração do adapaleno em função do tempo para a formulação semissólida contendo o fármaco nanoencapsulado.....	62

Figura 16 – Distribuição do adapaleno nas diferentes camadas da pele quando incorporado em formulações semissólidas na forma livre e nanoencapsulada 66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN – Acetonitrila;

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência;

DP – Desvio Padrão;

DPR – Desvio Padrão Relativo;

ES – Estufa;

GE – Geladeira;

MeOH – Metanol;

NC – Nanocápsulas;

NCA – Nanocápsulas contendo adapaleno;

NCB – Nanocápsulas sem adapaleno (brancas);

P. acnes – *Propionibacterium acnes*;

PCL – Poli (ϵ -caprolactona);

TA – Temperatura Ambiente;

THF – Tetrahidrofurano.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 ACNE	17
2.2 ADAPALENO	19
2.3 ÓLEO DE MELALEUCA.....	20
2.4 PELE E PERMEAÇÃO CUTÂNEA	21
2.5 NANOCARREADORES	24
2.6 ESTABILIDADE DE FORMULAÇÕES SEMISSÓLIDAS.....	26
3 MATERIAS E MÉTODOS	29
3.1 MATÉRIA-PRIMA, SOLVENTE E OUTROS MATERIAIS	29
3.2 APARELHOS E EQUIPAMENTOS	29
3.3 MÉTODOS	30
3.3.1 Preparação de suspensões com nanocápsulas contendo adapaleno.....	31
3.3.2 Avaliação físico-química das suspensões de nanocápsulas contendo adapaleno	32
Determinação do pH.....	32
Distribuição do tamanho das partículas e índice de polidispersão	33
Potencial zeta	33
3.3.3 Preparação das formulações semissólidas contendo nanocápsulas de adapaleno	33
Gel Hidrofílico.....	33
3.3.4 Determinação da estabilidade das bases semissólidas, contendo adapaleno na forma nanoencapsulada e na forma livre	34
3.3.4.1 Determinação da distribuição do tamanho das partículas após a incorporação nas bases semissólidas.....	34
3.3.4.2 Determinação do potencial zeta após a incorporação nas bases semissólidas	34
3.3.4.3 Determinação do pH das formulações, contendo adapaleno na forma livre e nanoencapsulada.....	35
3.3.4.4 Determinação das características organolépticas das formulações contendo adapaleno na forma livre e nanoencapsulada	35
3.3.4.5 Avaliação das características reológicas das formulações semissólidas, contendo adapaleno na forma livre e nanoencapsulada	35
3.3.4.6 Determinação da espalhabilidade das formulações semissólidas, contendo adapaleno na forma livre e nanoencapsulada	36

3.3.4.7 Determinação do teor do adapaleno e do perfil de degradação para as formulações semissólidas	36
Construção da curva padrão	36
Métodos cromatográficos	37
Doseamento das formulações semissólidas, contendo adapaleno na forma livre e nanoencapsulada	37
Determinação do perfil de degradação das formulações semissólidas contendo adapaleno na forma livre e na forma nanoencapsulada	38
3.3.5 Estudos de permeação <i>in vitro</i>	39
Construção da curva padrão para realização dos estudos de permeação.....	39
Estudo de permeação e liberação <i>in vitro</i>	39
Técnica do “Tape Stripping” – Retenção no estrato córneo	40
Técnica de retenção cutânea	40
3.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS DOS RESULTADOS	40
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1 AVALIAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS SUSPENSÕES DE NANOCÁPSULAS CONTENDO ADAPALENO.....	41
4.2 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS DE ESTABILIDADE PARA AS FORMULAÇÕES SEMISSÓLIDAS CONTENDO ADAPALENO NA FORMA NANOENCAPSULADA E NA FORMA LIVRE	42
4.2.1 Determinação da distribuição do tamanho das partículas e índice de polidispersão das formulações semissólidas	42
4.2.2 Determinação do potencial zeta das nanocápsulas contendo adapaleno e incorporadas nas formulações semissólidas	45
4.2.3 Determinação do pH após a incorporação nas bases semissólidas contendo adapaleno na forma livre e na forma nanoencapsulada	47
4.2.4 Determinação das características organolépticas das formulações semissólidas contendo adapaleno na forma livre e nanoencapsulada	48
4.2.5 Determinação das características reológicas das formulações semissólidas contendo adapaleno na forma livre e na forma nanoencapsulada	51
4.3 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ADAPALENO E DO PERFIL DE DEGRADAÇÃO DAS FORMULAÇÕES SEMISSÓLIDAS CONTENDO ADAPALENO	58
Construção da curva padrão para o estudo de doseamento	58

Doseamento das formulações semissólidas contendo adapaleno na forma livre e nanoencapsulada	59
Determinação do perfil de degradação das formulações semissólidas contendo adapaleno nanoencapsulado e na forma livre	61
4.4 ESTUDOS DE LIBERAÇÃO E PERMEAÇÃO <i>IN VITRO</i>	64
5 CONCLUSÃO	69
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72

1 INTRODUÇÃO

A acne é uma das condições inflamatórias crônicas mais comuns que afetam a pele. É predominantemente observada em adolescentes, mas pode afetar homens e mulheres em idade entre 25-40 anos. É uma doença da unidade pilosebácea, que causa um sofrimento psicológico pela sua influência na auto-imagem (VLACHOU e LICHYSHYN, 2006). Ocorre com o aumento da secreção de sebo pelas glândulas sebáceas, provocando o aparecimento de pontos negros denominados comedões principalmente no rosto, costas, peito e ombros. Em muitos casos os poros bloqueados pelos comedões podem infeccionar formando pápulas (HABIF et al, 2002; HABIF, 2005).

O adapaleno é um derivado do ácido naftóico com atividade retinóide, usado no tratamento da acne vulgar, o qual demonstrou possuir propriedades antiinflamatórias em modelos de inflamação *in vivo* e *in vitro* (LIMA, 2004). O adapaleno atua sobre o processo anormal de queratinização e diferenciação epidérmica, induzindo a diferenciação normal das células epiteliais foliculares (KOROLKOVAS, 2002). Este fármaco apresenta menos efeitos colaterais quando comparado a outros retinóides, exercendo uma atividade comedolítica e antiinflamatória apropriada (RIGOPOULOS et al, 2004). Mesmo com essas vantagens sobre os demais retinóides, ainda torna-se relevante a administração do mesmo no sítio de ação, no caso os queratinócitos, objetivando um aumento da atividade do fármaco e uma redução de sua toxicidade e, conseqüentemente, de seus efeitos colaterais, dentre eles a diminuição da irritação cutânea.

Alguns autores têm relatado a utilização do óleo de melaleuca para o tratamento da acne (BASSETT, PANNOWITZ e BARNETSON, 1990; CARSON e RILEY, 1994; SEYED et al., 1999). Este óleo é obtido das folhas de uma árvore de regiões subtropicais e tropicais, a *Melaleuca alternifolia*, e apresenta propriedades antifúngicas, antiinflamatórias, antisépticas e antibacterianas além de uma boa penetração tecidual (CABOI et al., 2002; SIMÕES et al., 2002; VIEIRA et al., 2004; REICHLING et al., 2006).

A pele representa uma importante e atrativa via para administração de medicamentos, sendo considerada como uma via não invasiva. A pele não é só uma via para terapia local, mas também uma via para que fármacos alcancem efeitos sistêmicos (BONINA et al, 2001). A maior limitação dos fármacos para liberação transdérmica é a própria pele, que age como uma barreira, prevenindo a entrada de moléculas estranhas e impedindo a saída de substâncias endógenas. A principal barreira para penetração através da pele é exercida pela camada mais superficial, o estrato córneo e sua compacta estrutura (KALIA et al, 2001; MORGANTI et al,

2001; MOSER et al, 2001).

O desenvolvimento tecnológico de novas formas farmacêuticas tem sido a estratégia mais promissora para aumentar a permanência de fármacos através da pele. A eficácia terapêutica de um fármaco aplicado na pele depende principalmente de sua habilidade de penetração. No caso dos retinóides, onde o sítio de ação é restrito às primeiras camadas, tem-se como objetivo prevenir sua passagem para as camadas mais profundas, obtendo-se apenas um efeito local do ativo (BONINA et al, 2001; FELIPPI, 2008).

Sendo assim, atualmente existe um grande interesse na liberação seletiva de fármacos, em vista disso, sistemas carreadores têm sido bastante estudados com objetivo de melhorar a seletividade e a eficiência das formulações (MONACO, 2000). Dentre estes carreadores, as nanoemulsões, nanoesferas e nanocápsulas vêm ganhando cada vez mais destaque. Nanocápsulas são estruturas constituídas por vesículas contendo um fino invólucro de polímero biodegradável e uma cavidade central com núcleo oleoso, no qual a substância ativa pode encontrar-se dissolvida, ou adsorvida à parede polimérica, sendo por isso, considerada como um sistema reservatório (SCHAFFAZICK et al, 2003).

Diversos estudos têm sido realizados utilizando retinóides associados à nanocarreadores como lipossomas, niossomas, nanocápsulas e nanopartículas lipídicas sólidas (BRISAERT, et al, 2001; MANCONI et al, 2002; MANCONI et al, 2003; IOELE et al, 2005; SINICO et al, 2005; LIU et al, 2006; MANCONI et al, 2006; ALVES et al, 2007a; SHAH et al, 2007; MANDAWGADE e PATRAVALE, 2008; OURIQUE et al, 2008) a fim de melhorar a estabilidade e a eficácia destes fármacos e reduzir os efeitos colaterais por estes causados.

Desse modo não só o desenvolvimento tecnológico, mas a determinação da estabilidade é de extrema importância para prever o comportamento que o fármaco irá apresentar. A metodologia para avaliação dos fármacos contendo o ativo na forma livre é bem estabelecida, porém para os produtos utilizando nanotecnologia, ainda faltam legislações e estudos para garantir a segurança dos mesmos (ANVISA, 2004).

De acordo com o que foi referido anteriormente, este trabalho tem como objetivo desenvolver, caracterizar e realizar estudos de estabilidade físico-química de uma formulação semissólida contendo adapaleno na forma nanoencapsulada, com óleo de melaleuca como núcleo oleoso. Este óleo foi escolhido por poder ser incorporado como ingrediente ativo em formulações tópicas utilizadas para o tratamento da acne (CARSON et al, 2006). Apresentando como objetivo, ainda, avaliar a permeação cutânea “*in vitro*” deste fármaco, utilizando para tal pele de orelha de porco como membrana. Para realização dos estudos de

estabilidade foram analisadas as características organolépticas, reológicas e a quantificação do ativo presente nas formulações semissólidas. Todos os estudos foram realizados comparando o adapaleno na forma nanoencapsulada com a forma livre.

Cabe ressaltar, ainda, que não foram encontrados registros deste fármaco associado a sistemas nanoparticulados poliméricos em formulações plásticas. Por se tratar de um estudo na área de Nanociências, a qual apresenta um caráter interdisciplinar, foi necessário um conhecimento em física, química, matemática e farmácia para a realização deste trabalho, uma vez que o estudo tem como objetivo o desenvolvimento e caracterização de uma nova formulação semissólida de uso tópico.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Este trabalho é uma continuação do estudo realizado por Barrios (2010), que preparou nanocápsulas poliméricas contendo adapaleno através do método de deposição interfacial do polímero pré-formado utilizando diferentes núcleos oleosos. A caracterização, a estabilidade e os estudos de liberação *in vitro* das suspensões poliméricas contendo adapaleno foram realizados. Com estes testes concluídos, as suspensões de nanocápsulas contendo adapaleno e óleo de melaleuca como núcleo oleoso foram incorporadas em bases semissólidas de gel de Carbopol 940[®] para estudos de caracterização, estabilidade e permeação cutânea *in vitro* com a finalidade de avaliar a viabilidade tecnológica desta formulação semissólida.

Por se tratar de uma pesquisa realizada em escala nanométrica existe neste caso, a convergência de diferentes áreas da ciência, como física e química (na parte dos estudos de caracterização e estabilidade físico-química), matemática (ajuste matemático do perfil de degradação e determinação do comportamento reológico) e farmácia (conhecimento referente ao fármaco). Devido a este caráter multidisciplinar, acredita-se que a nanotecnologia tenha o potencial de revolucionar amplamente diversas áreas científicas e tecnológicas. Do ponto de vista científico, as vantagens do uso da nanobiotecnologia na produção de formulações dermatológicas são referentes à proteção de ingredientes quanto à degradação química e enzimática, ao controle de sua liberação e ao prolongamento do tempo de residência dos ativos na camada córnea. Sendo assim, existe um crescimento exponencial de publicações referentes à nanobiotecnologia no desenvolvimento de produtos cutâneos, somando mais de 800 (FRONZA et al, 2007). Este trabalho torna-se relevante devido ao fato de não ter registros na literatura do adapaleno nanoencapsulado incorporado em formulações semissólidas de uso tópico.

2.1 ACNE

A acne vulgar é uma doença multifatorial a qual é mais prevalente em adolescentes e adultos jovens. Alguns relatos estimam que cerca de 90% de todos os adolescentes são afetados pela acne. A acne deixou de ser considerada um mero incômodo da adolescência e passou a ser tratada por dermatologistas como uma condição patológica capaz de acarretar um transtorno psicossocial devido a sua influência na auto-imagem. As lesões da acne são frequentemente distribuídas na face, peito, costas e braços. Esta condição determina um fator importante de stress, principalmente através da alteração da qualidade de vida do paciente em

relação ao seu ambiente social (HASBÚN et al, 2008; OLUTUNMBI et al, 2008).

A acne é uma doença crônica com desordem inflamatória do folículo pilossebáceo, caracterizada por comedões abertos e fechados, pápulas, pústulas e nódulos. O desenvolvimento das lesões da acne ocorre por uma sequência de eventos fisiopatológicos. Pesquisas indicam que a patogênese da acne envolve quatro processos principais: a hiperproliferação folicular, excesso de produção sebácea, inflamação e proliferação de *Propionibacterium acnes*. Acredita-se que o evento estimule a circulação de andrógenos na unidade pilossebácea. A produção de sebo leva à retenção da hiperqueratose que obstrui e dilata os infundíbulos foliculares resultando na formação do comedão. O tamponamento folicular juntamente com a colonização bacteriana do folículo por *Propionibacterium acnes* estimula a formação de mediadores inflamatórios que serão liberados na pele. Lesões inflamatórias incluindo pápulas, pústulas e nódulos se desenvolvem como resultado do acúmulo de neutrófilos, linfócitos e células gigantes de corpo estranho dentro e ao redor da unidade pilossebácea afetada (COLLIER et al, 2008; OLUTUNMBI et al, 2008).

Os objetivos no tratamento da acne são aliviar os sintomas clínicos e evitar o surgimento de cicatrizes, por isso deve ser destinado às causas patogênicas e aos sintomas clínicos. As metas terapêuticas recomendadas são que o fármaco atue reduzindo a produção de sebo, revertendo a hiperproliferação e normalizando a queratinização, reduzindo a colonização de *P. acnes* e a inflamação, prevenindo a formação de comedão, microcomedão. A recomendação é combinar tratamentos para atingir o número máximo de agentes patogênicos (SHAMBAN e NARURKAR, 2009).

De acordo com Azulay e Azulay (2006), o grupo brasileiro de acne estabeleceu associações de tratamento onde o uso de retinóides tópicos está presente em todas as combinações, atuando como um tratamento fundamental para a maioria dos pacientes com acne. A terapia tópica é considerada o padrão para prevenção, porque os retinóides reduzem a obstrução folicular e são importantes agentes no tratamento comedonal e da acne inflamatória (SHAMBAN e NARURKAR, 2009).

Desde 1962 os retinóides tópicos são utilizados no tratamento da acne, o primeiro a ser usado foi a tretinoína, porém devido ao seu potencial irritante cutâneo, foram sintetizados novos fármacos com melhor tolerabilidade. Atualmente, os retinóides mais frequentemente prescritos são a isotretinoína, tazaroteno, tretinoína, adapaleno, motretinida, retinol β -glucuronida e o retinaldeído. Além dos retinóides, existem outras alternativas de tratamento tópico para a acne. Antibióticos tópicos foram amplamente usados no passado, mas devido ao fato de causarem resistência bacteriana, devem ser utilizados somente por períodos curtos de

tempo ou em associação com peróxido de benzoíla ou ácido azelaico. Alfa-hidróxi-ácidos e ácido salicílico podem ser usados em algumas circunstâncias (KRAURTHEIM e GOLLNICK, 2004).

2.2 ADAPALENO

Com o nome químico de ácido 6-[3-(1-adamantyl)-4-methoxyphenyl]-2-naftóico e fórmula molecular $C_{28}H_{28}O_3$, o adapaleno (figura 1) é um derivado do ácido naftóico (ROSSO, 2004). O adapaleno é um pó branco solúvel em tetrahidrofurano, ligeiramente solúvel em etanol e praticamente insolúvel em água. É essencialmente estável ao oxigênio e a luz, sendo excretado por via biliar (GALDERMA, 2003; LIMA, 2004; PISKIN e UZUNALI, 2007).

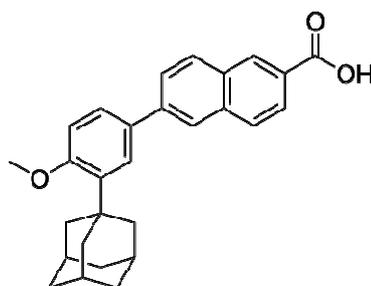


Figura 1 – Estrutura química do adapaleno (MILLIKAN, 2001).

O adapaleno é uma molécula sintética que pertence à terceira geração de retinóides. Apresenta algumas características biológicas parecidas com as da tretinoína, porém apresenta propriedades físico-químicas diferentes incluindo o aumento da estabilidade química e frente à luz e elevada lipofilicidade. Pode modular a queratinização celular e os processos inflamatórios. Este último efeito é devido à inibição da atividade da lipoxigenase e também, do metabolismo oxidativo do ácido araquidônico. Estes mecanismos podem contribuir para a redução do risco do adapaleno provocar eritema e irritação na pele. O adapaleno é caracterizado por uma baixa absorção percutânea uma vez que o medicamento tenha penetrado no estrato córneo, de modo que se torne preso a epiderme e ao folículo piloso, que é a área de segmentação (RIGOPOULOS et al, 2004).

Os retinóides agem nos queratinócitos através da ligação e ativação de receptores específicos, os receptores ácido retinóicos (RARs) e os receptores X Retinóicos (RXRs), onde cada um apresenta três subtipos α , β e γ . O adapaleno foi projetado para penetrar na unidade pilosebácea e é melhor tolerado do que qualquer outro retinóide estudado até agora uma vez

que se liga seletivamente aos subtipos α e γ do receptor nuclear ácido retinóico (RAR) (CZERNIELEWSKI et al, 2001). O adapaleno aplicado topicamente é comedolítico, tem efeitos nos processos anormais de queratinização e diferenciação epidérmica, atuando nos dois mecanismos presentes na patogênese da acne vulgar. O modo de ação do adapaleno parece estar na normalização da diferenciação das células do epitélio folicular, resultando em diminuição da formação dos comedões. Ele inibe as respostas quimiotáticas e quimiocinéticas dos leucócitos polimorfonucleares humanos e também o metabolismo por lipoxidação do ácido araquidônico para mediadores pró-inflamatórios (KOROLKOVAS, 2002; LIMA, 2004; SHAMBAN e NARURKAR, 2009).

Adapaleno tópico está descrito como substância retinóica pela ANVISA, e de acordo com a Resolução nº 33, de 14 de janeiro de 2000, está sujeito a venda sob prescrição médica sem retenção de receita. Apresenta-se na forma de loção ou gel a 0,1%, sendo aplicado uma vez ao dia (ANVISA, 2005). O fármaco penetra rapidamente na unidade pilosebácea podendo apresentar alguns efeitos indesejáveis, onde a irritação da pele é a mais comum, sendo reversível quando ocorrer diminuição do tratamento ou ainda a sua interrupção (KOROLKOVAS, 2002; LIMA, 2004).

Estudos referentes à absorção cutânea observaram que, apenas vestígios de adapaleno são absorvidos após aplicação tópica, motivo pelo qual provavelmente, se deve seu baixo nível de irritação (BERSHAD, 2001). Allec e colaboradores (1997) estudaram o perfil de distribuição do adapaleno quando administrado topicamente e observaram que a maior parte da concentração foi recuperada. Foram detectados em torno de 4,3% da dose aplicada na epiderme e no estrato córneo, sendo assim os autores concluíram que o gel contendo 0,1% de adapaleno pode oferecer um bom índice terapêutico, garantindo a biodisponibilidade do adapaleno na pele e na unidade pilosebácea e mostrando uma excelente tolerância local.

2.3 ÓLEO DE MELALEUCA

O óleo de melaleuca é um óleo essencial obtido pelo vapor da destilação das folhas da árvore nativa australiana *Melaleuca alternifolia* (Myrtaceae), que é utilizado na medicina tradicional australiana e mais recentemente em todo o mundo, uma vez que vem ganhando a atenção de cientistas, médicos e consumidores devido à sua ampla atividade antimicrobiana e antiinflamatória (KWIECINSKI et al, 2009; NARDONI et al, 2010).

O óleo de melaleuca é uma mistura complexa de cerca de 100 diferentes compostos principalmente monoterpenos e seus álcoois correspondentes, onde o principal constituinte

é o terpinen-4-ol (30-40%), o qual apresenta atividade antibacteriana (REICHLING et al, 2006; KWIECINSKI et al, 2009).

Este óleo é conhecido por apresentar diversas propriedades medicinais incluindo antibacteriana, antifúngica, antiviral, antiinflamatória e propriedades analgésicas. Recentemente, ganhou popularidade como um agente antimicrobiano de uso tópico. É utilizado ainda em uma concentração de 5% para o tratamento tópico de acne e de onicomicoses de unha, além disso, também foi relatado um efeito anti-herpético quando aplicado em uma formulação de gel a 6%. Também é recomendado como um agente anti-séptico em prótese e enxague bucal, e para o tratamento de furunculose e vaginite (REICHLING et al, 2006).

Uma série de medicamentos e cosméticos presentes no mercado, bem como um aumento do número de publicações sobre a penetração de seus principais componentes mostram o aumento do interesse deste óleo, que é aplicado sobre a pele em várias formas (CAL, 2008). Devido à sua natureza lipofílica, que facilita a penetração da pele, o óleo de melaleuca é utilizado em formulações tópicas para diferentes doenças dermatológicas conforme citado anteriormente (NARDONI et al, 2010).

2.4 PELE E PERMEAÇÃO CUTÂNEA

A pele é o maior órgão do corpo humano, correspondendo cerca de 5% do peso total do indivíduo, age como um envoltório de proteção ao meio externo e como um controlador da perda de fluidos corporais, evitando assim a entrada de substâncias estranhas e nocivas ao organismo. Desta maneira, a pele atua como uma capa protetora e uma barreira impermeável para muitas substâncias (GONCHOROSKI e CORRÊA, 2005).

A pele é composta por três camadas de tecidos: epiderme (camada superficial), derme e hipoderme (gordura subcutânea) (HERNANDEZ e MERCIER-FRESNEL, 1999). A camada ultraperiférica da pele, o estrato córneo (SC) com densidade de 15 a 20 μm , funciona como uma barreira física constantemente renovável, que protege o corpo da perda excessiva de água e da invasão de substâncias químicas e biológicas. Sendo assim, o estrato córneo constitui o principal obstáculo para a penetração de ativos hidrofílicos, enquanto a epiderme viável, que se localiza logo abaixo do estrato córneo, confere maior resistência às substâncias altamente lipofílicas. As substâncias lipofílicas permeiam mais facilmente através da pele devido a barreira às substâncias hidrofílicas ser mais eficiente. (RHEIN et al 2000; MOSER et al, 2001; FRONZA, 2006; RAWLINGS et al, 2008; CAUSSIN et al, 2008).

Os possíveis mecanismos de permeação de um fármaco através da pele podem ser entre os lipídios do estrato córneo, chamada de permeação transcelular, pelos lipídios do estrato córneo, chamada de permeação intercelular e ainda através de glândulas e folículos, chamada de permeação transpendicular (CHORILLI et al, 2007). O caminho de penetração de micropartículas depende de seu diâmetro médio. Sendo assim, após uma aplicação tópica, partículas entre 3 a 10 μm penetram seletivamente nos ductos foliculares, enquanto as partículas maiores do que 10 μm permanecem na superfície da pele e as partículas menores que 3 μm são distribuídas aleatoriamente no estrato córneo e nos folículos pilosos (ALLEC et al, 1997).

O conhecimento da eficácia tópica da penetração de substâncias aplicadas na pele é muito importante para o desenvolvimento e otimização de produtos tópicos. Apesar de nas últimas décadas a penetração de substâncias através do estrato córneo foi assumida como uma difusão dentro das camadas lipídicas envolvendo os corneócitos, estudos recentes atribuíram aos folículos pilosos um papel importante na penetração através da pele. Vários estudos *in vivo* e *in vitro* revelaram uma influência significativa dos folículos pilosos no processo de penetração, onde autores encontraram maiores taxas de absorção em áreas da pele com maior densidade de folículos e uma diminuição na absorção percutânea em pele cicatrizada quando comparada com pele normal (LADEMANN et al, 2007).

As substâncias que atravessam o estrato córneo podem se concentrar em regiões mais profundas e subcutâneas, favorecendo assim o efeito local. Em algumas circunstâncias, a substância pode se ligar entre as camadas da epiderme ou da derme, formando assim um reservatório que pode ser considerado um compartimento farmacocinético (FRONZA, 2006).

Além das propriedades físico-químicas, as características do veículo e o estado fisiológico da pele também podem afetar a liberação transdérmica do fármaco no tecido doente. Dentre as características que interferem na permeação do ativo referentes ao estado fisiológico da pele estão o local da aplicação do produto, a idade e condições da pele, o grau de hidratação e vascularização e a temperatura da pele. O estrato córneo representa uma maior ou menor barreira de acordo com a região em que a formulação é aplicada devido à variação da espessura que este apresenta dependendo da região da pele (SAMPAIO e RIVITTI, 2000; BARRY, 2005; FRONZA, 2006).

Para aplicação tópica, a liberação imediata pode ser útil para melhorar a penetração de uma substância, enquanto que a liberação sustentada é importante para substâncias ativas que possam causar irritação em concentrações altas ou que devam suprir a pele por um período prolongado de tempo (JENNING et al, 2000).

Quando se faz uso de formulações tópicas espera-se que o fármaco alcance apenas o tecido alvo, mantendo as concentrações terapêuticas do fármaco na pele, sem o risco de induzir efeitos secundários devido à exposição sistêmica (KREILGAARD, 2002).

Estudos têm sido realizados com objetivo de avaliar a permeação cutânea de sistemas nanoestruturados. Manconi e colaboradores (2006) realizaram estudos de permeação cutânea e retenção da tretinoína na pele quando o ativo estava incorporado a niossomas, onde foi observado que a composição dos niossomas é muito importante para melhorar a permeação cutânea de um fármaco lipofílico como a tretinoína e que niossomas carregados negativamente têm se mostrado capazes de melhorar a retenção da droga na pele, especialmente se comparado a formulação comercial, o RetinA[®]. Liu e colaboradores (2006) estudaram a permeação *in vitro* de nanopartículas lipídicas sólidas contendo isotretinoína e concluíram que este tipo de sistema evitou a absorção sistêmica da isotretinoína na pele. A técnica de *tape stripping* foi utilizada para avaliar a penetração cutânea do fármaco nanoencapsulado comparada com a forma livre, após aplicação tópica do gel hidrofílico contendo as nanopartículas. Os autores concluíram que a retenção no estrato córneo após 15 minutos foi maior quando o ativo estava incorporado à nanocápsulas (FELIPPI, 2008).

As nanopartículas são adequadas para penetrar de forma eficiente nos folículos pilosos, atingindo as estruturas mais profundas onde podem ser armazenadas por alguns dias. No caso das partículas maiores, um efeito a longo prazo não pode ser observado nem nos folículos pilosos nem no estrato córneo. Em princípio, o estrato córneo não é adequado como um reservatório a longo prazo de substâncias aplicadas topicamente, uma vez que estas substâncias localizam-se principalmente na superfície da pele ou nas camadas celulares superiores, após aplicação tópica. O folículo piloso representa um eficiente reservatório a longo prazo para substâncias aplicadas topicamente e, por conseguinte, são alvos importantes na entrega de ativos, já que são cercados por uma densa rede de capilares sanguíneos e células dendríticas. Portanto, selecionando o tamanho correto das partículas utilizadas como carreadoras dos ativos torna-se possível uma liberação seletiva do fármaco com um armazenamento eficiente (LADEMANN et al, 2007).

Formulações e métodos com capacidade de inibir a absorção percutânea dos agentes retinóides podem minimizar os efeitos colaterais locais, sem comprometer a eficácia do tratamento (BERSHAD, 2001).

A liberação controlada de fármacos nanoencapsulados quando aplicados topicamente para o tratamento de doenças dermatológicas, pode propiciar um tratamento diretamente no local da afecção, possibilitando a redução da absorção sistêmica e dos efeitos colaterais em

sítios não específicos, proporcionando índices terapêuticos mais adequados e ainda podendo suprir a pele por um período de tempo prolongado. Uma das vantagens da utilização de nanocápsulas, as quais representam um sistema reservatório, é o confinamento do fármaco na cavidade oleosa, garantindo assim uma liberação sustentada do ativo, o qual apresentará menor irritação sobre o local administrado, além da proteção de degradação após a administração (FELIPPI, 2008).

2.5 NANOCARREADORES

Partículas usadas como transportadores de fármacos para aplicações terapêuticas devem ser biocompatíveis, biodegradáveis e fisicamente estáveis (HODOSHIMA et al, 1997). Nos últimos anos, sistemas utilizando micro ou nanopartículas para liberação de fármacos, foram desenvolvidos como uma das estratégias mais promissoras para alcançar o local específico de atuação. Sistemas nanoestruturados estão sendo propostos, como carreadores coloidais usados para liberar vários fármacos na pele e no estrato córneo. Uma liberação sustentada do fármaco poderá suprir a pele por um período de tempo mais prolongado, podendo-se também considerar que um tratamento no local afetado é capaz de reduzir a absorção sistêmica e os efeitos colaterais (JALÓN et al, 2001a; 2001b; COUVREUR et al, 2002).

Nanopartículas podem ser definidas como sendo sistemas submicrométricos coloidais, geralmente constituídos por polímeros (biodegradáveis ou não). De acordo com a composição e o processo utilizado podem ser preparadas nanopartículas lipídicas sólidas, nanoesferas ou nanocápsulas (BRIGGER et al, 2002).

Denominam-se nanoesferas aqueles sistemas em que o fármaco encontra-se homogeneamente disperso ou solubilizado no interior da matriz polimérica. Desta forma obtém-se um sistema monolítico, onde não é possível identificar um núcleo diferenciado. Nanocápsulas, ao contrário, constituem os chamados sistemas do tipo reservatório, onde é possível identificar um núcleo diferenciado. Neste caso, a substância encontra-se envolvida por uma membrana, geralmente polimérica, isolando o núcleo do meio externo (AZEVEDO, 2002).

As nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) foram introduzidas como um importante sistema transportador para vários ingredientes ativos de formas farmacêuticas e cosméticas. São capazes de proteger compostos instáveis da degradação e liberar os ativos de uma maneira imediata ou controlada (WISSING e MÜLLER, 2003).

Os lipossomas têm sido amplamente utilizados como veículo em formulações cosméticas por sua estrutura proporcionar a encapsulação de ativos hidrofílicos e lipofílicos. Os lipossomas podem ser unilameras, quando as vesículas são compostas de uma única bicamada lipídica ou podem ser ainda, multilamelares, quando as vesículas são compostas por bicamadas múltiplas concêntricas (FENDLER, 1982; OLIVEIRA e SCARPA, 1992; OLIVEIRA, 1993; VEMURI e RHODES, 1995; OLIVEIRA, SCARPA e LEITE, 1997).

Os niossomas são vesículas constituídas por tensoativos e vêm ganhando cada vez mais destaque por apresentarem vantagens frente aos lipossomas como uma maior estabilidade química, aumento das propriedades de penetração cutânea e um custo mais baixo. Os niossomas parecem ser um veículo muito promissor para entrega de fármacos por via dérmica ou transdérmica (LASIC, 1993; MANCONI et al, 2002).

Diversos grupos de pesquisa têm realizado trabalhos associando os retinóides aos sistemas nanoestruturados. Ourique e colaboradores (2008) avaliaram a caracterização físico-química e a estabilidade de nanocápsulas de tretinoína. O objetivo deste estudo foi preparar e caracterizar nanocápsulas contendo duas diferentes fases oleosas e avaliar seu potencial como sistema de liberação tópica para melhorar a estabilidade da tretinoína contra a fotodegradação induzida por luz ultravioleta. Os autores concluíram que as nanocápsulas contendo tretinoína melhoraram a estabilidade do fármaco, independente da fase oleosa utilizada.

Estudos referentes à estabilidade química da tretinoína em lipossomas, avaliados durante um ano, demonstraram que não houve diminuição considerável no teor do fármaco. Além disso, a foto-degradação do fármaco na forma de lipossoma foi cerca de duas vezes mais lenta que a tretinoína dispersa no óleo de mamona. Quanto aos estudos relacionados à permeação cutânea os autores observaram que a liberação da tretinoína pode ser afetada por diversos fatores incluindo a composição da vesícula, morfologia e tamanho. Em particular, tem sido demonstrado que lipossomas carregados negativamente melhoraram a hidratação da pele de suínos recém nascidos e a retenção de tretinoína (BRISAERT et al, 2001; SINICO et al, 2005).

Estudos também associaram a tretinoína aos niossomas onde a influência da composição, a preparação, a caracterização, a liberação *in vitro* e a fotoestabilidade dos sistemas nanoestruturados foram avaliados (MANCONI et al, 2002 e 2003). O método de preparo e a composição da bicamada lipídica influenciaram os tamanhos dos niossomas. A liberação *in vitro* da tretinoína, a partir das formulações, foi estudada utilizando células de difusão vertical tipo Franz. Os autores concluíram que a entrega da tretinoína é principalmente afetada pela estrutura vesicular, aumentando respectivamente das

multilamelares (MLVs) para unilamelares de tamanho grande (LUVs) e unilamelares de tamanho pequeno (SUVs). Os resultados mostraram que a estabilidade da TRA pode ser melhorada através de sua incorporação em bicamadas vesiculares. No entanto, a estabilidade da droga fotossensível nas suspensões vesiculares é afetada pelas propriedades das vesículas. Portanto, a composição e a estrutura das vesículas devem ser consideradas nas formulações em que os ativos apresentam fotossensibilidade.

A tretinoína também já foi associada à NLS por Mandawgade e Patravale (2008), onde as nanopartículas foram caracterizadas e avaliadas com relação ao potencial de liberação tópica. Neste tipo de sistema foi observado pequena irritação, maior tolerância da pele e liberação lenta do ativo, quando o gel contendo NLS de tretinoína foi administrado.

Alves e colaboradores (2007a) encapsularam a isotretinoína em lipossomas unilamelares com o propósito de realizar investigações farmacológicas e farmacocinéticas que pudessem comprovar a otimização do efeito terapêutico da isotretinoína. Além disso, avaliaram a eficiência de encapsulação e observaram que a presença de colesterol na preparação de lipossomas reduz a eficiência de encapsulação do fármaco devido a sua localização preferencial na bicamada lipídica, que parece exercer competição com a isotretinoína.

É cada vez mais comum o estudo e surgimento de produtos e fármacos fazendo uso da nanotecnologia, porém até o presente momento não existem legislações normativas que regulamentem os registros de produtos com esta tecnologia (FRONZA et al, 2007). Sendo assim, existe a necessidade de se fazer pesquisas que venham a contribuir sobre a segurança e eficácia destes produtos.

2.6 ESTABILIDADE DE FORMULAÇÕES SEMISSÓLIDAS

Além dos estudos de liberação e permeação cutânea, os testes de estabilidade dos produtos são de suma importância por fornecerem indicações sobre o comportamento do produto, em determinado intervalo de tempo, frente a condições ambientais que visam acelerar as alterações a que possa ser submetido, desde a fabricação até o término da validade. Os produtos expostos ao consumo para não colocarem em risco a saúde dos consumidores, devem passar por testes capazes de determinar as características organolépticas, físico-químicas e/ou microbiológicas, visto que é pelo estudo do perfil de estabilidade de um produto que se torna possível avaliar seu desempenho, segurança e eficácia. É considerado um procedimento preditivo e como tal, os resultados não são absolutos, mas têm probabilidade de

sucesso (ANVISA, 2004).

Independentemente do processo de preparação para obtenção das nanopartículas poliméricas, os produtos são obtidos como suspensões coloidais aquosas, as quais normalmente não possuem tendência à separação de fases. Entretanto, durante o tempo de armazenamento, as nanopartículas podem sofrer agregação, resultando na formação de precipitados. Além disso, problemas de estabilidade química do polímero ou das demais matérias-primas, também podem ocorrer. A consequência de uma estabilidade físico-química limitada, em função do tempo, constitui um obstáculo para a aplicabilidade industrial das suspensões aquosas de nanopartículas (SCHAFFAZICK et al, 2003).

Todos os componentes da formulação podem afetar a estabilidade do produto, além dos fatores extrínsecos como o tempo, temperatura, umidade, luz e oxigênio e fatores intrínsecos como pH, interação entre os componentes da formulação e hidrólise. Para a realização dos testes de estabilidade, as condições de armazenagem mais comuns em que as amostras são submetidas envolvem, alterações de temperatura (ambiente, elevada, baixa), exposição à luz e ciclos de congelamento e descongelamento. Nessas condições, a ocorrência de alterações físico-químicas é freqüente e até mesmo esperada, portanto os resultados obtidos devem ser avaliados cuidadosamente (ANVISA, 2004).

O tamanho de partícula, o potencial zeta, o pH, a distribuição da massa molar do polímero e o teor de fármaco são geralmente os parâmetros físico-químicos que podem ser utilizados para monitorar a estabilidade das suspensões coloidais poliméricas (SCHAFFAZICK et al, 2003).

As nanopartículas podem ser obtidas por diferentes métodos de preparo, mas geralmente, apresentam uma distribuição unimodal, com um baixo índice de polidispersão, apresentando diâmetro médio do tamanho de partícula entre 100 e 300 nm. Para a determinação da distribuição de tamanho das nanopartículas pode-se utilizar microscopia eletrônica ou espectroscopia de correlação de fótons (JAEGHERE, et al, 2000; SCHAFFAZICK et al, 2002).

O potencial zeta é determinado através de técnicas de eletroforese e representa o potencial de superfície das partículas, o qual é influenciado por mudanças na interface com o meio dispersante, em razão da dissociação de grupos funcionais na superfície da partícula ou da adsorção de espécies iônicas presentes no meio aquoso da dispersão (SCHAFFAZICK et al, 2003).

Outro parâmetro importante de ser avaliado nos estudos de estabilidade são as características reológicas das formulações. A reologia consiste na análise do escoamento ou

deformação do material em estudo, quando submetido a uma tensão. Na área farmacêutica, esta avaliação torna-se indispensável para a compreensão de diferentes fenômenos como viscosidade, espalhabilidade, elasticidade e fluidez. A compreensão adequada dos materiais farmacêuticos permite o entendimento de diferentes processos tecnológicos, permitindo uma maior eficácia no desenvolvimento e desempenho das formas farmacêuticas (IFSCC, 1997; LACHMAN et al, 2001; FERRONY, 2009).

As características organolépticas e reológicas de formulações tópicas são fundamentais para a aceitação dos consumidores, visto que formulações com uma textura agradável e de fácil espalhabilidade na pele são cada vez mais exigidas pelo consumidor (LUCERO et al, 1995; MARTINEZ, et al, 2007).

Considerando os principais fatores responsáveis pela degradação de um produto farmacêutico, é possível acelerar esta degradação visando avaliar o prazo de validade do mesmo, prazo este que é caracterizado como o período de vida útil, durante o qual o produto mantém suas características originais. Antes de ser um requisito legal, é, sobretudo, um requisito técnico de qualidade, porque um produto instável do ponto de vista físico-químico, microbiológico ou toxicológico, além da perda da eficácia, pode ainda causar algum dano e comprometer a confiabilidade do consumidor (ANVISA, 2004; MANFIO, et al, 2007).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATÉRIAS-PRIMAS, SOLVENTES E OUTROS MATERIAIS

- Acetona P.A – Nuclear®;
- Acetonitrila grau CLAE – J.T. Baker®;
- Ácido fosfórico P.A – Nuclear®;
- Adapaleno – Pharma Nostra®;
- Carbopol 940® (polímero de ácido acrílico) – Henrifarma®;
- Fita adesiva – Scotch 3 M®;
- Membrana biológica – Pele de porco;
- Membrana em polivinilideno 0,45 µm de poro – Millipore®;
- Metanol grau CLAE – J.T. Baker®;
- Metilparabeno – Alpha Química®;
- Monoestearato de sorbitano (Span 60®) – Sigma Aldrich®;
- Óleo de Melaleuca – Via Farma®;
- Poli (ε-caprolactona) $M_w = 65000$ – Aldrich®;
- Polissorbato 80 (Tween 80®) – Via Farma®;
- Propilenoglicol – Alpha Química®;
- Propilparabeno – Alpha Química®;
- Sorbitol – Alpha Química®;
- Tampão pH 4,0 - Digimed®;
- Tampão pH 7,0 – Digimed®;
- Tetrahidrofurano grau CLAE - J.T. Baker®;
- Trietanolamina – Via Farma®;

3.2 APARELHOS E EQUIPAMENTOS

- Agitador magnético - Fisatom® Mod. 752^a;
- Aparato vertical para adaptação da célula de difusão tipo *Franz*, acoplado com banho-maria e chapa de agitação – Quimiserve®;
- Balança analítica AX 200 - Shimadzu®;
- Bomba de vácuo – modelo 131, Prismatec®;
- Câmara climatizada TE 4001 - Tecnal®;

- Centrífuga TDL80-2B - Centribio[®];
- Coluna cromatográfica – Lichrospher[®] 100 RP – 18,250 mm, 4,0 mm, 5 µm - Merck[®];
- Cromatógrafo líquido de Alta Eficiência – CLAE - Cromatógrafo líquido Young Lin Instrument, modelo YL9100 CLAE System, equipado com bomba modelo YL9110, detector com comprimento de onda variável UV/VIS modelo YL9160;
- Evaporador rotatório 801 - Fisatom[®];
- Lavadora Ultra-sônica - Unique[®];
- Placas de vidro (espalhabilidade);
- Potenciômetro - Digimed[®];
- Purificador de água Milli-Q A10[®], Millipore;
- Vidrarias calibradas;
- Viscosímetro rotacional – RV DV-1+ Brookfield;
- Vórtex P56 - Phoenix[®];
- Zetasizer[®] – Nano-ZS – Malvern.

3.3 MÉTODOS

A Figura 2 representa um fluxograma das atividades propostas para realização deste trabalho.

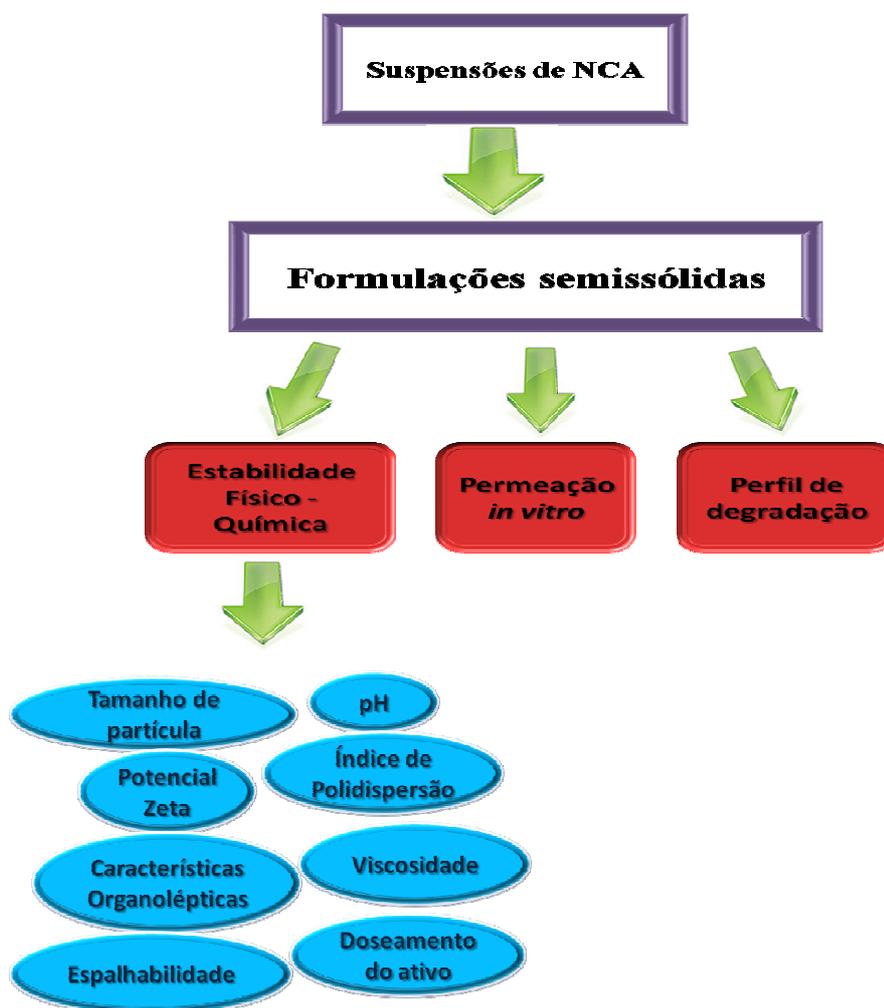


Figura 2 – Fluxograma das metodologias propostas para a realização deste trabalho.

3.3.1 Preparação das suspensões contendo nanocápsulas de Adapaleno

As suspensões de nanocápsulas contendo adapaleno foram preparadas de acordo com o método de deposição interfacial de polímero pré-formado (FESSI, PUISIEUX e DEVISSAGUET, 1988), sendo desenvolvidas e caracterizadas previamente por Barrios (2010), utilizando os componentes e concentrações descritos na Tabela 1.

Tabela 1 – Componentes utilizados na preparação das suspensões de nanocápsulas contendo adapaleno

Fase Orgânica	Quantidade
Adapaleno	30 mg
Poli- ϵ -caprolactona (PCL) $\overline{M}_w = 65000$	1000 mg
Monoestearato de sorbitano	766 mg
Óleo de Melaleuca	3102 mg
Acetona	267 mL
Fase Aquosa	
Polissorbato 80	766 mg
Água MilliQ [®]	533 mL

Os componentes da fase orgânica foram pesados e colocados em um béquer e mantidos sob agitação magnética em banho-maria à temperatura de 40 °C até completa dissolução de todos os componentes. A fase orgânica foi vertida sobre a fase aquosa, com auxílio de um funil, e mantida sob agitação mecânica moderada.

A suspensão foi agitada durante 10 minutos e concentrada a um volume final de 100 mL em um evaporador rotatório para eliminação do solvente orgânico e ajuste da concentração final de adapaleno, sendo a mesma correspondente a 0,3 mg de adapaleno por mL de suspensão. Estas suspensões foram feitas em triplicata.

Para efeito comparativo, foram preparadas suspensões brancas, sem a adição de adapaleno, sendo estas preparadas através do mesmo método.

3.3.2 Avaliação físico-química das suspensões de nanocápsulas contendo adapaleno

No presente trabalho, os testes de caracterização foram realizados com o objetivo de comparar com os resultados obtidos anteriormente por Barrios (2010). As suspensões contendo as nanocápsulas de adapaleno foram analisadas com relação ao pH, à distribuição do diâmetro médio das partículas, índice de polidispersão e potencial zeta.

Determinação do pH

A determinação do pH foi realizada em potenciômetro previamente calibrado com solução tampão pH 4,0 e 7,0 e as medidas foram realizadas diretamente nas suspensões. Os resultados foram expressos pela média das três determinações.

Distribuição do tamanho das partículas e índice de polidispersão

As determinações do diâmetro médio e do índice de polidispersão das nanocápsulas em suspensão foram realizadas através de espalhamento de luz dinâmico. As suspensões foram diluídas 500 vezes (v:v) em água ultra pura, para análise no equipamento, Zetasizer[®], Nano-ZS da Malvern. Os resultados foram determinados através da média de três repetições.

Potencial Zeta

O potencial zeta das suspensões de nanocápsulas foi obtido através de eletroforese. As suspensões de nanocápsulas foram diluídas 500 vezes (v:v) em uma solução de NaCl 10 mM, previamente filtrada através de membrana com 0,45 µm. As leituras foram realizadas no equipamento Zetasizer[®], Nano-ZS da Malvern. Os resultados foram obtidos através da média de três determinações.

3.3.3 Preparação das formulações semissólidas contendo nanocápsulas de adapaleno

Gel Hidrofílico

Os componentes utilizados na preparação do gel hidrofílico contendo as nanocápsulas de adapaleno estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2 – Composição do gel hidrofílico contendo nanocápsulas de adapaleno

Componentes	Concentração (%)
Dispersão de Carbopol 940 [®] a 6%*	8
Solução de Nipagin/Nipazol [®]	1
Sorbitol	5
Trietanolamina	0,03
Suspensão de nanocápsulas contendo adapaleno (0,3mg/mL)	85,97

*6g de Carbopol 940[®], 1g de conservante e 93mL de água.

O gel hidrofílico foi preparado substituindo-se a água pela suspensão de nanocápsulas contendo adapaleno. Primeiramente foi adicionado à dispersão de Carbopol 940[®] a trietanolamina e o sorbitol. Posteriormente adicionou-se aos poucos a suspensão de nanocápsulas de adapaleno e homogeneizou-se. Por último acrescentou-se o conservante e verificou-se o pH. A concentração final de adapaleno na formulação foi de 0,25 mg/g do gel

hidrofílico.

Com o objetivo de comparar os resultados das formulações nas quais foram incorporadas o fármaco nanoestruturado, foram preparados veículos com o adapaleno na forma livre. Nesta formulação, o adapaleno (0,0255%) foi homogeneizado em monoestearato de sorbitano (0,766%) e polissorbato 80 (0,766%) e foram adicionados à dispersão de Carbopol 940[®] a 6% (8%) e à trietanolamina (0,03%). Logo após adicionou-se a água MilliQ[®] (84,4125%), o sorbitol (5%) e a solução conservante (1%). Por último verificou-se o pH. A concentração final obtida foi de 0,25 mg/g de gel hidrofílico. Todas as formulações semissólidas foram preparadas em triplicata.

3.3.4 Determinação da estabilidade das bases semissólidas, contendo adapaleno na forma nanoencapsulada e na forma livre

As formulações semissólidas submetidas ao estudo de estabilidade foram armazenadas em temperatura ambiente (25 ± 2 °C), geladeira (-4 ± 2 °C) e estufa (40 ± 2 °C). Os parâmetros analisados foram: características organolépticas (aparência, cor e odor), pH, teor, espalhabilidade e viscosidade. Foram determinados ainda o diâmetro médio das nanopartículas, índice de polidispersão e potencial zeta. Os testes foram realizados com as formulações, contendo adapaleno na forma nanoencapsulada e na forma livre. As leituras foram realizadas nos tempos 0, 7, 14, 30, 60 e 90 dias.

3.3.4.1 Determinação da distribuição do tamanho das partículas após a incorporação nas bases semissólidas

A determinação do diâmetro médio e da polidispersão das nanocápsulas contidas nos veículos semissólidos foi realizada através de espalhamento de luz dinâmico. Para tanto, as amostras de gel hidrofílico contendo as nanocápsulas de adapaleno foram diluídas 500 vezes (m/v) em água ultra pura. As soluções foram submetidas ao vortex até sua completa homogeneização. Para efeito comparativo analisou-se também as formulações contendo nanocápsulas sem o fármaco. Os resultados foram obtidos através da média de três repetições.

3.3.4.2 Determinação do potencial zeta após a incorporação nas bases semissólidas

O Potencial Zeta das formulações contendo suspensões de nanocápsulas foi obtido

através de eletroforese (Zetasizer[®] Nanoseries, Malvern Instruments). Essa determinação foi realizada após diluição de 500 vezes (m/v) das formulações contendo as suspensões de nanocápsulas em solução de NaCl 10 mM. Posteriormente as soluções foram homogeneizadas em vortex até sua completa homogeneização. Os resultados foram obtidos através da média de três determinações.

3.3.4.3 Determinação do pH das formulações, contendo adapaleno na forma livre e nanoencapsulada

Para a determinação do pH das formulações semissólidas, foi utilizado um potenciômetro calibrado com solução tampão pH 4,0 e 7,0. As leituras foram realizadas em triplicata diretamente nas formulações semissólidas.

3.3.4.4 Determinação das características organolépticas das formulações contendo adapaleno na forma livre e nanoencapsulada

As características físicas, ou seja, aparência, cor e odor, apresentadas pelas amostras foram observadas visualmente e comparadas com as amostras armazenadas em temperatura ambiente, as quais foram consideradas como padrão. A amostra foi classificada segundo os seguintes critérios (ALVES, 1996):

1. condições normais, satisfatórias;
2. ligeira mudança de algum aspecto relativo à aparência, cor e odor da amostra;
3. incorporação de ar, início do desenvolvimento de coloração ou odor, principalmente em termos de rancificação;

3.3.4.5 Avaliação das características reológicas das formulações semissólidas, contendo adapaleno na forma livre e nanoencapsulada

As características reológicas das formulações semissólidas foram avaliadas com auxílio de um viscosímetro rotacional Brookfield, modelo RV DVI+ com 9 velocidades.

A construção dos reogramas foi feita através da representação gráfica da taxa de cisalhamento, em função da tensão de cisalhamento. O comportamento reológico foi acompanhado ainda em função da relação entre a viscosidade em função da taxa de

cisalhamento. As análises foram realizadas em triplicada.

3.3.4.6 Determinação da espalhabilidade das formulações semissólidas, contendo adapaleno na forma livre e nanoencapsulada

Para a determinação da espalhabilidade, empregou-se a metodologia proposta por Münzel, Buechi e Schultz (1959), modificada por Knorst em 1991 (DE PAULA et al., 1998).

Foi empregado uma placa-molde circular de vidro (diâmetro = 20 cm; espessura = 0,2 cm), com orifício central de 1,2 cm de diâmetro, que foi colocada sobre placa-suporte de vidro (20 cm x 20 cm). Sob essas placas, foi posicionada uma folha de papel milimetrado. A amostra foi introduzida no orifício da placa e a superfície nivelada com espátula; após, a placa-molde foi cuidadosamente retirada. Sobre a amostra, foi colocada uma placa de vidro de peso pré-determinado. Após 1 minuto, foi calculada a superfície abrangida através da medida do diâmetro em duas posições opostas, com posterior cálculo do diâmetro médio. Esse procedimento foi repetido, acrescentando-se novas placas, em intervalos de 1 minuto e registrando-se, após cada determinação, a superfície abrangida. A espalhabilidade (E_i), determinada a 25 °C, foi calculada através da equação abaixo:

$$E_i = (d^2 \cdot \pi) / 4$$

Onde:

E_i = espalhabilidade da amostra para peso i (mm^2)

d = diâmetro médio (mm)

Os valores da espalhabilidade em função dos pesos adicionados foram determinados através de 3 medições, calculando-se a média entre elas.

3.3.4.7 Determinação do teor de adapaleno e do perfil de degradação para as formulações semissólidas

Construção da curva padrão

Para construção da curva analítica, foi pesado o equivalente a 25 mg de adapaleno, e transferido para um balão volumétrico com capacidade de 25 mL, sendo o volume completado com tetrahidrofurano, acetonitrila e metanol na proporção de 15:5:5 respectivamente,

obtendo uma concentração de adapaleno de 1000 µg/mL. A partir desta solução padrão, a curva analítica foi construída nas concentrações de 10, 15, 20, 25 e 30 µg/mL, utilizando-se metanol como solvente. O procedimento foi realizado em triplicata. Na Tabela 3, encontram-se as diluições e as concentrações finais de adapaleno, empregadas na curva analítica.

Tabela 3 – Curva padrão usada para determinação do adapaleno nas suspensões

Balão (10 mL)	Solução Padrão (1000 µg/mL) (mL)	Solução Diluente (mL)	Concentração (µg/mL)
1	0,10	9,90	10
2	0,15	9,85	15
3	0,20	9,80	20
4	0,25	9,75	25
5	0,30	9,70	30

As áreas médias, correspondentes a três determinações para cada diluição de adapaleno, foram plotadas no eixo das ordenadas e as concentrações (µg/mL), no eixo das abscissas.

Métodos Cromatográficos

As análises foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência, (CLAE), através da metodologia seguida por Barrios (2010) para quantificação do adapaleno incorporado em nanocápsulas. Utilizou-se um cromatógrafo líquido YL-Clarity, modelo YL9100 CLAE System, equipado com bomba modelo YL9110, detector com comprimento de onda variável UV/VIS modelo YL9160, Coluna cromatográfica - Lichropher[®] 100 RP – 18 (250 mm, 4,0 mm, 5 µm) – Merck.

A fase móvel utilizada foi constituída de metanol e água em uma proporção de 95:5 (v/v), com pH aparente de 3,0, volume de injeção de 20 µL e fluxo de 1,0 mL/min. As amostras foram analisadas em um comprimento de onda de 254 nm.

Doseamento do adapaleno incorporado nas formulações semissólidas

A determinação do teor de adapaleno nas formulações semissólidas foi realizada para as amostras de gel hidrofílico, contendo adapaleno tanto na forma livre, como na forma nanoencapsulada.

Foram pesados 0,78 gramas de cada formulação em um balão volumétrico de 10 mL, sendo adicionados ao mesmo 2,5 mL de ACN. As amostras foram colocadas no ultrassom

durante 15 minutos e logo após adicionou-se 5 mL de THF e completou-se o volume dos balões com MeOH.

Após, as mesmas foram submetidas ao ultrassom por 10 minutos e posteriormente ao vortex durante 5 minutos. As amostras foram homogeneizadas com agitador magnético durante 30 minutos e colocadas novamente em ultrassom por mais 20 minutos. Posteriormente foram transferidas para um tubo de ensaio e centrifugadas com uma rotação de 3500 rpm por 20 minutos. No final do processo, as amostras foram filtradas com membrana 0,45 µm Millipore® e analisadas em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), conforme metodologia descrita anteriormente.

Os resultados obtidos, através das áreas dos picos, foram aplicados na curva analítica e calculados através da equação da reta. O teor de adapaleno em cada suspensão foi expresso em µg/mL e porcentagem (%).

Determinação do perfil de degradação das formulações semissólidas contendo adapaleno na forma livre e nanoencapsulada

A modelagem matemática para a determinação do perfil de degradação das formulações semissólidas contendo adapaleno, armazenadas durante 90 dias em temperatura ambiente (25 ± 2 °C), foi realizada utilizando o programa Scientist® (MicroMath Scientific Software, Inc.), de acordo com metodologia adaptada de Breier e colaboradores (2006), conforme cinética de ordem zero, cinética de primeira ordem monoexponencial ou biexponencial utilizando as seguintes equações:

$$C = C_0 - Kt \text{ - cinética de ordem zero}$$

$$C = C_0 \cdot e^{-kt} \text{ - cinética de primeira ordem monoexponencial}$$

$$C = A \cdot e^{-\alpha t} + B \cdot e^{-\beta t} \text{ - cinética de primeira ordem biexponencial}$$

onde A: quantidade de fármaco degradado na velocidade α ;

B: quantidade de fármaco degradado na velocidade β ;

α , β e k: constantes de degradação;

t: tempo

C_0 : concentração do fármaco no tempo zero;

C: concentração do fármaco após o tempo de reação.

Todos os perfis de degradação foram testados para os três modelos e o modelo mais adequado foi escolhido baseando-se no valor de Critério de Seleção de Modelo (MSC), coeficiente de correlação e inspeção visual dos gráficos modelados.

3.3.5 Estudos de permeação *in vitro*

Construção da curva padrão para realização dos estudos de permeação

Para construção da curva analítica foi pesado o equivalente a 25 mg de adapaleno, sendo o volume completado para um balão de 25 mL com tetrahydrofurano, acetonitrila e metanol na proporção de 15:5:5, respectivamente. A partir da solução mãe (1000 µg/mL), a curva analítica foi construída nas concentrações de 0,5; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 µg/mL, utilizando-se metanol como solvente. O procedimento foi realizado em triplicata.

As áreas médias, correspondentes a três determinações para cada diluição de adapaleno, foram plotadas no eixo das ordenadas e as concentrações (µg/mL), no eixo das abscissas.

Estudo de permeação “*in vitro*”

Estudos de permeação “*in vitro*” foram realizados utilizando uma célula de difusão vertical do tipo *Franz* com um compartimento receptor com capacidade em torno de 6,0 mL e uma área de difusão de 3,14 cm² (FRANZ, 1975; VENTER et al, 2001; ALVES et al, 2007b). Utilizou-se neste estudo pele de orelha de porco como membrana. As amostras de pele de porco foram obtidas através da doação das orelhas suínas pelo Frigorífico Sagrillo Ltda, de Santiago –RS.

Um pedaço circular de membrana natural (pele de porco) foi mantido em contato com uma solução receptora de tampão fosfato pH 6,4 segundo metodologia de Jain e Ahmed (2007). Este meio foi mantido a 37 °C, circulando água pela jaqueta do compartimento inferior, sendo constantemente agitado com uma barra magnética de teflon. As amostras (0,25 g) foram colocadas na parte superior da membrana e em intervalos de tempo pré determinados (2, 4, 6, 8, 10 e 24 horas) foram coletados 2 mL da solução receptora. A cada retirada da amostra a solução receptora foi recolocada e as amostras analisadas conforme a metodologia analítica descrita anteriormente.

Técnica de “Tape Stripping” – Retenção no estrato córneo

Após 24 horas de experimento, a célula de difusão foi desmontada e a membrana foi limpa e analisada quanto ao conteúdo de fármaco retido no estrato córneo e na epiderme/derme.

Recortes de pele de porco foram fixados em um suporte com as extremidades presas e limpos cuidadosamente com auxílio de uma espátula. Consecutivas camadas de estrato córneo foram retiradas aderindo à fita adesiva na área de exposição, colocando leve pressão. Para este procedimento foram utilizadas 15 fitas.

A pele foi pesada antes e depois da extração do estrato córneo e a quantidade de substância ativa retida nas fitas foi extraída com ACN e THF (2:2). As 15 fitas foram colocadas em tubo de ensaio contendo os solventes, agitadas com agitador de tubo (Vortex) e submetidas a ultra-som (15 min) (BENTLEY, 1994; PELLET et al, 1997; TOUITOU, MEIDAN e HORWITZ, 1998; VERMA et al, 2003; ALVES et al, 2007b).

Após centrifugação, o sobrenadante foi filtrado através de membrana de 0,45 µm e submetido à doseamento cromatográfico conforme condições descritas anteriormente.

Técnica de retenção cutânea

Após a técnica de *tape stripping* o restante da pele foi picotada e transferida para um tubo de ensaio contendo ACN e THF (2:2). Os tubos foram submetidos ao vortex durante 10 minutos e logo após permaneceram 30 minutos em ultrasom. As soluções foram filtradas através de membrana com 0,45 µm. O filtrado foi submetido ao doseamento por método analítico previamente padronizado, conforme o item 3.3.4.7.2. (BENTLEY, 1994; TOUITOU, MEIDAN e HORWITZ, 1998).

3.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS DOS RESULTADOS

A metodologia estatística dos dados incluiu análise descritiva de variáveis como média, desvio padrão, coeficiente de variação, estudos de correlação, regressão linear simples, análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey, considerando-se níveis de significância de 0,05.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 AVALIAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS SUSPENSÕES DE NANOCÁPSULAS CONTENDO ADAPALENO

As suspensões contendo nanocápsulas de adapaleno utilizando óleo de melaleuca como núcleo oleoso foram desenvolvidas anteriormente por Barrios (2010). No presente trabalho a suspensão foi novamente caracterizada quanto à distribuição do diâmetro das partículas, índice de polidispersão, potencial zeta e pH com o objetivo de comparar com os resultados obtidos anteriormente. Suspensões de nanocápsulas contendo óleo de melaleuca, porém sem a incorporação do adapaleno, também foram produzidas com objetivo de comparar o comportamento do sistema nanoparticulado com e sem a presença do fármaco.

A caracterização físico-química das suspensões encontra-se descritas na Tabela 4.

Tabela 4 – Valores referentes à caracterização físico-química das suspensões contendo nanocápsulas de adapaleno (NCA) e nanocápsulas sem adapaleno (NCB)

Suspensões	Diâmetro de Partícula (nm)	Índice de Polidispersão	pH	Potencial Zeta (mV)
NCA	186,5 ± 10,4	0,1 ± 0,07	5,4 ± 0,1	-19,9 ± 1,7
NCB	187,6 ± 1,1	0,2 ± 0,01	5,8 ± 0,1	-17,7 ± 1,1

Valores referentes à média para determinação de três formulações ± desvio padrão.

Todas as suspensões apresentaram-se com aspecto macroscopicamente homogêneo com coloração branca leitosa. As suspensões estudadas apresentaram pH levemente ácido, as quais encontram-se coerentes para este tipo de sistema e na faixa de pH utilizado para formulações tópicas (ALVES et al, 2007b).

A distribuição do tamanho de partícula foi inferior a 200 nm, resultado esse de acordo, com os sistemas coloidais obtidos através do método de deposição interfacial do polímero pré-formado. Os valores obtidos no índice de polidispersão foram inferiores a 0,2; conferindo uma adequada homogeneidade na distribuição do tamanho das partículas (POLETTTO et al, 2008; OURIQUE et al, 2008; WEISS-ANGELI et al, 2008).

O potencial zeta apresentou valores negativos possibilitando que as partículas mantenham-se afastadas evitando a formação de agregados. Os valores negativos são decorrentes da presença dos grupamentos ésteres da poli (ϵ -caprolactona) e dos tensoativos Span 60[®] e Tween 80[®] (SCHAFFAZICK et al, 2003; BOUCHEMAL et al, 2004). As

suspensões contendo adapaleno apresentaram um valor de potencial zeta aumentado em módulo quando comparado com as suspensões de nanocápsulas sem a presença do ativo, o que pode ser explicado pelo fato do fármaco estar cerca de 10% adsorvido à parede polimérica, conforme veremos no decorrer do trabalho na parte de perfil de degradação.

A caracterização físico-química das suspensões encontra-se semelhante aos resultados referidos por Barrios (2010), que obteve suspensões de nanocápsulas contendo adapaleno com óleo de melaleuca com as seguintes características: pH de 5,54 ($\pm 0,03$); diâmetro médio das partículas de 174 nm ($\pm 1,5$), com índice de polidispersão de 0,1 ($\pm 0,01$) e um potencial zeta de -18,6 mV ($\pm 0,8$).

4.2 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS DE ESTABILIDADE PARA AS FORMULAÇÕES SEMISSÓLIDAS CONTENDO ADAPALENO NA FORMA NANOENCAPSULADA E NA FORMA LIVRE

Após a caracterização das suspensões, estas foram incorporadas em formulações semissólidas com base de Carbopol[®], o qual apresenta-se como um veículo com caráter hidrofílico e aniônico. Os estudos de estabilidade destas formulações consistiram nas avaliações referentes à determinação do diâmetro das partículas, pH, índice de polidispersão e potencial zeta. Determinação das características organolépticas, espalhabilidade, viscosidade e teor do ativo.

4.2.1 Determinação da distribuição do diâmetro médio e índice de polidispersão das nanocápsulas de adapaleno incorporadas nas formulações semissólidas

Para a determinação do diâmetro médio e do índice de polidispersão das partículas, as formulações semissólidas foram analisadas através da técnica de espalhamento de luz dinâmico pelo equipamento Zetasizer[®]. Os resultados referentes ao diâmetro médio das partículas e índice de polidispersão estão descritos nas Tabelas 5 e 6 e na Figura 3.

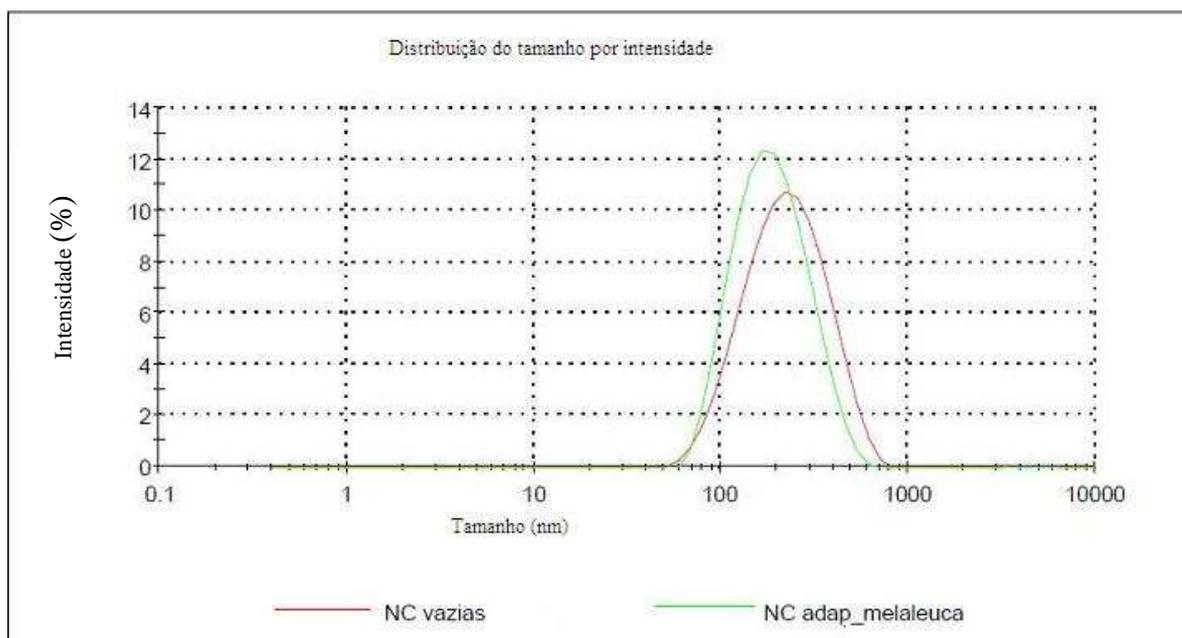


Figura 3 – Distribuição do tamanho (nm) inicial para as formulações contendo nanocápsulas de adapaleno e nanocápsulas sem adapaleno.

Pode-se perceber que ocorreu um aumento do tamanho de partícula das suspensões contendo nanocápsulas após a incorporação em bases semissólidas tanto para as nanocápsulas contendo adapaleno como para as sem adapaleno.

Tabela 5 – Diâmetro médio (nm) e índice de polidispersão das nanocápsulas contendo adapaleno após incorporação nas bases semissólidas

Tempo Dias	TA		GE		ES	
	Média±DP	PI±DP	Média±DP	PI±DP	Média±DP	PI±DP
0	201,1±6,38	0,2±0,06	201,1±6,3	0,2±0,06	201,1±6,3	0,2±0,06
7	179,7±2,9	0,1±0,01	180,0±0,7	0,1±0,01	356,3±36,1*	0,3±0,02
14	185,3±4,0	0,2±0,01	187,1±7,9	0,2±0,05	-	-
30	187,4±1,8	0,2±0,00	182,2±6,5	0,2±0,00	-	-
60	189,7±4,2	0,2±0,04	181,9±3,9	0,2±0,01	-	-
90	207,2±12,3	0,3±0,05	193,2±7,5	0,2±0,03	-	-

* Valores estatisticamente significativos ($p \leq 0,05$) quando comparados com os seus resultados iniciais com relação à temperatura ambiente (TA), geladeira (GE) e estufa (ES).

- Não foi possível a realização das análises em função de erro no equipamento.

De acordo com a Tabela 5 pode-se observar que as formulações semissólidas contendo nanocápsulas de adapaleno apresentaram-se estáveis durante os 90 dias de armazenamento quando mantidas em temperatura ambiente ($25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$) e geladeira ($-4 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$). Para as amostras mantidas em estufa ocorreu um aumento significativo ($p < 0,05$) do tamanho a partir de 7 dias de armazenamento a $40 \text{ }^\circ\text{C}$, porém após 7 dias de experimento não foi possível avaliar o diâmetro médio devido a erros de análises do Zetasizer®.

Um valor aumentado para o índice de polidispersão ao longo do experimento indica a presença de diferentes populações de partículas dentro da mesma formulação. Mudanças na distribuição do diâmetro das mesmas podem indicar uma tendência à agregação e sedimentação das partículas do sistema (GUTERRES et al, 1995; CALVO et al, 1996).

Tabela 6 – Diâmetro médio (nm) e índice de polidispersão das nanocápsulas sem adapaleno após incorporação nas bases semissólidas

Tempo Dias	TA		GE		ES	
	Média±DP	PI±DP	Média±DP	PI±DP	Média±DP	PI±DP
0	216,7±1,3	0,3±0,03	216,7±1,3	0,3±0,06	216,7±1,3	0,3±0,06
7	173,8±4,3*	0,2±0,04*	164,5±0,2*	0,1±0,07*	322,4±4,8*	0,4±0,03*
14	170,1±1,1*	0,1±0,01*	184,2±0,8*	0,2±0,00*	-	-
30	172,9±0,6*	0,1±0,01*	166,6±2,2*	0,1±0,01*	-	-
60	172,2±1,7*	0,1±0,00*	173,5±1,2*	0,2±0,03*	-	-
90	222,2±5,6	0,3±0,01	181,2±0,7*	0,2±0,02*	-	-

* Valores estatisticamente significativos ($p \leq 0,05$) quando comparados com os seus resultados iniciais com relação à temperatura ambiente (TA), geladeira (GE) e estufa (ES).

- Não foi possível a realização das análises em função de erro no equipamento.

As formulações contendo nanocápsulas brancas, ou seja, sem a adição do fármaco apresentaram diferença significativa para todas as formulações a partir de 7 dias independente da temperatura de armazenamento, conforme visualizado na Tabela 6.

De acordo com estes resultados, é possível observar que a formulação mantida em estufa seguiu o mesmo comportamento tanto para a amostra contendo nanocápsulas de adapaleno como para as amostras contendo nanocápsulas sem a presença do fármaco, onde a alteração na distribuição do tamanho de partícula ocorreu para ambas às formulações, independente da presença ou não do fármaco.

Segundo Schaffazick e colaboradores (2003) a composição quali-quantitativa e o método de obtenção das nanopartículas influenciam na distribuição do diâmetro e na polidispersão das partículas, e no caso das nanocápsulas, a natureza do núcleo oleoso também é um fator importante.

De acordo com os resultados obtidos, conclui-se que o diâmetro médio das partículas apresenta-se adequado para aplicação tópica, uma vez que segundo Bouchemal e colaboradores (2004) o tamanho de partícula recomendado para o uso em formulações tópicas, tanto farmacêuticas quanto cosméticas, deve ser inferior a 600 nm, a fim de se ter um maior controle da permeação do ativo. Estes resultados encontram-se de acordo com diversos trabalhos realizados com nanocápsulas poliméricas incorporadas em formulações para aplicação tópica, onde a distribuição do tamanho das suspensões de nanocápsulas, não sofreu

alteração após a incorporação nas formulações semissólidas (FERRONY, 2009; ROGGIA, 2009).

4.2.2 Determinação do potencial zeta das nanocápsulas contendo adapaleno e incorporadas nas formulações semissólidas

Esta determinação reflete o potencial elétrico da superfície das nanopartículas, o qual é influenciado pela carga de todos os componentes da formulação. As formulações semissólidas contendo as nanocápsulas de adapaleno foram analisadas através de análises de eletroforese pelo equipamento Zetasizer[®]. Os resultados obtidos podem ser observados na Tabela 7 e na Figura 4.

Tabela 7 – Valores referentes à determinação do potencial zeta para as suspensões contendo nanocápsulas de adapaleno após a incorporação nas formulações semissólidas durante os 90 dias sob armazenamento em temperatura ambiente (TA), geladeira (GE) e estufa (ES).

Tempo Dias	TA Média ± DP	GE Média ± DP	ES Média ± DP
0	- 23,4 ± 0,2	- 23,4 ± 0,2	- 23,4 ± 0,2
7	-20,0 ± 0,7	-21,4 ± 1,7	-21,9 ± 9,7
14	-24,5 ± 3,3	-24,6 ± 10,1	-25,9 ± 0,8
30	-21,9 ± 1,8	-24,0 ± 3,2	-25,9 ± 11,3
60	-27,3 ± 5,8	-17,5 ± 11,8	-18,0 ± 4,8
90	-25,7 ± 2,8	-18,1 ± 10,9	-24,8 ± 4,3

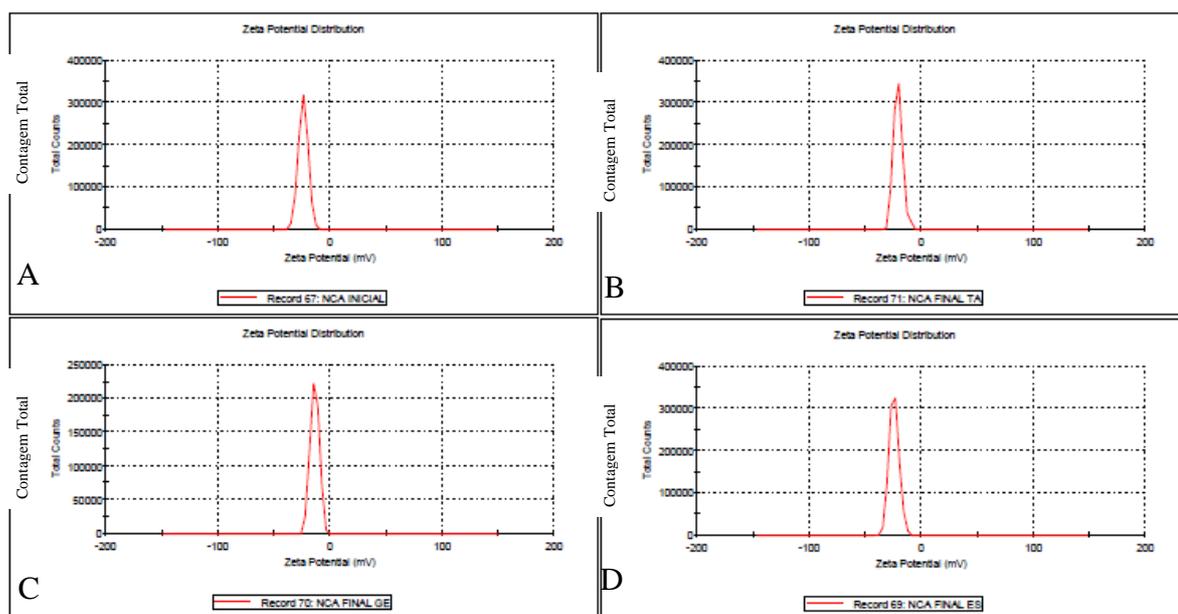


Figura 4 – Valores referentes ao potencial zeta (-mV) das formulações contendo nanocápsulas de adapaleno (NCA), em 0 (A) e 90 dias de armazenamento em temperatura ambiente (B), geladeira (C) e estufa (D).

As formulações semissólidas contendo nanocápsulas de adapaleno armazenadas em temperatura ambiente (25 ± 2 °C), geladeira (-4 ± 2 °C) e estufa (40 ± 2 °C) não sofreram alterações significativas ($p > 0,05$) com relação aos valores iniciais de potencial zeta durante os 90 dias de armazenamento.

O mesmo comportamento não pode ser observado para as formulações semissólidas contendo nanocápsulas sem adapaleno, as quais apresentaram um valor inicial de potencial zeta de $-21,97 \pm 2,49$ e uma média final de $-28,80 \pm 0,79$ para as amostras armazenadas em temperatura ambiente, $-29,63 \pm 2,35$ para as formulações mantidas em geladeira e $-20,23 \pm 0,65$ para as mantidas em estufa. As formulações contendo nanocápsulas brancas tiveram sua carga negativa aumentada durante os 90 dias de análise para temperatura ambiente e geladeira. Sendo assim a literatura sugere que o aumento na superfície eletrostática das nanopartículas possa ser resultado da adsorção de estruturas iônicas da suspensão ou, da dissociação de grupamentos do polímero (MAGENHEIM e BENITA, 1991).

De acordo com a literatura, os valores negativos para potencial zeta de suspensões preparadas com poli(ϵ -caprolactona) é justificado pelos grupamentos ésteres presentes no polímero (MÜLLER et al., 2001). Valores negativos também têm sido relatados por outros autores. Domingues e colaboradores (2008), realizaram estudos com nanocápsulas poliméricas de poli(ϵ -caprolactona) contendo indometacina e observaram um potencial zeta em torno de -24 mV. Estudos realizados com nanocápsulas contendo meloxicam incorporadas em bases semissólidas apresentaram valores iniciais de potencial zeta de -15,82 mV e de -16,17 mV e -21,04 mV para as amostras mantidas durante 90 dias em temperatura ambiente e estufa respectivamente (BOCHI, 2010).

Os valores em módulos, relativamente altos de potencial zeta, são importantes para uma boa estabilidade físico-química das formulações, pois forças repulsivas tendem a evitar a agregação em função das colisões ocasionais de nanopartículas adjacentes (FELIPPI, 2008). Desta forma, os valores de potencial zeta encontrados para as formulações, apresentam-se adequados para a manutenção deste tipo de sistema, uma vez que segundo os artigos citados os valores encontrados são entre -15 a -24 mV para as suspensões com a poli(ϵ -caprolactona), pois as partículas carregadas se repelem umas às outras e essa força supera a tendência natural à agregação.

4.2.3 Determinação do pH das formulações semissólidas contendo adapaleno na forma livre e na forma nanoencapsulada

O monitoramento do pH em função do tempo é de suma importância por resultar em informações relevantes sobre a estabilidade da formulação, uma vez que alterações deste parâmetro podem ser indício da degradação do polímero ou de algum outro componente da mesma, ou até mesmo indicar um processo de difusão da substância ativa do interior da partícula para o meio aquoso (GUTERRES et al, 1995; SCHAFFAZICK et al, 2003).

A Figura 5 expressa os valores referentes ao pH inicial das formulações bem como durante armazenamento em temperatura ambiente, geladeira e estufa em 7, 14, 30, 60 e 90 dias.

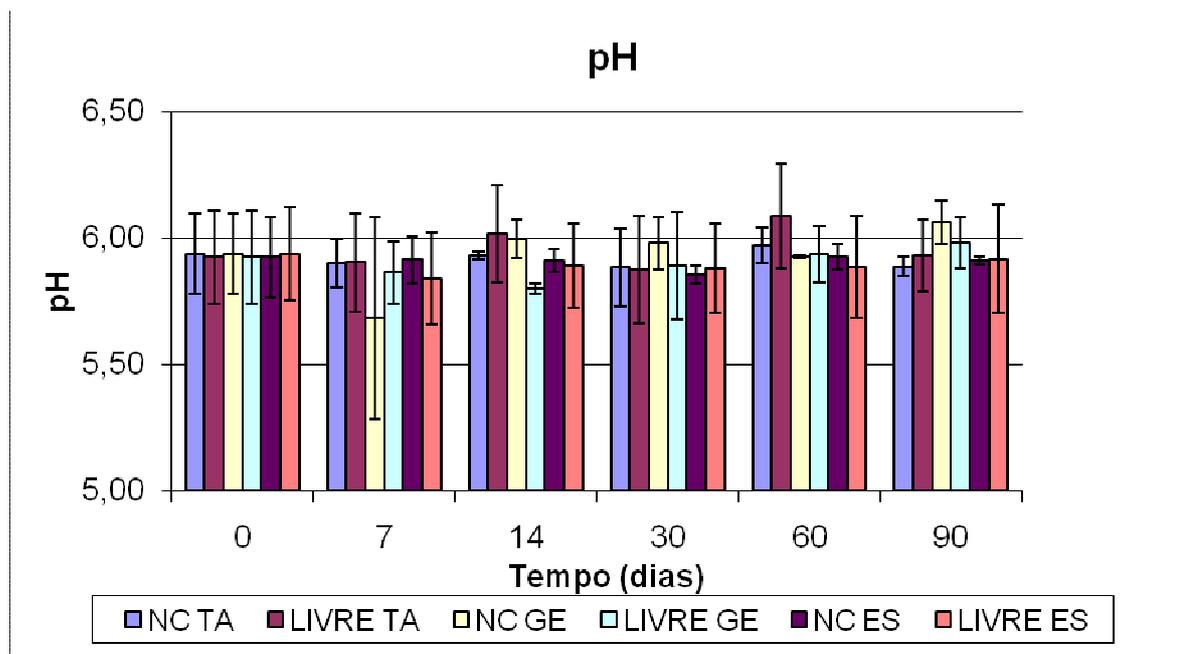


Figura 5 – Valores referentes ao pH para as formulações semissólidas armazenadas em temperatura ambiente, geladeira e estufa durante os 90 dias de experimento.

As formulações semissólidas contendo o fármaco na forma livre ou nanoencapsulada submetidas ao estudo de estabilidade, mantiveram seus valores inalterados durante os 90 dias de experimento, não havendo diferença significativa em nenhuma das temperaturas a que foram submetidas.

De acordo com os resultados obtidos, pode-se concluir que as formulações apresentaram e mantiveram os valores de pH em níveis adequados para aplicação tópica, uma vez que o pH da pele é levemente ácido, atuando como uma proteção bactericida e fungicida.

Dessa forma, as formulações tópicas devem apresentar valores de pH entre 3 e 10, pois do contrário podem provocar alterações no pH da pele (LEONARDI, GASPAR e CAMPOS, 2002).

4.2.4 Determinação das características organolépticas das formulações semissólidas contendo adapaleno na forma livre e nanoencapsulada

As formulações contendo o adapaleno na forma livre ou nanoencapsulada foram analisadas e armazenadas durante 90 dias em temperatura ambiente (TA), geladeira (GE) e estufa (ES). Os parâmetros analisados através da observação visual em relação à aparência, cor e odor estão descritos na Tabela 8.

Tabela 8 – Parâmetros referentes à aparência, cor e odor das formulações semissólidas contendo adapaleno nanoencapsulado e na forma livre armazenados em temperatura ambiente (TA), geladeira (GE) e estufa (ES).

Dias	Nano TA	Livre TA	Nano GE	Livre GE	Nano ES	Livre ES
0	1	1	1	1	1	1
7	1	1	1	1	1	1
14	1	1	1	1	1	1
30	1	1	1	1	1	1
60	1	1	1	2	2	2
90	2	2	1	2	3	3

1. Condições normais, satisfatórias.
2. Ligeira mudança de algum aspecto relativo à aparência, cor e odor da amostra.
3. Incorporação de ar, início do desenvolvimento de coloração e/ou odor, principalmente em termos de rancificação.

As formulações semissólidas contendo nanocápsulas de adapaleno apresentaram alterações quanto à aparência, cor e odor ao longo do período de estudo (Tabela 8 e Figura 6). Essas alterações foram observadas a partir do 60º dia do início dos experimentos para as formulações armazenadas em estufa (40 ± 2 °C), e após 90 dias de análises para as formulações mantidas em temperatura ambiente (25 ± 2 °C). As formulações semissólidas contendo adapaleno nanoencapsulado, as quais foram mantidas em geladeira (-4 ± 2 °C), apresentaram-se estáveis em relação à cor, odor e aparência durante os 90 dias de estudo.

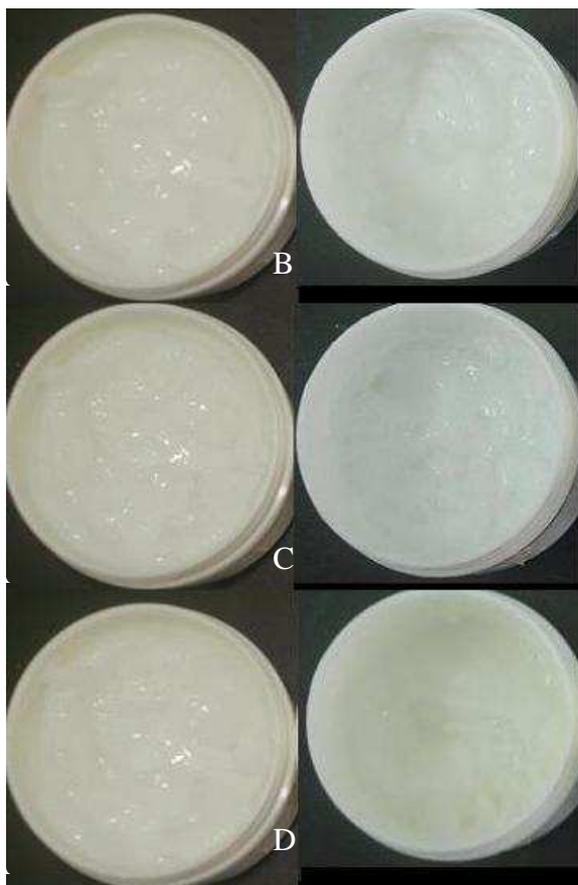


Figura 6 – Formulações semissólidas contendo adapaleno nanoencapsulado em 0 dias (A) e após 90 dias de armazenamento em temperatura ambiente (B), geladeira (C) e estufa (D).

As formulações semissólidas contendo adapaleno na forma livre (Tabela 8 e Figura 7) apresentaram alterações referentes à aparência, cor e odor a partir do 60º dia de experimento quando armazenadas em geladeira ($-4 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$) e em estufa ($40 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$). Porém quando as formulações foram armazenadas em temperatura ambiente ($25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$) este período aumentou para 90 dias.

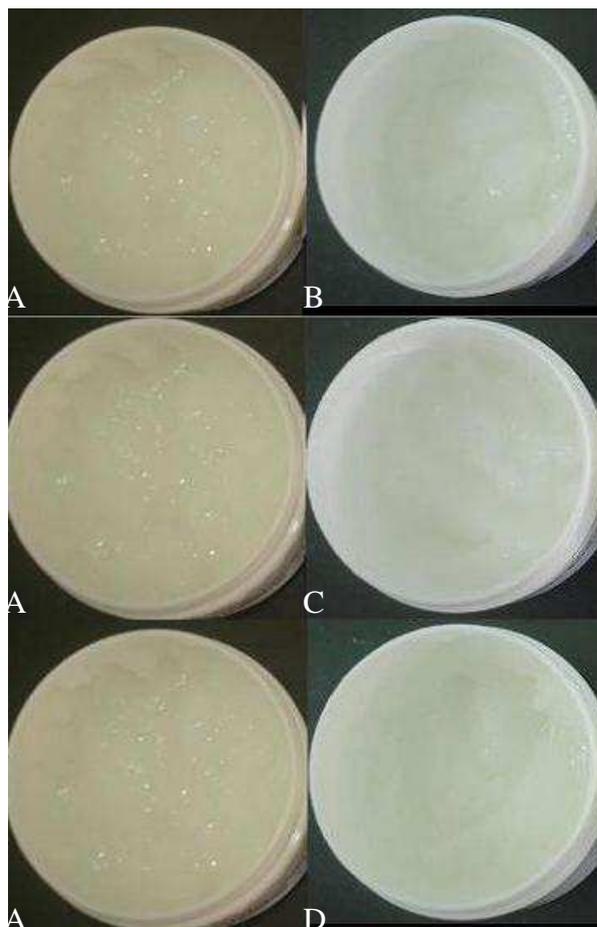


Figura 7 – Formulações semissólidas contendo adapaleno na forma livre em 0 dias (A) e após 90 dias de armazenamento em temperatura ambiente (B), geladeira (C) e estufa (D).

De acordo com os resultados descritos anteriormente, pode-se observar que as características organolépticas de ambas as formulações semissólidas contendo adapaleno sofreram alterações durante o experimento. Quando comparadas as formulações contendo adapaleno na forma livre e nanoencapsulada armazenadas em geladeira, foi possível visualizar que a forma nanoencapsulada conferiu uma maior proteção contra a degradação. Quanto às formulações semissólidas armazenadas em temperatura ambiente e estufa, não foram observadas diferenças entre a forma livre e nanoencapsulada.

Alguns estudos realizados com sistemas nanoparticulados têm referido que as formulações contendo o fármaco na forma nanoencapsulada, quase sempre, mantêm as características organolépticas por um período de tempo maior que as formulações contendo o fármaco na forma livre.

Ferrony (2009) estudou nanocápsulas contendo dexametasona incorporadas em um veículo de creme gel, e verificou um efeito protetor das mesmas quando comparadas com a forma livre do fármaco, mantendo por um período maior de tempo as características

organolépticas das formulações.

Bochi (2010) trabalhou com nanocápsulas de meloxicam incorporadas em formulações semissólidas, e também observou que as características organolépticas, mantiveram-se por um período maior de tempo quando comparada com formulações semissólidas contendo o meloxicam na forma livre. Para as formulações mantidas em temperatura ambiente, a forma nanoencapsulada do meloxicam não apresentou alteração nas características organolépticas durante os 180 dias, porém quando o ativo estava na forma livre, essas alterações foram bem visíveis em relação à aparência e cor, apresentando uma leve perda da sua coloração.

Estes resultados sugerem que as nanocápsulas podem estar promovendo uma proteção do fármaco para as amostras mantidas em geladeira, frente às alterações referentes à aparência, cor, odor e consistência. Esta capacidade protetora vem sendo atribuída aos sistemas carreadores, tais como as nanocápsulas e nanopartículas lipídicas sólidas.

4.2.5 Determinação das características reológicas para as formulações semissólidas contendo adapaleno na forma livre e nanoencapsulada

O desempenho reológico e a viscosimetria têm sido estudados com o objetivo de caracterizar e analisar a estabilidade físico-química das formulações diante dos efeitos causados pelo tempo, pela temperatura ou mesmo pela incorporação de ativos e de carreadores de substâncias, como é o caso dos sistemas nanoestruturados (MILÃO, 2003; ALVES, 2007b).

O estudo e a determinação das características reológicas é de grande e crescente importância tanto para a indústria farmacêutica como cosmética, visto que a consistência e a espalhabilidade dos produtos devem ser reproduzidos a cada lote, assegurando assim, a qualidade tecnológica do produto acabado. As formulações semissólidas com caráter hidrofílico, como é o caso do Carbopol[®], têm sido bastante utilizadas como bases dermatológicas por apresentarem fácil espalhabilidade, não serem gordurosos e poderem veicular diferentes fármacos (CORRÊA et al, 2005).

Os valores referentes à viscosidade das formulações semissólidas contendo adapaleno na forma livre e na forma nanoencapsulada podem ser observados na Tabela 9. As leituras foram realizadas na velocidade de 50 rpm usando o *spindle 29*.

Tabela 9 – Valores de viscosidade (mPa.s), apresentados pelas formulações semissólidas, contendo adapaleno na forma livre e nanoencapsulada durante armazenamento em temperatura ambiente (TA), geladeira (GE) e estufa (ES) durante os 90 dias de experimento

Dias	NANO			LIVRE		
	TA	GE	ES	TA	GE	ES
0	886333 ±	886333 ±	886333 ±	945000 ±	945000 ±	945000 ±
	91571	91571	91571	17691	17691	17691
7	851333 ±	778333 ±	928666 ±	972000 ±	877666 ±	979000 ±
	15044	50013	43143	15132	21385*	20074
14	879500 ±	882666 ±	912666 ±	964333 ±	993666 ±	986666 ±
	19500	50540	25026	9712	3055*	10692
30	932000 ±	914666 ±	874000 ±	963000 ±	997500 ±	931000 ±
	15000	54683	36592	10535	1500*	24556
60	961666 ±	929333 ±	865666 ±	993666 ±	-	965333 ±
	12583	53687	32347	2516*		10115
90	987000 ±	950000 ±	780000 ±	991500 ±	-	915000 ±
	2000	24000	17088	1500*		26664

Valores referentes à média para determinação de três formulações ± desvio padrão.

- Amostras não obtiveram leitura, apresentando sinais de instabilidade

* Valores estatisticamente significativos ($p \leq 0,05$) quando comparados com os seus resultados iniciais com relação à temperatura ambiente, geladeira e estufa.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 9 é possível observar que as formulações contendo adapaleno na forma nanoencapsulada mantiveram seus valores de viscosidade sem apresentar diferença significativa para as amostra armazenada em estufa (40 ± 2 °C) em temperatura ambiente (25 ± 2 °C) e geladeira (-4 ± 2 °C) durante os 90 dias de estudo, quando comparado com os valores iniciais.

Para as formulações contendo o adapaleno na forma livre ocorreu um aumento significativo ($p < 0,05$) da viscosidade quando armazenado em temperatura ambiente (25 ± 2 °C) a partir de 60 dias de estudo. As formulações semissólidas mantidas em geladeira (-4 ± 2 °C) apresentaram uma diminuição significativa ($p < 0,05$) após 7 dias de armazenamento, porém em 14 aumentou significativamente ($p < 0,05$) seus valores de viscosidade. A partir de 60 dias de experimento as amostras contendo adapaleno na forma livre mantidas em geladeira não obtiveram leitura, pois estavam muito viscosas. Para as amostras mantidas em estufa (40 ± 2 °C) não ocorreu diferença significativa ($p > 0,05$) quando comparado com seus valores iniciais de viscosidade.

As formulações semissólidas contendo nanocápsulas de adapaleno parecem sofrer uma menor influência da temperatura em relação às alterações dos valores de viscosidade quando comparado ao ativo na forma livre.

Quando foram realizadas análises de viscosidade no tempo zero foi constatado que não houve diferença significativa entre a viscosidade do gel contendo o fármaco na forma livre ou na forma nanoencapsulada. Porém após 90 dias de análise foi observada uma diferença significativa ($p < 0,05$) entre as formulações armazenadas em estufa, onde a forma livre apresentou valores maiores de viscosidade quando comparado com a forma nanoencapsulada (Tabela 9). Pode-se observar desta forma, que para cada formulação existe um tipo de interação entre o carreador, o fármaco e/ou o veículo, em função do tempo e dos componentes envolvidos, determinando os diferentes comportamentos reológicos de cada sistema.

De acordo com as propriedades de fluxo dos materiais semissólidos é possível classificá-los em fluídos newtonianos e não-newtonianos. O fluxo newtoniano é caracterizado pela viscosidade constante, independente da força de cisalhamento aplicada. A maioria dos fluídos farmacêuticos não segue esta lei, pois a viscosidade do fluido varia com a velocidade de cisalhamento. O fluxo não newtoniano não apresenta relação linear entre a tensão de cisalhamento aplicada e sua taxa de cisalhamento. Dentre a classificação de fluído não-newtoniano inclui-se o fluxo plástico, pseudoplástico e dilatante (NETZ e ORTEGA, 2002; MARRIOT, 2005; ALLEN Jr., POPOVICH e ANSEL, 2007).

Através da análise das características reológicas das formulações semissólidas contendo adapaleno nanoencapsulado e na forma livre (Tabela 10 e Figuras 8 e 9), pode-se verificar que ambas as formulações, armazenadas em temperatura ambiente, geladeira e em estufa, apresentaram fluxo não-newtoniano e comportamento pseudoplástico ($n < 1$), seguindo o modelo de *Ostwald*, indicando que a adição das nanopartículas não modificou o comportamento reológico da formulação.

Tabela 10 – Valores referentes ao índice de plasticidade (n) e coeficiente de consistência (k) para as formulações semissólidas contendo adapaleno nanoencapsulado e na forma livre durante 90 dias de armazenamento em temperatura ambiente, geladeira e estufa.

Tempo	n		K	
	Nano	Livre	Nano	Livre
Inicial	0,22 ± 0,02	0,24 ± 0,07	391844,7	400954,7
Final TA	0,20 ± 0,04	0,23 ± 0,03	475093,7	424915,3
Final GE	0,19 ± 0,05	-	468623,3	-
Final ES	0,18 ± 0,01	0,19 ± 0,01	374027,7	425657,3

Valores representam a média das três formulações semissólidas ± desvio padrão.
 - Amostras não obtiveram leitura devido a sua instabilidade.

O comportamento pseudoplástico não possui ponto de cedência, apresentando fluxo imediatamente quando a força é aplicada. Materiais que exibem esse comportamento não apresentam, portanto, um valor unívoco que possa ser considerado característico (AULTON, 2001; ALLEN Jr., POPOVICH e ANSEL, 2007).

O comportamento pseudoplástico surge nas dispersões poliméricas e na maioria dos sistemas semissólidos que contenham esses componentes, em consequência da existência de interações intermoleculares entre as cadeias de polímeros (LACHMAN, LIEBERMAN e KANIG, 2001).

Uma compreensão adequada das propriedades reológicas de materiais farmacêuticos é essencial à preparação, ao desenvolvimento, à avaliação e ao desempenho das formas farmacêuticas (LACHMAN, LIEBERMAN e KANIG, 2001).

De acordo com os valores apresentados na Tabela 10, observou-se que não houve uma alteração significativa ($p \geq 0,05$) do índice de plasticidade (n) e do coeficiente de consistência (K) em ambas as formulações semissólidas contendo adapaleno em função dos 90 dias de armazenagem em temperatura ambiente, geladeira e estufa.

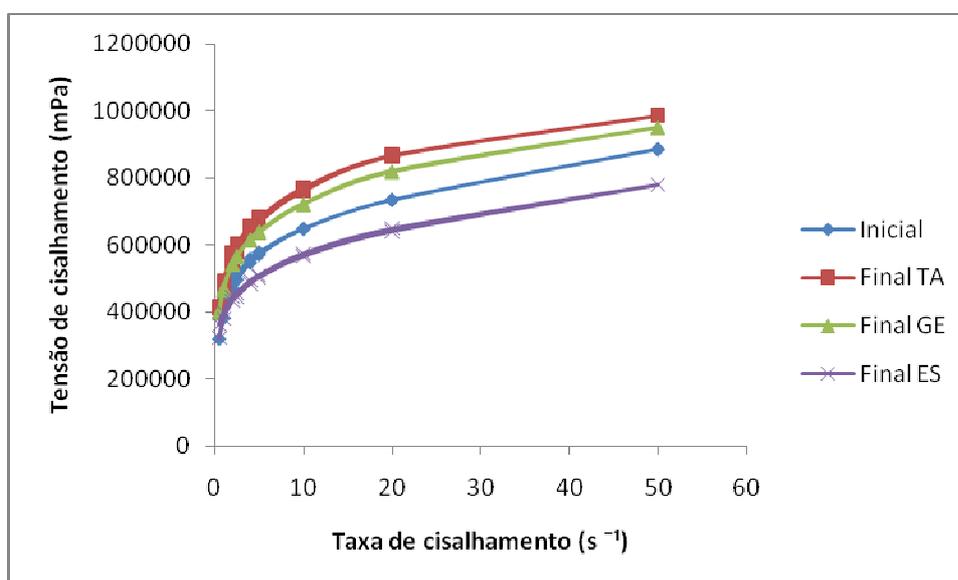


Figura 8 – Reograma para as formulações contendo nanocápsulas de adapaleno referentes aos valores iniciais e após 90 dias de armazenagem em temperatura ambiente (TA), geladeira (GE) e estufa (ES).

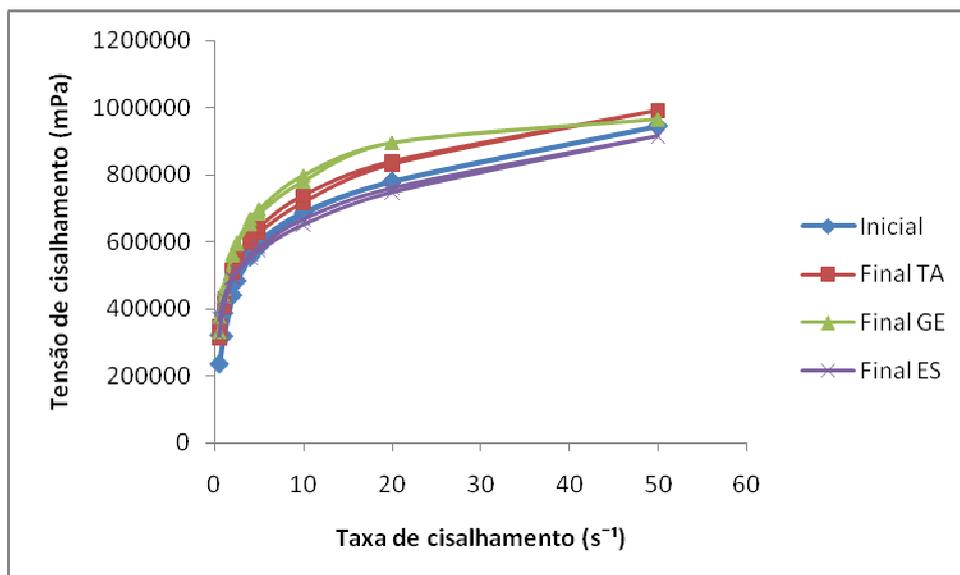


Figura 9 – Reograma para as formulações contendo adapaleno na forma livre referentes aos valores iniciais e após 90 dias de armazenamento em temperatura ambiente (TA), geladeira (GE) e estufa (ES).

Além dos estudos de viscosidade, também foram realizadas análises para a determinação da espalhabilidade, a qual teve como objetivo avaliar se as formulações semissólidas mantinham seus valores de espalhabilidade quando armazenadas durante 90 dias de experimento em temperatura ambiente ($25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$), geladeira ($-4 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$) e estufa ($40 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$). Os valores de espalhabilidade foram comparados para as formulações semissólidas contendo adapaleno na forma livre e na forma nanoencapsulada. Essa comparação foi realizada para verificar se a presença das suspensões contendo nanocápsulas poderia modificar a espalhabilidade da formulação.

Os valores de espalhabilidade para as formulações contendo adapaleno na forma livre e nanoencapsulada encontram-se descritos na Tabela 11 e nas Figuras 10 e 11.

Tabela 11 – Valores referentes à espalhabilidade (mm²) das formulações semissólidas contendo adapaleno na forma livre e na forma nanoencapsulada durante 90 dias de armazenamento em temperatura ambiente (TA), geladeira (GE) e estufa (ES)

Dias	NANO			LIVRE		
	TA	GE	ES	TA	GE	ES
0	3273 ± 380	3273 ± 380	3273 ± 380	3600 ± 65	3600 ± 65	3600 ± 65
7	3252 ± 255	3731 ± 523	4206 ± 339	2467 ± 686	3793 ± 218	4479 ± 356
14	3449 ± 498	3735 ± 902	3537 ± 539	3453 ± 600	4014 ± 147	3660 ± 534
30	3801 ± 483	3775 ± 207	3995 ± 162	3268 ± 222	3369 ± 184	3885 ± 221
60	2960 ± 369	3904 ± 239	3650 ± 268	3561 ± 211	3265 ± 0	3399 ± 803
90	2626 ± 516	2944 ± 361	3962 ± 367	2436 ± 245*	2925 ± 72*	3676 ± 489

Valores referentes à média para determinação de três formulações ± desvio padrão.

* Valores estatisticamente significativos ($p \leq 0,05$) quando comparados com os seus resultados iniciais com relação à temperatura ambiente, geladeira e estufa.

**Peso da placa: 498,68 g.

De acordo com os resultados relatados anteriormente, pode-se observar que as formulações semissólidas contendo adapaleno nanoencapsulado, não alteraram significativamente seus valores de espalhabilidade em nenhuma das temperaturas a que foram submetidas no armazenamento quando comparado com seus valores iniciais (Figura 10).

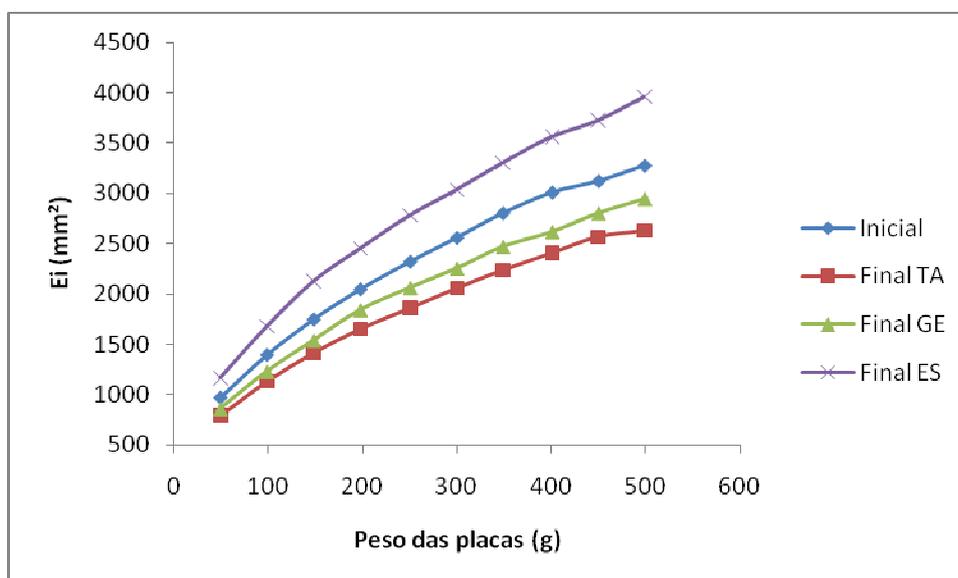


Figura 10 – Valores referentes a espalhabilidade apresentada pelas formulações contendo nanocápsulas de adapaleno durante 90 dias de armazenamento em temperatura ambiente (TA), geladeira (GE) e estufa (ES).

Para as formulações semissólidas contendo adapaleno na forma livre, verificou-se uma diminuição significativa ($p < 0,05$) entre a espalhabilidade inicial e final para as formulações armazenadas em temperatura ambiente e geladeira. A amostra mantida em estufa não

apresentou diferença significativa ($p>0,05$) entre a amostra inicial e final.

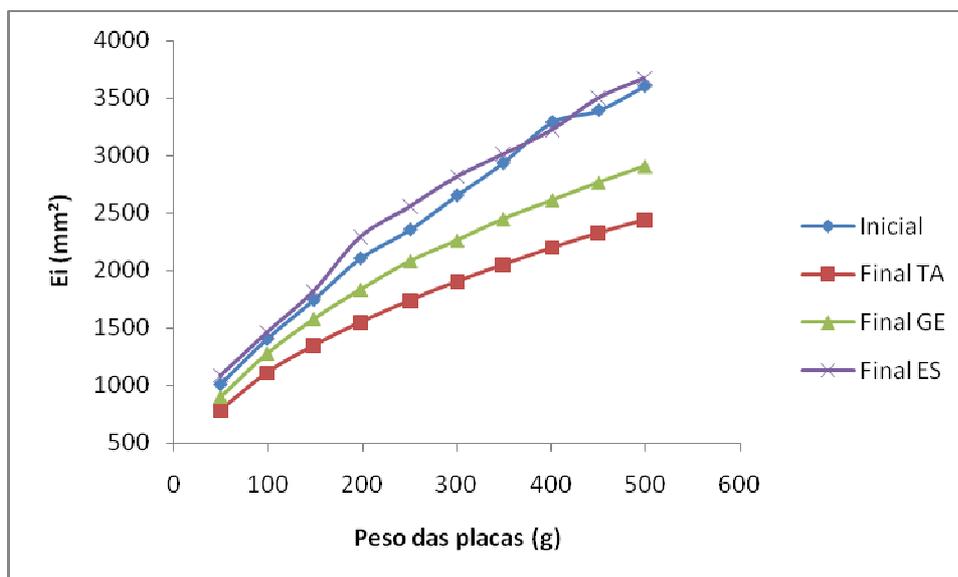


Figura 11 – Valores referentes a espalhabilidade apresentada pelas formulações contendo adapaleno na forma livre durante 90 dias de armazenamento em temperatura ambiente (TA), geladeira (GE) e estufa (ES).

De acordo com os resultados apresentados anteriormente pode-se observar que a incorporação de suspensões nanoparticuladas nas formulações semissólidas conferiu uma manutenção dos valores de espalhabilidade durante os 90 dias de análises, independente da temperatura de armazenamento.

O tipo de influência que os sistemas nanoestruturados exercem nas formulações semissólidas tem sido estudado por diversos autores. O comportamento reológico de formulações semissólidas contendo suspensões de nanocápsulas, nanoesferas e nanoemulsões com nimesulida foi estudado por Alves e colaboradores (2007b). Os autores observaram que a adição das nanopartículas não modificou as características reológicas das formulações de um gel hidrofílico, o qual apresentou comportamento não newtoniano com fluxo pseudoplástico.

O mesmo foi observado por Roggia (2009) que estudou formulações contendo nanocápsulas de benzofenona-3 quando incorporadas em bases de Carbopol® em hidrogel e de Salcare SC 940® em creme gel. Neste trabalho, foi possível observar que a adição das nanocápsulas não alteraram de forma significativa a estabilidade reológica de ambas as formulações estudadas.

Um estudo realizado com nanocápsulas poliméricas de meloxicam após a incorporação em formulações semissólidas utilizando como veículo o Carbopol® verificou que a incorporação das nanocápsulas nas bases semissólidas armazenadas tanto em

temperatura ambiente, quanto em estufa, contribuiu para a manutenção das características reológicas da formulação (BOCHI, 2010).

Desta forma neste trabalho também o Carbopol[®] representou ser um veículo adequado para a incorporação das suspensões contendo nanocápsulas de adapaleno, visto que as características reológicas das mesmas foram mantidas sem sofrer alterações significativas.

Por fim através da avaliação das características reológicas, foi possível verificar que a incorporação das nanocápsulas nas bases semissólidas armazenadas tanto em temperatura ambiente, como geladeira e estufa, contribuiu para um aumento do tempo de permanência das características reológicas da formulação quando comparada com as formulações contendo o fármaco na forma livre. Considerando que o veículo utilizado para incorporação das formulações independente da forma de dispersão do adapaleno foi o mesmo.

Quando o adapaleno estava na forma livre, as alterações foram observadas mais rapidamente. Pode-se considerar desta forma, que a formulação contendo o ativo na forma nanoestruturada apresentou maior estabilidade com a incorporação deste tipo de sistema, demonstrando uma maior viabilidade tecnológica.

4.3 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ADAPALENO E DO PERFIL DE DEGRADAÇÃO DAS FORMULAÇÕES SEMISSÓLIDAS CONTENDO ADAPALENO

Construção da curva padrão para determinação do teor de adapaleno

Como é possível visualizar graficamente na Figura 12, a curva padrão do adapaleno apresentou regressão linear significativa ($p < 0,05$), não havendo desvio significativo de linearidade ($p > 0,05$), mostrando-se desta forma linear conforme validado por Barrios (2010). A equação da reta para o método foi: $y = 200,58x - 585,65$; onde x é a concentração em $\mu\text{g/mL}$ e y a área, apresentando um coeficiente de correlação de 0,9993.

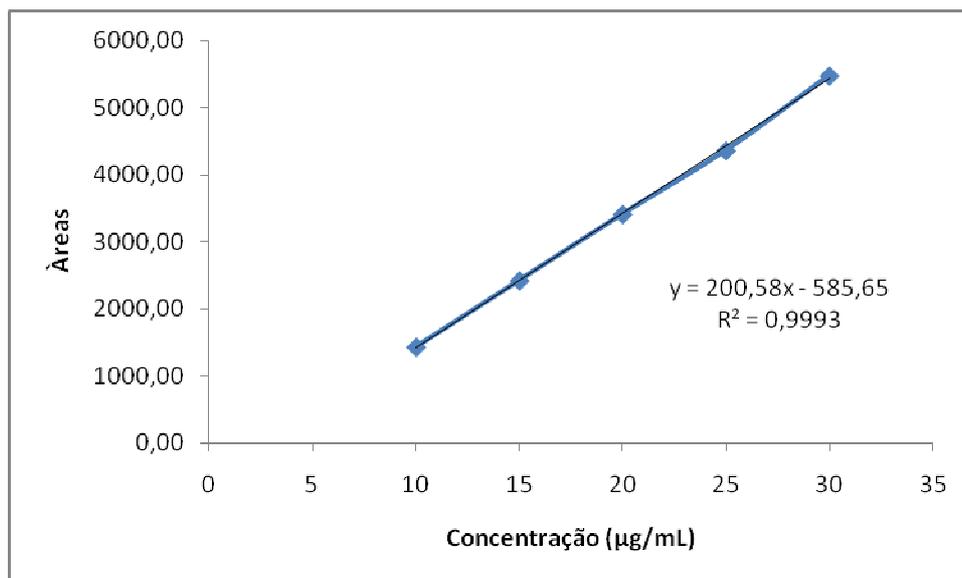


Figura 12 – Curva padrão do adapaleno obtida por CLAE.

Através dos resultados obtidos, podemos demonstrar que a curva analítica pode ser utilizada para a interpolação de valores experimentais, visando à determinação quantitativa do teor de adapaleno.

Doseamento das formulações semissólidas contendo adapaleno na forma livre e nanoencapsulada

Na Tabela 12 e Figura 13, estão descritos e representados os resultados referentes ao teor das amostras contendo adapaleno na forma livre e na forma nanoencapsulada quando incorporado em formulações semissólidas e, mantidas sob o armazenamento em temperatura ambiente (TA), geladeira (GE) e estufa (ES) por um período de 90 dias.

Tabela 12 – Valores referentes ao teor de adapaleno, incorporado nas formulações semissólidas sob armazenamento em temperatura ambiente (TA), geladeira (GE) e estufa (ES)

Dias	NANO Teor (%) ± DP			LIVRE Teor (%) ± DP		
	TA	GE	ES	TA	GE	ES
0	98,13 ± 5,88	98,13 ± 5,88	98,13 ± 5,88	96,42 ± 5,88	96,42 ± 5,88	96,42 ± 5,88
7	97,88 ± 4,91	94,14 ± 4,43	91,06 ± 0,30	96,86 ± 3,34	93,84 ± 3,37	93,32 ± 1,76
14	94,76 ± 0,40	92,17 ± 12,34	90,59 ± 2,92	94,15 ± 1,49	93,80 ± 0,32	92,99 ± 2,77
30	91,64 ± 6,57	91,83 ± 3,61	90,13 ± 2,03	93,81 ± 3,09	93,19 ± 4,64	92,14 ± 3,64
60	90,72 ± 2,00	89,24 ± 4,30	86,74 ± 2,32*	88,22 ± 2,56	85,16 ± 2,12*	86,47 ± 2,18
90	89,78 ± 3,81	90,33 ± 4,46	87,72 ± 1,83*	89,87 ± 0,68	88,07 ± 2,80	88,96 ± 1,30

* Valores estatisticamente significativos ($p \leq 0,05$) quando comparados com os seus resultados iniciais com relação à temperatura ambiente, geladeira e estufa.

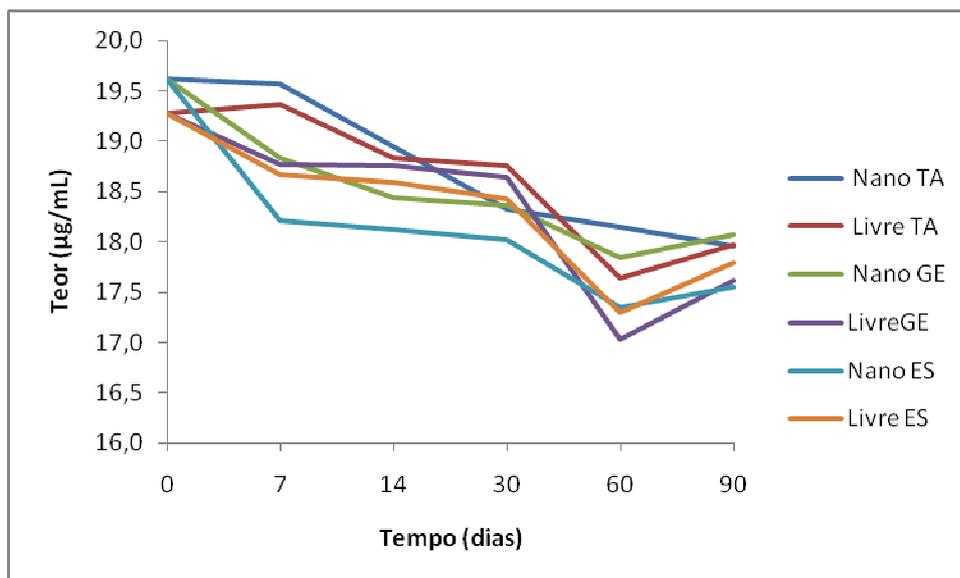


Figura 13 – Valores referentes ao teor do adapaleno para forma livre e nanoencapsulada durante os 90 dias de análises em temperatura ambiente (TA), geladeira (GE) e estufa (ES).

De acordo com os resultados obtidos é possível observar que ambas as formulações contendo adapaleno apresentaram uma diminuição da concentração de fármaco, em todas as temperaturas armazenadas durante o período de experimento, porém esta alteração do teor só foi significativa ($p < 0,05$) para as amostras contendo adapaleno nanoencapsulado mantidas à 40 °C a partir de 60 dias de estudo, e para as amostras contendo adapaleno na forma livre mantidas em geladeira em 60 dias de experimento.

As formulações semissólidas contendo nanocápsulas de adapaleno apresentaram teor inicial de 98,13%. Para as amostras armazenadas em estufa (40 ± 2 °C) esse teor caiu abaixo de 90% a partir dos 60 dias de análise, e para as amostras armazenadas em temperatura ambiente (25 ± 2 °C) e geladeira (-4 ± 2 °C) essa diminuição ocorreu somente após 90 dias do início do experimento.

As formulações semissólidas contendo adapaleno na forma livre apresentaram teor inicial de 96,42%. Esse teor decaiu abaixo de 90% a partir do 60° dia de estudo independente da temperatura armazenada.

A influência do polímero neste tipo de sistema vem sendo investigado por alguns autores. Paese (2008) e Roggia (2009) realizaram experimentos com nanocápsulas poliméricas de benzofenona-3 e observaram que apesar da diminuição do teor de ativo, as nanocápsulas mantiveram o mesmo por um período maior de tempo. Nas formulações de hidrogel e creme gel em que o ativo estava na forma livre, o teor decaiu abaixo de 90% a partir dos primeiros 60 dias de análises, já quando a mesma encontrava-se nanoencapsulada, o teor do fármaco decaiu abaixo de 90% somente após 90 dias de análises.

Ferrony (2009) estudou a estabilidade de nanocápsulas poliméricas contendo dexametasona, observando, que as formulações armazenadas em estufa que continham o fármaco na forma nanoencapsulada apresentaram seus teores acima de 90% por um período superior (60 dias), quando comparado ao fármaco livre (30 dias), concluindo que as nanocápsulas estariam protegendo o ativo com relação à degradação.

Bochi (2010) trabalhou com nanocápsulas poliméricas de meloxicam incorporadas em formulações semissólidas. De acordo com os resultados obtidos para o doseamento das formulações, foi possível verificar a manutenção dos teores acima de 90% até mesmo para as formulações armazenadas 180 dias em estufa, concluindo assim, que as NC exerceram uma ação protetora frente à degradação do fármaco.

De acordo com os resultados apresentados no presente trabalho pode-se observar que 90 dias de experimento nas diferentes temperaturas de armazenamento, não foram suficientes para detectar diferenças significativas em relação ao teor (%) do adapaleno. Um período maior torna-se necessário para degradação do produto, tanto para a forma livre como nanoencapsulada.

Determinação do perfil de degradação do adapaleno na forma livre e nanoencapsulada incorporado nas formulações semissólidas

Para a determinação do perfil de degradação do adapaleno das formulações semissólidas foram utilizados os valores referentes aos teores (%) obtidos durante os 90 dias de experimento das formulações mantidas em temperatura ambiente (25 ± 2 °C), os quais foram ajustados utilizando o programa Scientist® (MicroMath Scientific Software, Inc.) conforme metodologia descrita anteriormente.

Para a formulação contendo adapaleno na forma livre, o modelo utilizado foi de equação de ordem zero, devido à formulação não se ajustar em modelos mono e biexponencial. Para uma equação de ordem zero o gráfico é realizado plotando-se a concentração do fármaco versus o tempo. O fármaco livre apresentou $k = 0,0979$; $C_0 = 96,5183$; $r = 0,969$; $MSC = 1,99$ e $t_{90} = 98$ dias. A Figura 14 representa os valores graficamente.

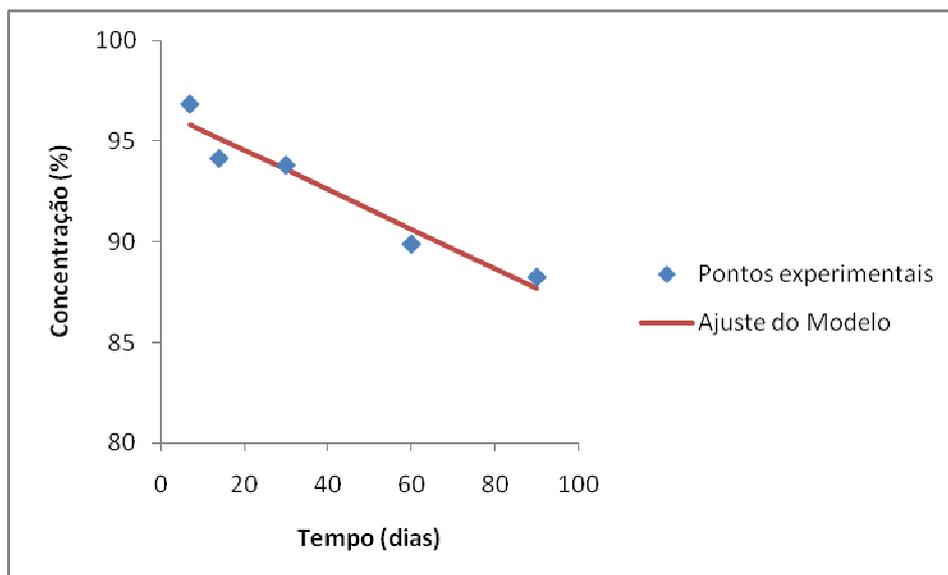


Figura 14 – Concentração do adapaleno em função do tempo para a formulação semissólida contendo o fármaco na forma livre.

A formulação semissólida contendo nanocápsulas de adapaleno foi descrita adequadamente utilizando modelo biexponencial. Os seguintes resultados foram obtidos: $A = 0,124$; $\alpha = 0,098$; $B = 0,918$; $\beta = 0,00024$; $r = 0,999$ e $MSC = 4,70$. A Figura 15 expressa o resultado graficamente.

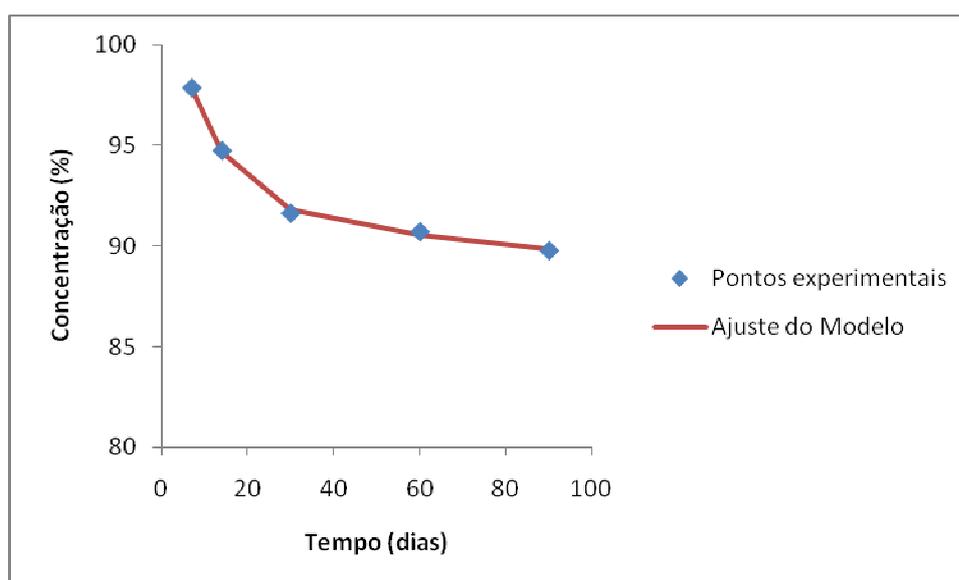


Figura 15 – Concentração do adapaleno em função do tempo para a formulação semissólida contendo o fármaco nanoencapsulado.

Para um modelo biexponencial de perfil de degradação, temos duas velocidades de

degradação do fármaco, ou seja, primeiramente será degradado o ativo que encontra-se adsorvido à parede polimérica para posterior degradação do fármaco que encontra-se encapsulado no núcleo oleoso. Portanto, através deste experimento, foi possível concluir que o adapaleno apresentou 10% da sua concentração adsorvido à parede polimérica e 90% nanoencapsulado no núcleo oleoso.

Cruz (2005) propôs um modelo biexponencial de degradação para quantificar as quantidades de éster etílico de indometacina no núcleo oleoso e adsorvido na parede polimérica. O estudo foi realizado com o ativo associado à nanocápsulas, nanoesferas e nanoemulsão, onde foi possível observar que, quando o éster etílico de indometacina estava associado à nanocápsulas o tempo de meia vida foi maior, 5,9 minutos na fase de liberação rápida e 288 minutos na liberação sustentada. Através dos parâmetros A e B (quantidade de fármaco degradado na velocidade α e β respectivamente) concluiu-se que de 5 a 15% de éster etílico de indometacina estava adsorvido na superfície polimérica e que de 85 a 95%, permaneceu retido no núcleo oleoso.

Felippi (2008) analisou a estabilidade de nanocápsulas contendo isotretinoína frente à luz UVA, onde todas as formulações nanoparticuladas foram capazes de proteger o ativo e diminuir a degradação em suspensões aquosas. A autora concluiu que a degradação da isotretinoína nanoencapsulada mostrou perfil biexponencial de primeira ordem, sugerindo que apenas 50 % do fármaco encontravam-se no núcleo oleoso da partícula, estando os outros 50 % estavam associados à superfície da mesma.

Barrios (2010) realizou ajustes de curvas dos perfis cinéticos, segundo os modelos monoexponencial e biexponencial, referentes aos resultados obtidos na liberação *in vitro*. Para a nanodispersão de adapaleno e a suspensão de nanocápsulas utilizando o Miglyol® como núcleo oleoso foram melhores descritos de acordo com a modelagem matemática monoexponencial. Enquanto que a suspensão de nanocápsulas contendo adapaleno em núcleo oleoso de óleo de melaleuca foi descrita utilizando um modelo biexponencial onde o fármaco encontra-se, em maior parte, dissolvido no núcleo oleoso da NC, ocorrendo uma liberação inicial rápida de apenas 7%, correspondendo ao adapaleno que estava adsorvido na parede polimérica. A parte correspondente ao fármaco encapsulado no núcleo oleoso foi de 93%.

Comparando os resultados obtidos neste trabalho com os encontrados por Barrios (2010), pode-se perceber que os valores dos parâmetros A e B batem com os encontrados na liberação e que após a incorporação das suspensões em bases semissólidas utilizando como veículo o Carbopol®, o perfil continuou sendo biexponencial e cerca de 90% do adapaleno encontrava-se no núcleo oleoso.

4.4 ESTUDOS DE PERMEACÃO *IN VITRO*

Para que um fármaco promova a resposta farmacológica desejada é necessário que chegue até o sítio de ação uma determinada concentração do ativo. Como as propriedades físico-químicas das moléculas estão relacionadas com a sua distribuição no organismo, a associação de fármacos aos carreadores tem sido considerada para a obtenção de uma liberação controlada permitindo assim, um maior espaçamento entre as doses e uma diminuição dos efeitos colaterais (FELIPPI, 2008).

Para a realização dos estudos de permeação cutânea são utilizadas técnicas de avaliação tanto *in vitro* como *in vivo*. Para as técnicas *in vitro* são empregadas células de difusão, sendo estas células constituídas por um compartimento receptor e um doador o qual é separado por uma membrana. As membranas utilizadas nestes experimentos podem ser sintéticas, de origem humana ou animal (SARVEIYA et al., 2004; SASSON, 2006). A utilização de pele animal para avaliação da permeação transdérmica de ativos é uma prática muito comum entre os pesquisadores. Animais como rato, porco, cobra e camundongo são bastante utilizados nestes experimentos (GODIN e TOUITOU, 2007; BARBERO e FRASCH, 2009).

Nos estudos de permeação cutânea, alguns testes comparativos realizados com pele de animais e humana concluíram que a pele de porco representa um modelo potencialmente compatível com os resultados obtidos nos experimentos realizados com a pele humana (BARBERO e FRASCH, 2009). A pele de porco em especial a orelha, é a que mais se assemelha com a pele humana, tanto em características como espessura do estrato córneo e da epiderme, bem como em sua estrutura folicular. Além disso, a anatomia vascular e o arranjo das fibras de colágeno na derme, assim como o índice de lipídios e ceramidas do estrato córneo, apresentam-se muito similares (FERNANDEZ et al, 2000; GODIN e TOUITOU, 2007).

Para a realização dos testes de permeação cutânea do adapaleno na forma livre e nanoencapsulada e incorporadas em formulações semissólidas, foram utilizadas pele de orelha de porco como membrana. Para quantificação do adapaleno nos estudos de permeação foi empregada uma curva analítica na faixa de concentração entre 0,5 a 4,0 µg/mL. A metodologia utilizada foi previamente validada por Barrios (2010), sendo o doseamento realizado por CLAE, com detecção em 254 nm, conforme descrito anteriormente.

Para os produtos de uso dermatológico deseja-se que o fármaco administrado tenha um pequeno fluxo e uma alta taxa de retenção nas membranas. O contrário espera-se dos produtos

transdérmicos, os quais exercem efeitos sistêmicos, ou seja, é necessário uma baixa taxa de retenção do fármaco nas membranas e um fluxo constante através das mesmas (TOUITOU et al, 1998).

Nos estudos de permeação cutânea realizados com adapaleno, tanto para a forma livre como nanoencapsulada, considerando todos os tempos de análise (2, 4, 6, 8, 10 e 24 horas) e condições *sink*, pode-se verificar que não houve quantificação do fármaco no compartimento receptor, o que indica que provavelmente o ativo não apresenta absorção.

Fármacos como o adapaleno, cujo sítio de ação é restrito à superfície ou às primeiras camadas da pele, tem como objetivo terapêutico apenas um efeito local. De acordo com estes resultados não ocorre passagem do ativo para as camadas mais profundas da pele. Com a concentração do fármaco no tecido alvo, diminui-se os efeitos colaterais, devido à exposição sistêmica não ocorrer (TOUITOU et al, 1998; ASBILL e MICHNIAK, 2000; KREILGAARD, 2002; FELIPPI, 2008).

Baseado no limite de quantificação (0,37 µg/mL) do presente experimento, o fármaco não foi detectado na solução receptora, sendo realizados desta forma, estudos para quantificar o ativo nas diferentes camadas da pele (LEVEQUE et al, 2003). Esta técnica utiliza duas metodologias específicas, a técnica de *tape stripping* e a de retenção cutânea.

Através da técnica de *tape stripping* é possível avaliar a quantidade de substância presente no estrato córneo, ou seja, na camada mais superficial da pele. Já a técnica de retenção cutânea permite avaliar a presença do ativo na epiderme e na derme.

Os valores referentes à distribuição do adapaleno, tanto para forma livre como para forma nanoencapsulada, nas diferentes camadas da pele, encontram-se descritos na Tabela 13 e podem ser visualizados na Figura 16.

Tabela 13 – Concentração de adapaleno (µg/cm²) nas diferentes camadas da pele, para as formulações semissólidas contendo o ativo na forma nanoencapsulada e na forma livre (n=9)

	NANO			LIVRE		
	Concentração (µg/cm ²) ± DP	DPR	% Recuperação	Concentração (µg/cm ²) ± DP	DPR	% Recuperação
Sobre a pele	15,08 ± 1,79	11,86	61,91	15,07 ± 1,90	12,59	61,84
Estrato córneo**	2,24 ± 0,26	11,83	9,18	2,22 ± 0,15	6,55	9,11
Epiderme+Derme	1,23 ± 0,17*	13,88	5,06	0,84 ± 0,13*	15,29	3,43

* Significativo para p < 0,05

** Espessura do estrato córneo = 6,38 µm.

Conforme os resultados apresentados (Tabela 13 e Figura 16) pode-se observar que o

adapaleno independentemente de estar na forma livre ou nanoencapsulada, apresenta uma maior retenção sobre a pele ($15,07 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ e $15,08 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, respectivamente). Para o fármaco nanoencapsulado, o equivalente a $2,24 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de adapaleno ficou retido na camada mais superficial da pele, e o adapaleno na forma livre apresentou $2,22 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ no estrato córneo.

Para o fármaco quantificado na derme e epiderme, a forma nanoencapsulada ($1,23 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) apresentou uma penetração significativamente maior ($p < 0,05$), quando comparada com a forma livre do adapaleno ($0,84 \mu\text{g}/\text{cm}^2$).

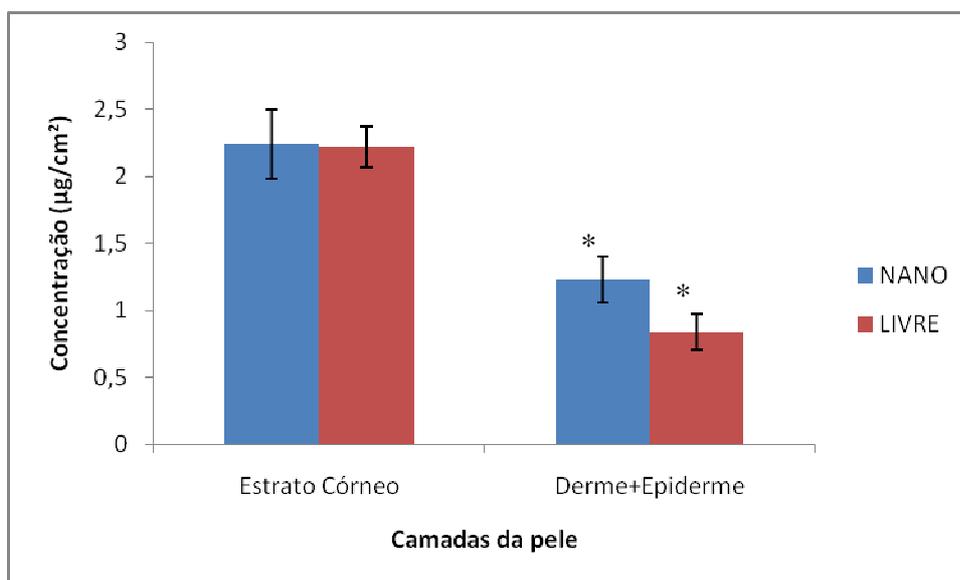


Figura 16 – Distribuição do adapaleno nas diferentes camadas da pele quando incorporado em formulações semissólidas na forma livre e nanoencapsulada.*Significativo para $p < 0,05$.

No presente estudo o tamanho das partículas ficou entre 170 a 300 nm, este tamanho pode ter sido determinante para um maior controle da liberação do ativo através da pele, visto que partículas menores que 100 nm passam livremente por entre as células chegando com facilidade na corrente sanguínea (BOUCHEMAL et al, 2004; FRONZA, 2006). As nanopartículas poliméricas têm sido amplamente estudadas como carreadores de fármacos devido a sua capacidade em controlar a liberação de uma variedade de ativos, aumentar a estabilidade de fármacos e ainda reduzir sua toxicidade (POLETTTO et al, 2008).

Vários autores têm estudado a permeação cutânea de diferentes ativos associados à nanocarreadores. Lademann e colaboradores (2007) avaliaram nanopartículas de fluoresceína com diâmetro médio de 320 nm como carreadores para entrega de ativos em folículos pilosos. Os autores concluíram que as nanopartículas mantiveram-se por mais tempo nos mesmos, quando comparados com as partículas fora da escala nanométrica.

Alvarez-Román e colaboradores (2004a) estudaram permeação de nanopartículas de

poliestireno entre 20 e 200 nm em pele de porco e observaram que essas partículas se acumularam preferencialmente nas aberturas foliculares e que, a localização folicular foi favorecida pelo menor tamanho de partícula. Resultados estes que confirmam a hipótese de que quando se considera o transporte cutâneo de formulações particuladas, a rota de permeação através dos apêndices cutâneos pode representar um importante papel.

Shim e colaboradores (2004) estudaram o efeito do tamanho das partículas (40 e 130 nm) sobre a taxa de permeação de nanopartículas de minoxidil na pele. De acordo com os resultados, os autores concluíram que as partículas com menor diâmetro (40 nm) facilitaram amplamente a penetração do minoxidil para o compartimento receptor das células de Franz, e que, a quantidade de fármaco retido na superfície da pele não foi dependente do tamanho da partícula. Cabe lembrar que nesse estudo as partículas apresentaram-se menores que 300 nm.

Luengo e colaboradores (2006) avaliaram a permeação cutânea utilizando o modelo de difusão de Franz, em nanopartículas de ácido poli (lático-co-glicólico) contendo ácido flufenâmico após incorporação em hidrogéis de Natrosol[®]. Os resultados não apresentaram diferença significativa em relação à quantidade de ácido flufenâmico depositado no estrato córneo, porém nas camadas mais profundas da pele houve diferença significativa entre o fármaco na forma livre e nanoencapsulada em tempo de incubação maior do que 12 horas, sendo que o fármaco nanoencapsulado permeou mais.

Em estudo de permeação realizado por Paese (2008) com uma formulação de creme gel contendo Benzofenona3 como ativo e utilizando pele de porco como membrana, foi verificada uma maior distribuição da Benzofenona3 nanoencapsulada no estrato córneo nas primeiras 2 horas de experimento, mantendo-se este resultado até as 8 horas.

Quanto maior for a polaridade de uma substância, menor será a sua lipofilia e, consequentemente as substâncias de menor lipofilia são de difícil permeação. O adapaleno por ser um composto altamente lipofílico, permeia mais facilmente através da pele, porém apresenta uma baixa absorção cutânea, visto que se deposita na epiderme e no folículo piloso, que é a área de segmentação (RIGOPOULOS et al, 2004).

Alguns estudos têm verificado que a poli-ε-caprolactona apresenta afinidade pelo estrato córneo. Alves e colaboradores (2007b) avaliaram a penetração percutânea in vitro de formulações semissólidas contendo nanoesferas, nanocápsulas ou nanoemulsões de nimesulida, e concluíram que o gel contendo nanocápsulas de nimesulida, apresentou penetração nas camadas mais profundas da pele. Adicionalmente, uma maior área superficial dos nanocarreadores possibilita um aumento de contato do fármaco nanoencapsulado com o estrato córneo, aumentando assim a sua permeação nas primeiras camadas da pele e o seu

tempo de residência nesta camada (JENNING et al, 2000; ALVAREZ-ROMÁN et al, 2004b).

Para fármacos como o adapaleno, o qual é utilizado para uma terapia efetiva nas enfermidades cutâneas, o que se busca é que o agente ativo seja liberado no sítio de ação, em concentrações adequadas para produzir o efeito farmacológico. No caso de infecções superficiais cutâneas, que é o caso da acne, onde o agente patogênico reside sobre ou entre as camadas mais externas da pele, o produto terapêutico deve ser liberado no estrato córneo em concentrações adequadas para inibir o crescimento do agente patogênico (PERSHING et al, 1993).

Os testes de *tape stripping* e retenção cutânea mostraram que independente da forma de dispersão do adapaleno, ocorreu uma maior retenção no compartimento doador, apresentando dessa forma, uma maior tendência do ativo em ficar retido mais superficialmente. O fármaco apresentou também uma pequena absorção cutânea na derme e epiderme, sendo que na forma nanoencapsulada foi significativamente ($p < 0,05$) maior a absorção quando comparada com a forma livre do adapaleno, provavelmente pelo tamanho reduzido da partícula em conseguir permear mais profundamente.

De acordo com os estudos citados anteriormente é possível observar que para cada sistema carreador associado a um determinado fármaco, um tipo de permeação é esperado, ou seja, permear mais profundamente ou não é dependente da forma de dispersão e das características de cada ativo e ainda do tipo de carreador associado.

5 CONCLUSÃO

A realização desse trabalho permitiu obter as seguintes conclusões:

As características físico-químicas das suspensões contendo nanocápsulas de adapaleno com óleo de melaleuca foram mantidas, após a incorporação em gel de Carbopol[®], apresentando viabilidade tecnológica.

O tamanho médio da partícula e do índice de polidispersão das formulações semissólidas contendo nanocápsulas de adapaleno apresentaram-se estáveis durante os 90 dias de armazenamento quando mantidas em temperatura ambiente e geladeira.

O potencial zeta das formulações semissólidas contendo nanocápsulas de adapaleno armazenadas em temperatura ambiente, geladeira e estufa não sofreram alterações significativas ($p > 0,05$) durante os 90 dias de armazenamento.

Os valores de pH para as formulações semissólidas contendo adapaleno na forma livre e nanoencapsulada apresentaram-se dentro dos níveis indicados para formulações de uso tópico durante os 90 dias de experimento independente da temperatura armazenada.

As características organolépticas referentes à aparência, cor e odor não apresentaram diferença entre as formulações semissólidas contendo adapaleno armazenadas em temperatura ambiente e estufa. Para as amostras mantidas em geladeira observou-se que a formulação contendo nanocápsulas de adapaleno manteve as características organolépticas durante os 90 dias de experimento enquanto que a formulação contendo adapaleno livre apresentou alterações a partir dos 60 dias do experimento.

Ambas as formulações contendo adapaleno na forma livre ou nanoencapsulada apresentaram fluxo não-newtoniano e comportamento pseudoplástico.

Os valores de viscosidade para as formulações contendo nanocápsulas de adapaleno mantiveram-se estáveis durante os 90 dias de experimento independente da temperatura de armazenamento. Para as formulações contendo o fármaco na forma livre as amostras mantidas em geladeira e estufa não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) durante o período

testado, porém as amostras mantidas em temperatura ambiente aumentaram significativamente seus valores de viscosidade.

Nos estudos de espalhabilidade ocorreu uma diminuição significativa ($p < 0,05$) entre a espalhabilidade inicial e final quando a formulação contendo adapaleno livre foi armazenada em temperatura ambiente e geladeira. As formulações contendo nanocápsulas de adapaleno não alteraram significativamente seus valores de espalhabilidade durante os 90 dias de estudo em qualquer temperatura de armazenamento.

As formulações contendo o fármaco nanoencapsulado mantiveram seus teores acima de 90% por um período maior do que o observado para a forma livre. As formulações semissólidas contendo nanocápsulas de adapaleno armazenadas em estufa apresentaram diminuição do teor a partir dos 60 dias de análise, e para as amostras armazenadas em temperatura ambiente e geladeira essa diminuição ocorreu somente após 90 dias do início do experimento. As formulações contendo o adapaleno na forma livre apresentaram teor abaixo de 90% a partir dos 60 dias de estudo, independente da temperatura armazenada.

A degradação do adapaleno nanoencapsulado e incorporado na formulação semissólida mostrou um perfil compatível com modelo biexponencial de primeira ordem, sugerindo que cerca de 90% do fármaco encontra-se no núcleo oleoso da partícula, estando os 10% restantes associado à superfície da mesma. Resultados estes de acordo com os encontrados por Barrios (2010), que estudou o perfil de degradação das suspensões contendo nanocápsulas de adapaleno.

Os testes de *tape stripping* e retenção cutânea demonstraram que independente da forma de dispersão do adapaleno, ocorreu uma maior retenção no compartimento doador, apresentando dessa forma, uma maior tendência do ativo em ficar retido mais superficialmente.

O fármaco apresentou absorção cutânea na derme e epiderme, sendo que foi significativamente ($p < 0,05$) maior para a forma nanoencapsulada, quando comparada com a forma livre do adapaleno.

As formulações semissólidas contendo nanocápsulas de adapaleno com óleo de

melaleuca apresentam viabilidade tecnológica, possibilitando que novas bases semissólidas sejam testadas. Sendo assim, torna-se de fundamental importância a realização de ensaios de biometria cutânea in vivo para a comprovação da segurança e eficácia das formulações desenvolvidas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEC, J.; CHATELUS, A.; WAGNER, N. Skin distribution and pharmaceutical aspects of adapalene gel. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 36, n. 6, 1997.

ALLEN Jr., L. V.; POPOVICH, N. G.; ANSEL, H. C. **Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos**. 8º Ed. Artmed: Porto Alegre, 2007.

ALVAREZ-ROMÁN, R.; NAIKA, A.; KALIA, Y.N.; GUYA, R.H.; FESSIA, H. Skin penetration and distribution of polymeric nanoparticles. **Journal of controlled release**, v.99, p. 53-62, 2004a.

ALVAREZ-ROMÁN, R.; NAIKA, A.; KALIA, Y.N.; GUYA, R.H. Enhancement of topical delivery from biodegradable nanoparticles. **Pharmaceutical Research**, v. 21, p. 1818-1824, 2004b.

ALVES, M. P. Desenvolvimento e avaliação da estabilidade de bases dermatológicas. Influência de promotores de absorção na permeação transdérmica de piroxicam. **Dissertação de Mestrado**. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Farmacêuticas: Universidade Federal de Santa Maria- UFSM. 1996.

ALVES, C.; DINIZ, D.; LIMA, E. Estudo da Encapsulação da Isotretinoína em Lipossomas. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.4, n.1, p.7-85, 2007a.

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

ANVISA Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Brasília, DF, 2004.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Bula do paciente, 2005. Disponível em:<http://bulario.bvs.br/index.php?action=search.2004031817580533009945000123&mode=dir&letter=I> Acesso em 29 outubro 2008.

ASBILL, C. S.; MICHNIAK, B. B. Percutaneous penetration enhancers: local versus transdermal activity. **Pharmaceutical Science & Technology Today**, v. 3, p. 36-41, 2000.

AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2.ed. Porto Alegre: Artmed, 2001.

AZEVEDO, M. M. M. Nanoesferas e a liberação controlada de fármacos. **Monografia**. Campinas: 2002.

AZULAY, D. R.; AZULAY, R.D. **Dermatologia**. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

BARBERO, A. M.; FRASCH, H. F. Pig and guinea pig skin as surrogates for human in vitro penetration studies: A quantitative review. **Toxicology in vitro**, v. 23, p. 1-13, 2009.

BARRIOS, J. G. Desenvolvimento e caracterização de suspensões contendo nanocápsulas de adapaleno com diferentes núcleos oleosos. **Dissertação de Mestrado**, Santa Maria-RS, 2010.

BARRY B. in AULTON, M. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

BASSETT, I. B.; PANNOWITZ, D. L.; BARNETSON, R. S. Um estudo comparativo do óleo da árvore do chá versus peróxido de benzoíla no tratamento da acne. **Medical Journal of Australia**, v. 153, p. 455-458, 1990.

BENTLEY, M.V.L.B. Desenvolvimento de produtos dermatológicos contendo corticosteróides: Avaliação da liberação e penetração transcutânea por metodologia in vitro. **Tese de Doutorado**, São Paulo - SP, 1994.

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

BOCHI, L. D. C. S. Desenvolvimento, caracterização e avaliação da atividade antinociceptiva de uma formulação tópica semissólida contendo nanocápsulas de meloxicam. **Dissertação de Mestrado**, Santa Maria – RS, 2010.

BONINA, F. P. et al. In vitro and in vivo evaluation of polyoxyethylene esters as dermal prodrugs of ketoprofen, naproxen and diclofenac. **European Journal of Pharmaceutics Sciences** v. 14(2), p. 123-134, 2001.

BOUCHEMAL, K.; BRIANÇON, S.; PERRIER, E.; FESSI, H. Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification : solvent, oil surfactant optimisation. **Pharmaceutical Nanotechnology**, v.280, p.241-251, 2004.

BREIER, A. R.; STEPPE, M.; SCHAPOVAL, E. E. S. Photodegradation kinetics of fexofenadine hydrochloride using a LC method. **Chromatografia**, v. 64, p. 725-729, 2006.

BRIGGER, I.; DUBERNET, C.; COUVREUR, P.; Nanoparticles em cancer therapy and diagnosis. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, p. 631- 651, 2002.

BRISAERT, M.; GABRIELS, M.; MATTHIJS, V.; PLAIZIERVERCAMMEN, J. Liposomes with tretinoin: a physical and chemical evaluation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.26, p.909-917, 2001.

CABOI, F.; MURGIA, S.; MONDUZZI, M.; LAZZARI, P. NMR investigation on Malaleuca alternifolia essential oil dispersed in the Monoolein aqueous system: phase behavior and dynamics. **Langmuir**, v. 18, p. 7916-7922, 2002.

CAL, K. Commentary to the article “Human skin penetration of the major components of Australian tea tree oil applied in its pure form and as a 20% solution *in vitro*.” **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 68, p. 838 – 839, 2008.

CALVO, P.; ALONSO, M. J.; VILA-JATO, J. L.; ROBINSON, J. R. Improved ocular bioavailability of indomethacin by novel ocular drug carriers. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. v. 48, p. 1147–1152, 1996.

CARSON, C. F. ; RILEY, T. V. Susceptibility of *Propionibacterium acnes* to the essential oil of Melaleuca alternifolia. **Letters in Applied Microbiology**, v. 19, p. 24-25, 1994.

CARSON, C. F.; HAMMER, K. A.; RILEY, T. V. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 1, p. 985-990, 2006.

CAUSSIN, J.; GOORIS, G. S.; BOUWSTRA, J. A.; FTIR studies show lipophilic moisturizers to interact with stratum corneum lipids, rendering the more densely packed. **Biochimica et Biophysica Acta**, n. 1778, p. 1517- 1524, 2008.

CHORILLI, M.; BRIZANTE, A. C.; RODRIGUES, C. A.; SALGADO, H. R. N. Aspectos gerais em sistemas transdérmicos de liberação de fármacos. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 88, p. 7-13, 2007.

COLLIER, C. N. et al. The prevalence of acne in adults 20 years and older. **American Academy of Dermatology**, v. 58, p.56-59, 2008.

CORRÊA, N. M.; JÚNIOR, F. B. C.; IGNÁCIO, R. F.; LEONARDI, G. R. Avaliação do comportamento reológico de diferentes géis hidrofílicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 1, p. 73 – 78, 2005.

COUVREUR, P., BARRATT, G., FATTAL, E., LEGRAND, P., VAULTIER, C., Nanocapsule technology. A review. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**. 19, p. 99 – 134, 2002.

CRUZ, L.; SOARES, L.; DALLA COSTA, T.; MEZZALIRA, G.; SILVEIRA, N.; GUTERRES, S.; POHLMANN, A. Diffusion and mathematical modeling of release profiles from nanocarriers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 313, p. 198-205, 2005.

CZERNIELEWSKI, J. ; MICHEL, S. ; BOUCLIER, M.; BAKER M.; HENSBY J. C. Adapalene biochemistry and the evolution of a new topical retinoid for treatment of acne. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**. v.15, p.5–12, 2001.

DE PAULA I. C.; ORTEGA G. G.; BASSANI V. L.; PETROVICK P. R. Development of Ointment Formulations Prepared with Achyrocline saturoioides Spray-Dried Extracts. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 24, n.3, p. 235 – 241, 1998.

DOMINGUES, G. S.; GUTERRES, S. S.; BECK, R. C. R.; POHLMANN, A. R.; Micropartículas nanorrevestidas contendo um fármaco modelo hidrofóbico: preparação em etapa única e caracterização biofarmacêutica. **Química Nova**, v. 31, n.8, p. 1966-1972, 2008.

FELIPPI, C. C. Nanopartículas contendo isotretinoína: Preparação, caracterização físico-química, estudo de estabilidade e avaliação da penetração cutânea. **Dissertação de Mestrado**, Porto Alegre-RS, 2008.

FENDLER, J.H. Membrane Mimetic Chemistry. New York: **Wiley-Interscience**, 1982.

FERNANDEZ, C.; MARTI-MESTRES, G.; RAMOS, J.; MAILLOLS, H. L. C. Analysis of benzophenone-3: II application to determination of *in vitro* and *in vivo* skin penetration from solvents, coarse and submicron emulsions. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 24, p. 155-165, 2000.

FERRONY, D. A. Estudo de estabilidade de uma formulação semissólida contendo nanocápsulas de dexametasona. **Dissertação de Mestrado**, Santa Maria –RS, 2009.

FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J. Procédé de préparation des systèmes colléaux dispersibles d'une substance sous forme de nanocapsules. **European Patent**, 0274961 A1, 1988.

FRANZ, T. J. Percutaneous absorption. On the relevance of in vitro data. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 64, nº. 3, p. 190-195, 1975.

FRONZA, T. Estudo exploratório de mecanismos de regulação sanitária de produtos cosméticos de base nanotecnológica no Brasil. **Dissertação de Mestrado**, Porto Alegre, 2006.

FRONZA, T.; GUTERRES, S. S.; POHLMAMM, A. R.; TEIXEIRA, H. **Nanocosméticos: Em direção ao estabelecimento de marcos regulatórios**. 1 ed. Porto Alegre: Gráfica da UFRGS, 2007.

GALDERMA LABORATORIES, L. P. 2003. Disponível em:
http://www.differin.com/AboutDifferin/ProductInsert_Gel.aspx Acesso em 01 dezembro 2008.

GODIN, B.; TOUITOU, E. Transdermal skin delivery: predictions for humans from in vivo, ex vivo and animal models. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, p. 1152–1161, 2007.

GONCHOROSKI, D. D.; CORRÊA, G. M.; Tratamento de hiperpigmentação pós-inflamatória com diferentes formulações clareadoras. **Revista Infarma**, v. 17, n. 3/4, 2005.

GUTERRES, S. S.; FESSI, H.; BARRATT, G.; DEVISSAGUET, J. P.; PUISIEUX. Poly(DL-lactide) nanocapsules containing diclofenac: I. Formulation and stability study. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 113, p. 57-63, 1995.

HABIF, P. T.; CAMPBELL, J. L.; QUITADAMO, M. J.; KATRYN, A. Z.; **Doenças da pele, diagnóstico e tratamento**; Editora Artmed: POA; p. 74-77, 2002.

HABIF, P. T; **Dermatologia clínica**; 4 ed.; Editora Artmed: POA; 2005.

HASBÚN, T.; NAVARRETE, A.; HERRADA, L.; VALENZUELA, A.; BUSTAMANTE, F.; ORLANDI, C. Transtorno depresivo mayor en pacientes con acne. **Piel**, v. 23, p. 52-54, 2008.

HERNANDEZ e MERCIER-FRESNEL. **Manual de Cosmetologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 1999.

HODOSHIMA, N.; UDAGAWA, C.; ANDO, T.; FUKUYASU, H.; WATANABE, H.; NAKABAYASHI, S.; Lipid nanoparticles for delivering antitumor drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, n. 146, p. 81- 92, 1997.

IFSCC – International Federation of the Sciences of Cosmetics. **Monografia nº 2**, The Fundamental of Stability Testing. Micelle Press: Weymouth, 23p., 1997.

IOELE, G.; CIONE, E; RISOLI, A.; GENCHI, G.; RAGNO, G. Accelerated photostability study of tretinoin and isotretinoin in liposome formulations. **International Journal of Pharmaceutics**.v.328, p.251-256, 2005.

JAEGHERE, F.; ALLÉMANN, E.; KUBEL, F.; GALLI B.; COZENS, R.; DOELKER, E.; GURNY, R. Oral bioavailability of a poorly water soluble HIV-1 protease inhibitor incorporated into pH-sensitive particles: effect of the particle size and nutritional state. **Journal of Controlled Release**, v. 68, p. 291-298, 2000.

JAIN, G. K.; AHMED, F. J. Adapalene pretreatment increases follicular penetration of clindamycin: *In vitro* and *in vivo* studies. **Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology**, v. 73, 2007.

JALÓN, E.G., BLANCO-PRÍETO, M.J., YGARTUA, P., SANTOYO, S. Topical application of acyclovir-loaded microparticles: quantification of the drug in porcine skin layers. **Journal of Controlled Release**. 75, p. 191–197, 2001a.

JALÓN, E.G., BLANCO-PRÍETO, M.J., YGARTUA, P., SANTOYO, S. PLGA microparticles: possible vehicles for topical drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, 226, 181–184, 2001b.

JENNING, V.; SCHAFER-KORTING, M.; GOHLA, S.; Vitamin A-loaded solid lipid nanoparticles for topical use: drug release properties. **Journal of Controlled Release**, v. 66, 2000.

KALIA, N. Y.; GUY, R. H. Modeling transdermal drug release. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 48, n. 2-3, p. 159-172, 2001.

KNORST, M. T. Desenvolvimento tecnológico de forma farmacêutica plástica contendo extrato concentrado de *Achyrocline satureioides* (Lom) DC. *Compositae* (Marcela). **Dissertação de Mestrado**, Curso de Farmácia, 1991.

KOROLKOVAS, A. **Dicionário Terapêutico Guanabara**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2002.

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

KREILGAARD, M. Assessment of cutaneous drug delivery using microdialysis. **Advanced drug delivery reviews**, v. 54, p. 99-121, 2002.

KWIECINSKI, J., EICK, S., WÓJCIK, K. Effects of tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil on *Staphylococcus aureus* in biofilms and stationary growth phase. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 33, p. 343 – 347, 2009.

LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H. A.; KANIG, J. L. **Teoria e prática na indústria farmacêutica**. Fundação Calouste Gulbenkian: Lisboa, 2001.

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

LASIC, D. Liposomes: from physics to applications. 1a ed. Amsterdam: **Elsevier Science Publishers B. V.**, cap.3, p.63-90, 1993.

LEONARDI, G. R.; GASPAR, L. R.; CAMPOS, P. M. B. G.; Estudo da variação do pH da pele humana exposta à formulação cosmética acrescida ou não das vitaminas A, E, ou de ceramida, por metodologia não invasiva. **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 77 (5), p. 563-569, 2002.

LEVEQUE, N.; MAKKI, S.; HAFGRAFT, J.; HUMBERT, Ph. Comparidon of Franz cells and midrodialysis for assessing salilylic acid penetration through human skin. **Interantional Journal of Pharmaceutics**, v. 269, n. 2, p. 323-328, 2003.

LIMA, D. R.. **Manual de Farmacologia Clínica Terapêutica e Toxicologia**. v. 1. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2004.

LIU, J.; et al. Isotretinoin-loaded solid lipid nanoparticles with skin targeting for topical delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v.293, p.191- 195, 2006.

LUCERO, M. J.; GARCÍA, J.; VIGO, J.; LÉON, M.J. A rheological study of semisolid preparations of Eudragit®. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 116, p. 31-37, 1995.

LUENGO, J.; WEISS, B.; SCHNEIDER, M.; EHLERS, A.; STRACKE, F.; KÖNING, K.; KOSTRA, K. H.; LEHR, C. M.; SCHAEFER, U. F. Influence of nanoencapsulation on human skin transport of flufenamic acid, **Skin Pharmacology and Physiology**, v.19, p. 190 - 197, 2006.

MAGENHEIM, B.; BENITA, S. Nanoparticle characterization: a comprehensive physicochemical approach. **S.T.P. Pharma Sciences**. v. 1, p. 221-241, 1991;

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

MANCONI, M.; VALENTI, D.; SINICO, C.; LAI, F.; LOY, G.; FADDA, A. M. Niosomes as carriers for tretinoin II. Influence of vesicular incorporation on tretinoin photostability. **International Journal of Pharmaceutics**, v.260, p.261-272, 2003.

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

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

MANFIO, J. L.; DAL'MASO, A., PUGENS, A. M.; JUNIOR, L. B.; STEPPE, M. Determinação do prazo de validade do medicamento carbocisteína xarope através do método de Arrhenius. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 43, n. 4, out./dez., 2007.

MARRIOT, C. in AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. Artmed, ed.2ª, Porto Alegre: 2005.

MARTINEZ, M. A. R., GALLARDO, J. L. V.; BENAVIDES, M. M.; LÓPEZ-DURAN, J. D. G.; LARA, V. G. Rheological behavior of gels and meloxicam release. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 333, p. 17-23, 2007.

MILÃO, D. Desenvolvimento tecnológico e avaliação biológica de formas farmacêuticas plásticas contendo nanocápsulas de diclofenaco. **Dissertação de Mestrado**, Porto Alegre – RS, 2003.

MILLIKAN, L. E.; Adapaleno: actualización de los últimos estudios de comparación de los distintos retinoides. **Farmacología y Terapéutica**; v. 4, n. 1; 2001.

MONACO, J. P. Desenvolvimento de sistemas bio e mucoadesivos de uso intra-bucal: Avaliação in vitro da liberação de nimesulida. **Dissertação de Mestrado**, Ribeirão Preto - SP, 2000.

MORGANTI, P.; RUOCCO, E.; WOLF, R. and RUOCCO, V. Percutaneous absorption and delivery systems. **Clinics in Dermatology**, v.19, p. 489-501, 2001.

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

MÜLLER, C. R.; SCHAFFAZICK, S. R.; POHLMANN, A. R.; FREITAS, L. DE L.; DA SILVEIRA, N. P.; DALLA COSTA, T.; GUTERRES, S. S. Spraydried diclofenac-loaded poly (epsilon-caprolactone) nanocapsules and nanospheres. Preparation and physicochemical characterization. **Pharmazie**. v. 56, p. 864–867, 2001.

MÜNZEL, K.; BUECHI, J.; SCHULTZ, O. E. (Hrsg.) **Galenisches Praktikum**. Stuttgart: Wissenschaftliche, 1959.

NARDONI, S., BERTOLI, A., PINTO, L., MANCIANTI, F., PISSERI, F., PISTELLI, L. *In vitro* effectiveness of tea tree oil against *Trichophyton equinum*. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 20, p. 75 – 79, 2010.

NETZ, P. A.; ORTEGA, G. G.. **Fundamentos de Físico-química**. Porto Alegre: Artmed, 2002.

OLIVEIRA, A.G. Lipossomas: aplicações farmacêuticas e perspectivas futuras. **Caderno Farmacêutico**, v.9, p.71-76, 1993.

OLIVEIRA, A.G., SCARPA, M.V. Lipossomas: aplicações farmacêuticas e cosméticas, novas perspectivas. **Infarma**, v.1, n.3, p.20- 23, 1992.

OLIVEIRA, A.G., SCARPA, M.V., LEITE, C.Q. Lipossomas: Estratégia biotecnológica para liberação controlada de fármacos com efeito antimicrobacteriano. **Revista das Ciências Farmacêuticas**, v.18, n.1, p.109-121, 1997.

OLUTUNMBI, Y.; PALEY, K.; ENGLISH, J.C. Adolescent Female Acne: Etiology and Management. **American Society for Pediatric and Adolescent Gynecology**, v. 21, p. 171-176, 2008.

OURIQUE, A. F.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S.; BECKED, R. C. R.; Tretinoin-loaded nanocapsules: Preparation, physicochemical characterization, and photostability study. **International Journal of Pharmaceutics**, v.352, p.1-4, 2008.

PAESE, K. Desenvolvimento tecnológico, estudo de fotoestabilidade e avaliação da permeação cutânea in vitro da benzofenona-3 a partir de nanocápsulas poliméricas incorporadas em diferentes veículos semi-sólidos. **Dissertação de mestrado**. UFRGS, Curso de Pós Graduação, 2008.

PELLET, M. A.; ROBERTS, M. S.; HADGRAFT, J. Supersaturated solutions evaluated with an in vitro stratum corneum tape stripping technique. **International Journal of Pharmaceutics** v. 151, p. 91-98, 1997.

PERSHING, L.K.; CORLETT, J.; JORGENSEN, C. In vivo Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Topical Ketoconazole and Miconazole in Human Stratum Corneum. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 38, n. 1, p.90-95, 1993.

PISKIN, S. & UZUNALI, E.; A review of the use of adapalene for the treatment of acne vulgaris. **Therapeutics and Clinical Risk Management**, v. 3(4), 2007.

POLETTO, F. S.; JÄGER, E.; CRUZ, L.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. The effect of polymeric wall on the permeability of drug-loaded nanocapsules. **Materials Science and Engineering**, v. 28, p. 472-78, 2008.

RAWLINGS, A. V.; MATTS, P. J.; ANDERSON, C. D.; ROBERTS, M. S.; Skin biology, xerosis, barrier repair and measurement. **Drug Discovery Today: Disease Mechanisms**, n. 261, 2008.

REICHLING, J.; LANDVATTER, U.; WAGNER, H.; KOSTKA, K. ; SCHAEFER, U. In vitro studies on release and human skin permeation of Australian tea tree oil (TTO) from topical formulations. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 64, p. 222-228, 2006.

RHEIN, L.D.; PEOPLES, C.; WOLF, B. Skin, hair, and nail structure and function. In: SCHLOSSMAN, M.L. **The chemistry and manufacture of cosmetics**. 3.ed. Carol Stream: Allured publishing corporation, v.1, p. 87-136, 2000.

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

ROGGIA, I. Avaliação da estabilidade, liberação e permeação cutânea de nanocápsulas contendo benzofenona-3. **Dissertação de mestrado**, Santa Maria-RS, 2009.

ROSSO, J. Q. D.; Dispelling the Myths About Using Retinoids. **Skin & Aging**. v. 12, 2004. Disponível em: <http://www.skinandaging.com/article/2921>. Acesso em 1º julho 2008.

SAMPAIO, S. A. P.; RIVITTI, E. A. **Dermatologia**. São Paulo: Artes Médicas, ed. 2, 2000.

SARVEIYA, V.; RISK, S.; BENSON, H. A. E. Liquid chromatographic assay for common sunscreen agents: application to in vivo assessment of skin penetration and systemic absorption in human volunteers. **Journal of Chromatography B**, v. 803, p. 225-231, 2004.

SASSON, C. S. Influência dos veículos cosméticos na permeação cutânea de associação de filtros solares e acetato de tocoferol. **Dissertação de mestrado**. UFPR, Faculdade de Farmácia. Curso de Pós Graduação, 2006.

SCHAFFAZICK, S. R.; POHLMANN, A. R.; FREITAS, L. L.; GUTERRES, S. S. Caracterização e estabilidade de suspensões de nanocápsulas e de nanoesferas poliméricas contendo diclofenaco. **Acta Farmacêutica Bonaerense**, v. 21, p. 99-106, 2002.

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

SEYED, T. A.; QURESHI, Z. A.; AHMED, S. M.; AHMED, S. A. Treatment of toenail onychomycosis with 2% butenafine and 5% Melaleuca alternifolia (tea tree) oil in cream. **Tropical Medicine & International Health**, v. 4, p. 284-287, 1999.

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

SHAMBAN, A. T.; NARURKAR, V. A. Multimodal Treatment of Acne, Acne Scars and Pigmentation. **Dermatological Clinical**, v. 27, p. 459-471, 2009.

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

SIMÕES, R. P. ; GROppo, F. C. ; SARTORATO, A. ; FIOL, F. ; MATTOS FILHO, T. ; RAMACCIATO, J. ; RODRIGUES, M. Efeito do óleo de melaleuca alternifolia sobre a infecção estafilocócica. **Revista Lecta Bragança Paulista**, v. 20, n. 2, p. 143-152, 2002.

SINICO, C. et al. Liposomes as carriers for dermal delivery of tretinoin: in vitro evaluation of drug permeation and vesicle-skin interaction. **Journal of Controlled Release**, v.103, p.123-136, 2005.

TOUITOU, E.; MEIDAN, V. M.; and HORWITZ, E. Methods for quantitative determination of drug localized in the skin. **Journal of Controlled Release** v. 56, p. 7-21, 1998.

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

VENTER, J. P.; MÜLLER, D. G.; PLESSIS, J.; GOOSEN, C. A comparative study of in situ adapted diffusion cell and in vitro Franz diffusion cell method for transdermal absorption of doxylamine. **European Journal of Pharmaceuticals Sciences**, v.13, p.169-177, 2001.

VERMA, D. D.; VERMA, S.; BLUME, G.; FAHR, A. Particle size of liposomes influences dermal delivery of substances into skin. **International Journal of Pharmaceutics** v. 258, (1-2), p. 141-151, 2003.

VIEIRA, T. R.; BARBOSA, L. C.; MALTHA, C. R.; PAULA, V. F.; NASCIMENTO, E. A. Constituintes químicos de *Melaleuca alternifolia* (*Myrtaceae*). **Química Nova**, v. 27, n. 4, 2004.

VLACHOU, C.; LICHYSHYN, A.; Prescribing in acne. **Management and prescribing**, v.73. n.6, 2006.

WEISS-ANGELI, V.; POLETTTO, F. S.; BALDASSO, F.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Nanocapsules of octyl methoxycinnamate containing quercetin delayed the photodegradation of both components under ultraviolet A radiation. **Journal of Biomedical Nanotechnology**. v. 4, p.80-89, 2008.

WISSING, S. A.; MÜLLER, R. H.; The influence of solid lipid nanoparticles on skin hydration and viscoelasticity – in vivo study. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 56, p. 67- 72, 2003.

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](#)