

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Hidrogéis contendo tretinoína associada a nanocápsulas de núcleo lipídico: influência da secagem das suspensões nas propriedades físico-químicas e biofarmacêuticas

CARINE ZUGLIANELLO

PORTO ALEGRE, 2015.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Hidrogéis contendo tretinoína associada a nanocápsulas de núcleo lipídico: influência da secagem das suspensões nas propriedades físico-químicas e biofarmacêuticas

Dissertação apresentada por Carine Zuglianello para a obtenção do GRAU DE MESTRE em Ciências Farmacêuticas.

CARINE ZUGLIANELLO

Orientador: Ruy Carlos Ruver Beck

Porto Alegre, 2015.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 27.03.2015, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof^a. Dr. Irene Clemes Kulkamp Guerreiro

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof^a. Dr. Letícia Cruz

Universidade Federal de Santa Maria

Prof^a. Dr. Silvia Stanisquaski Guterres

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Zuglianello, Carine

Hidrogéis contendo tretinoína associada a nanocápsulas de núcleo lipídico: influência da secagem das suspensões nas propriedades físico-químicas e biofarmacêuticas / Carine Zuglianello. -- 2015.

97 f.

Orientador: Ruy Carlos Ruver Beck.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2015.

1. Hidrogéis contendo nanocápsulas de núcleo lipídico. 2. Produtos intermediários. 3. Liberação. 4. Penetração e permeação cutânea. 5. Tretinoína. I. Beck, Ruy Carlos Ruver, orient. II. Título.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório n° 405 da Faculdade de Farmácia da UFRGS, na cidade de Porto Alegre, com financiamento da CAPES, do CNPq e da FAPERGS. A autora recebeu bolsa de estudos do CNPq.

Resumo

Este estudo tem como objetivo central avaliar a influência da secagem por aspersão de nanocápsulas de núcleo lipídico contendo tretinoína nos perfis in vitro de liberação e de penetração cutânea deste fármaco a partir de hidrogéis. Esses experimentos foram conduzidos empregando-se células de difusão de Franz, pele de abdome de porcos (fêmeas), regime de aplicação de doses infinitas e meio receptor composto por tampão fosfato pH 7,4 e etanol (70:30). A secagem por aspersão das suspensões de nanocápsulas, utilizando PVP e lactose (1:1, m/m) a 10% como adjuvantes, forneceu produtos com bons perfis de dispersão em água, bons rendimentos (próximos a 70%), baixos teores de substâncias voláteis, e teores do fármaco acima de 92%. O tipo de produto intermediário, suspensão aquosa ou respectivo pó, utilizado na produção de hidrogéis (G-LNC-TTN e G-LNC-TTN-SD, respectivamente) não influenciou no perfil de liberação in vitro da tretinoína, que se ajustou ao modelo de Higuchi. No estrato córneo houve diferenças nas quantidades de tretinoína penetradas a partir das duas formulações. O G-LNC-TTN levou a uma retenção exponencial do fármaco nessa camada, enquanto para o G-LNC-TTN-SD isso não ocorreu. Essa diferença foi associada à forma de organização das nanocápsulas na matriz do gel. Na epiderme e na derme, ambas as formulações permitiram a chegada de pequenas e constantes quantidades de tretinoína. No compartimento receptor da célula de Franz o fármaco não foi detectado. A pequena permeação da tretinoína para as camadas mais profundas da pele e para o meio receptor são indicativos de baixa absorção sistêmica, e também podem contribuir para a diminuição dos efeitos adversos associados à terapia tópica com essa substância. A secagem das suspensões de nanocápsulas de núcleo lipídico, nas condições utilizadas, forneceu um intermediário em potencial para a produção de formas farmacêuticas semissólidas contendo tretinoína.

Palavras-chave: tretinoína, produtos intermediários, hidrogéis contendo nanocápsulas de núcleo lipídico, liberação, penetração/permeação cutânea.

Abstract

This study's central goal is to assess the influence of spray-drying lipid core nanocapsules on tretinoin *in vitro* release profiles as well as skin penetration/permeation from hydrogels. These experiments were conducted employing Franz diffusion cells, pig abdominal skin (female), infinite doses regimen and receptor medium composed of phosphate buffer pH 7.4 and ethanol (70:30). Spray-drying of the nanocapsules suspensions, using PVP and lactose (1:1, m/m) at 10% (m/v) as drying adjuvant provided powders with good water dispersion profiles, good yields (around 70%), low volatile substances contents, in addition to drug contents above 92%. Interchanging intermediate products, aqueous suspension or respective powder, used in hydrogel formulation (G-LNC-TTN and G-LNC-TTN-SD, respectively) caused no influence on tretinoin *in vitro* release profile which was adjusted by Higuchi model. In corneum stratum there were differences in tretinoin quantities which penetrated from those formulations. The G-LNC-TTN provided an exponential retention of the drug on this skin's layer, although G-LNC-TTN-SD did not. This difference was associated with the nanocapsules organization form in hydrogel matrix. In epidermis and dermis both formulations allowed permeation of constant and low tretinoin quantities. Moreover, at receptor fluid the drug was not detected. The low tretinoin permeation for deeper skin layers and for receptor fluid is low systemic absorption indicative, furthermore, may contribute in reducing adverse effects associated with tretinoin topical therapy. In given conditions, spray-drying of lipid core nanocapsules provided a potential intermediate for production of semi solids pharmaceutical forms containing tretinoin.

Key-words: tretinoin, intermediate products, hydrogels containing lipid core nanopasules, release, cutaneous penetration/permeation.

Lista de Figuras

Figura 1 - Estrutura molecular do ácido trans-retinóico.....	32
Figura 2 - Distribuição de tamanho por volume das partículas da amostra LNC-TTN, avaliada por difração de laser.	57
Figura 3 - Distribuição de tamanho das partículas da amostra LNC-TTN por intensidade, obtida por espalhamento de luz dinâmico.	58
Figura 4 - Distribuição de tamanho das partículas da amostra LNC-TTN por volume, obtida por espalhamento de luz dinâmico.	58
Figura 5 - Imagens obtidas por MET das formulações LNC-TTN e LNC-Br.....	59
Figura 6 - Perfil de distribuição de tamanho das partículas por volume, avaliado por difração de laser das formulações LNC-TTN-SD-lac.....	61
Figura 7 - Perfil de distribuição de tamanho das partículas dos pós LNC-TTN-SD e LNC-Br-SD, avaliados por difração de laser	62
Figura 8 - Perfil de distribuição de tamanho das partículas do pó LNC-TTN-SD, por número, obtido por difração de laser.....	63
Figura 9 - Imagens de MEV da LNC-TTN-SD.....	64
Figura 10 - Comportamento reológico das formulações semissólidas desenvolvidas..	66
Figura 11 - Perfil de distribuição de tamanho das partículas por volume do G-LNC-TTN, obtido por difração de laser.	68
Figura 12 - Perfil de distribuição de tamanho das partículas por volume do G-LNC-TTN-SD, obtido por difração de laser.....	69
Figura 13 - Imagens de MET do G-LNC-TTN e do G-LNC-Br.....	70
Figura 14 - Imagens de MET do G-LNC-TTN-SD e do G-LNC-Br-SD.....	70
Figura 15 - Comportamento reológico das formulações semissólidas comerciais.	72
Figura 16 - Perfis de viscosidade das formulações semissólidas.	72
Figura 17 - Perfis de liberação in vitro da tretinoína.....	73
Figura 18 - Perfis de penetração da tretinoína no estrato córneo.	75
Figura 19 - Perfis de penetração da tretinoína na epiderme	76
Figura 20 - Perfis de penetração da tretinoína na derme	76

Lista de abreviaturas e siglas

EE – Eficiência de encapsulação

G-Br – Gel branco (base)

G-LNC – Gel contendo nanocápsulas de núcleo lipídico

G-LNC-Br – Gel contendo nanocápsulas de núcleo lipídico brancas

G-LNC-Br-SD – Gel contendo nanocápsulas de núcleo lipídico submetidas ao processo de secagem por aspersão, utilizando PVP:lac como adjuvantes

G-LNC-TTN – Gel contendo nanocápsulas de núcleo lipídico de tretinoína

G-LNC-TTN-SD – Gel contendo nanocápsulas de núcleo lipídico de tretinoína submetidas ao processo de secagem por aspersão, utilizando PVP:lac como adjuvantes

IPd – Índice de polidispersão

lac – Lactose

LNC-Br – Nanocápsulas de núcleo lipídico brancas

LNC-Br-SD – Nanocápsulas de núcleo lipídico brancas submetidas ao processo de secagem por aspersão, utilizando PVP:lac como adjuvantes

LNC-TTN – Nanocápsulas de núcleo lipídico de tretinoína

LNC-TTN-SD – Nanocápsulas de núcleo lipídico de tretinoína submetidas ao processo de secagem por aspersão, utilizando PVP:lac como adjuvantes

LNC-TTN-SD-lac – Nanocápsulas de núcleo lipídico de tretinoína, submetidas ao processo de secagem por aspersão, utilizando lactose como adjuvante

MET – Microscopia Eletrônica de Transmissão

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

PD – Perda por dessecação

PVP – Polivinilpirrolidona

PZ – Potencial zeta

UVA – Radiação ultravioleta do tipo A

UVC – Radiação ultravioleta do tipo C

Sumário

1	INTRODUÇÃO.....	17
2	OBJETIVOS.....	21
2.1	Objetivo geral.....	21
2.2	Objetivos específicos.....	21
3	REVISÃO DO TEMA.....	22
3.1	A pele e a administração cutânea de fármacos.....	23
3.2	Avaliação da penetração cutânea <i>in vitro</i>	25
3.3	Nanopartículas como sistemas de entrega e liberação cutânea.....	27
3.4	Secagem de nanopartículas por aspensão.....	30
3.5	Tretinoína.....	32
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
4.1	Materiais.....	39
4.1.1	Matérias-primas.....	39
4.1.2	Solventes e outros materiais.....	39
4.1.3	Aparelhos e Equipamentos.....	40
4.2	Métodos.....	41
4.2.1	Produção e caracterização físico-química das suspensões de nanocápsulas de núcleo lipídico.....	41
4.2.1.1	Diâmetro das partículas e polidispersão.....	42
4.2.1.2	Morfologia.....	43
4.2.1.3	Potencial zeta.....	43
4.2.1.4	Teor e eficiência de encapsulação.....	43
4.2.1.5	pH.....	44
4.2.2	Produção e caracterização físico-química dos pós.....	44
4.2.2.1	Diâmetro das partículas após redispersão em água.....	45
4.2.2.2	Teor.....	45
4.2.2.3	Morfologia e diâmetro das partículas.....	45

4.2.2.4 Perda por dessecação	46
4.2.3 Produção e caracterização dos hidrogéis	46
4.2.3.1 Diâmetro das partículas	46
4.2.3.2 Teor.....	47
4.2.3.3 Comportamento reológico	47
4.2.3.4 Morfologia	48
4.2.4 Liberação <i>in vitro</i> da tretinoína a partir das formulações semissólidas	48
4.2.5 Estudo da penetração cutânea da tretinoína	51
4.2.5.1 Preparação das membranas.....	51
4.2.5.2 Condições experimentais	52
4.2.5.3 Retenção no estrato córneo (Técnica de <i>tape stripping</i>)	52
4.2.5.4 Retenção na epiderme e na derme (técnica de separação por calor)	53
4.2.5.5 Extração e quantificação da tretinoína nas camadas da pele	53
4.2.6 Análise estatística dos resultados	53
4.2.7 Descarte de resíduos	54
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
5.1 Caracterização das formulações	55
5.1.1 Caracterização das suspensões de nanocápsulas	55
5.1.2 Caracterização dos pós	60
5.1.3 Caracterização dos produtos semissólidos	65
5.2 Estudos de liberação <i>in vitro</i>	73
5.3 Estudos de penetração/permeação cutânea.....	75
6 CONCLUSÕES	81
7 REFERÊNCIAS	83
APÊNDICE A - Métodos analíticos empregados para extração e quantificação da tretinoína	92
ANEXO A - Composição dos produtos comerciais utilizados	97

1 INTRODUÇÃO

A nanotecnologia, caracterizada pela manipulação da matéria em escala próxima da atômica ou molecular para a produção de novos materiais (MAYNARD et al., 2006), engloba várias tecnologias emergentes, das quais são esperadas soluções técnicas em vários campos de aplicação, produtos bem sucedidos economicamente e melhorias para a qualidade de vida. Apesar de muitos produtos nanotecnológicos já estarem disponíveis no mercado, há ainda muita pesquisa básica sendo realizada nesse campo. Nas Ciências da Saúde, as aplicações de nanotecnologias incluem biotecnologia, diagnóstico, dispositivos médicos, liberação de fármacos, terapia gênica e engenharia de tecidos, entre outras (VIJAYA SHANTI, 2011).

Na área farmacêutica, nanopartículas poliméricas tem se destacado como carreadores de fármacos, principalmente quando constituídas por materiais biocompatíveis e biodegradáveis (BATHEJA et al., 2011). Essas nanopartículas são definidas como partículas sólidas coloidais, que incluem nanocápsulas e nanoesferas (MORA-HUERTAS et al., 2010), e apresentam movimento Browniano. As nanocápsulas são estruturas vesiculares compostas por um núcleo oleoso, envolto por uma parede polimérica e estabilizadas por um sistema tensoativo (POHLMANN et al., 2013). Nanocápsulas com propriedades mecânicas diferenciadas, denominadas nanocápsulas de núcleo lipídico, são obtidas com acréscimo de monoestearato de sorbitano na composição de seu núcleo (VENTURINI et al., 2011).

No que diz respeito à administração cutânea de substâncias, para fins cosméticos ou tratamento de doenças locais, diversos estudos vem mostrando diferenças marcantes no desempenho de formulações convencionais e formulações contendo a substância ativa nanoencapsulada (CONTRI et al., 2014a; FONTANA et al., 2011; SIQUEIRA et al., 2011). Além de influenciar no comportamento de penetração/permeação cutânea, os nanocarreadores são capazes de proteger a substância frente à degradação química prematura e melhorar sua solubilidade aparente (OURIQUE et al., 2011). Suspensões de nanocápsulas podem ser utilizadas diretamente na pele ou incorporadas em formulações semissólidas, como géis e cremes (CONTRI et al., 2011).

Um fator crítico para o emprego industrial das formulações de nanopartículas poliméricas é a instabilidade físico-química das suspensões aquosas em tempos prolongados de armazenamento. Nesse sentido, o método de secagem por aspersão é uma alternativa rápida e de baixo custo para a conversão das suspensões aquosas em pós (BECK, et al., 2006; HOFFMEISTER et al., 2012; TEWA-TAGNE et al., 2007a). A utilização de excipientes hidrossolúveis como suporte de secagem pode permitir não só a preservação da estrutura das partículas, mas também a recuperação do seu diâmetro nanométrico original após a dispersão do pó em meio aquoso (HOFFMEISTER et al., 2012; TEWA-TAGNE et al., 2007).

Ourique e colaboradores (2011) propuseram a incorporação de suspensões de nanocápsulas de núcleo lipídico contendo tretinoína em hidrogéis. Essas formulações semissólidas apresentaram aumento da fotoestabilidade frente à radiação UVA em comparação com a suspensão de nanocápsulas e em comparação com um hidrogel comercial contendo o fármaco livre. Além disso, em um experimento *in vitro* utilizando células de Franz e pele de abdome humana como membrana, os autores demonstraram um controle da permeabilidade da tretinoína através do estrato córneo em comparação com um hidrogel contendo o fármaco livre.

Marchiori e colaboradores (2012) realizaram a secagem por aspersão da suspensão de nanocápsulas de núcleo lipídico contendo tretinoína, utilizando lactose como adjuvante. Os resultados demonstraram que o produto seco obtido, quando redisperso em água, mantinha as mesmas características de proteção contra a radiação UVA apresentadas pela suspensão aquosa. A incorporação do pó contendo nanocápsulas em hidrogel (MARCHIORI et al., 2013) levou à obtenção de um produto com características adequadas para o uso dermatológico (pH, espalhabilidade e características reológicas). Quando expostos à radiação UVA, os hidrogéis produzidos com a suspensão de nanocápsulas ou com seu respectivo pó apresentaram as mesmas características de proteção contra fotodegradação, com tempos de meia vida superiores ao da suspensão aquosa e de um gel comercial contendo a tretinoína livre.

Considerando as vantagens da conversão das suspensões aquosas de nanocápsulas em pós para seu manejo industrial como produto intermediário e o sucesso no desenvolvimento e manutenção de características de aumento da

fotoestabilidade da tretinoína em hidrogéis contendo suspensões de nanocápsulas desidratadas, nesse trabalho propõe-se avaliar a influência do tipo de produto intermediário utilizado na produção do hidrogel (suspensão ou o respectivo pó) no perfil *in vitro* de penetração/permeação cutânea da tretinoína, empregando pele suína.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Estudar a influência da secagem por aspersão de nanocápsulas de núcleo lipídico contendo tretinoína nos perfis *in vitro* de liberação e de penetração cutânea deste fármaco a partir de hidrogéis, empregando pele suína e células de difusão de Franz.

2.2 Objetivos específicos

- Produzir suspensões de nanocápsulas de núcleo lipídico contendo tretinoína, avaliando suas características físico-químicas;
- Produzir pós a partir das suspensões de nanocápsulas de núcleo lipídico contendo tretinoína (produtos intermediários) empregando a técnica de secagem por aspersão, que possibilitem a redispersão das nanoestruturas quando em contato com a água, avaliando as suas características físico-químicas;
- Produzir hidrogéis contendo nanocápsulas de núcleo lipídico, tanto a partir das suspensões quanto a partir dos pós obtidos pela secagem por aspersão das suspensões, avaliando suas características físico-químicas;
- Avaliar os perfis de liberação e penetração cutânea *in vitro* da tretinoína a partir das formulações contendo nanocápsulas de núcleo lipídico, submetidas ou não ao processo de secagem;
- Avaliar os perfis de liberação e penetração cutânea *in vitro* da tretinoína a partir dos produtos comerciais nas formas de gel e creme, para fins de comparação aos resultados dos produtos desenvolvidos neste trabalho.

3 REVISÃO DO TEMA

3.1 A pele e a administração cutânea de fármacos

A pele é o maior órgão do corpo humano e constitui a interface entre o organismo e o meio externo. Além de proteger o organismo contra danos químicos, físicos, microbiológicos, perda de água e de outras substâncias endógenas, a pele está envolvida na regulação da temperatura corporal, possui função sensorial e atua como um órgão excretor. Essa natureza multifuncional é possibilitada por sua estrutura altamente diferenciada, constituída por quatro camadas: estrato córneo (epiderme não viável), epiderme viável, derme e tecidos subcutâneos, além de possuir apêndices como folículos pilosos e unhas (camada rígida de queratina, nos dedos dos pés e das mãos), glândulas sudoríparas e glândulas sebáceas (MURTHY, 2011 e VOLPATO et al., 2009).

O principal obstáculo para a penetração/permeação de substâncias na pele é constituído pela camada mais superficial da epiderme, o estrato córneo. Sua estrutura é conhecida como “parede de tijolos” e é composta por células ricas em queratina, denominadas corneócitos, embebidas em matriz lipídica (SELZER et al., 2013). Além disso, para moléculas extremamente hidrofóbicas, outro fator que regula a penetração é a capacidade reduzida de se difundir através das camadas mais hidrofílicas subsequentes da pele (TOUITOU et al., 1988).

A epiderme viável é uma camada avascular, nutrida pela derme, onde as substâncias que passam através do estrato córneo podem ser metabolizadas. É também onde estão localizadas as células de Langherans, que são sistemas de defesa contra corpos estranhos (ROSEN et al., 2005).

Na derme estão localizados os vasos sanguíneos e linfáticos e os nervos sensoriais da pele. Quando uma substância atinge a derme, a microcirculação cutânea promove uma condição *sink* infinita, que faz com que a concentração da molécula atinja um equilíbrio entre a pele e a corrente sanguínea em um curto período de tempo (MURTHY, 2011).

O fluxo de uma substância através da pele pode ser calculado pela lei de difusão de Fick, e é expresso em $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ (ROSEN et al., 2005). Absorção percutânea é o termo geral usado para descrever a passagem de substâncias da superfície mais externa da pele para a circulação sistêmica, e é dividida em:

- *Penetração*: entrada de uma substância em uma camada da pele, por exemplo, estrato córneo;
- *Permeação*: passagem de uma substância através de uma camada da pele para outra camada estruturalmente diferente;
- *Ressorção*: passagem de uma substância da pele para vasos sanguíneos ou linfáticos, que resulta na absorção sistêmica (CONTRI et al., 2011; WHO, 2006).

No campo das Ciências Farmacêuticas, a administração cutânea de fármacos vem ganhando grande interesse, buscando tanto a liberação local quanto a sistêmica (MURTHY, 2011). Formas farmacêuticas semissólidas, como cremes, pomadas ou géis, tem sido amplamente utilizadas para o tratamento de doenças locais, tendo como vantagens a aplicação direta no local de ação e a baixa permeação cutânea, caracterizada por baixíssimas concentrações de fármacos na corrente sanguínea (GUTERRES et al., 2007). Para o tratamento de doenças sistêmicas podem ser utilizados sistemas transdérmicos, que garantem maior permeação, cujo uso pode ser uma alternativa para evitar o metabolismo hepático de primeira passagem e a ocorrência de irritação gástrica (GUTERRES et al., 2007 e MURTHY, 2011).

Existem três principais rotas de penetração/permeação que tornam possível a veiculação de substâncias ativas para diferentes alvos após a administração cutânea: *intercelular*, *transcelular* e *transanexial* (SHAEFER et al., 2008). A rota intercelular, através dos lipídios intercelulares, é mais utilizada que a rota transcelular, sendo preferida por moléculas lipofílicas. Por outro lado, as substâncias hidrofílicas penetram na pele preferencialmente pela rota transcelular, através dos corneócitos. O coeficiente de difusão nos lipídios do estrato córneo, a capacidade de adsorção na queratina dos corneócitos e o coeficiente de partição entre a formulação e o estrato córneo controlam a penetração/permeação dos fármacos na pele (BOLZINGER et al., 2012). Apesar dos apêndices cutâneos ocuparem apenas 0,1% da superfície da pele, a rota transanexial

também contribui para penetração/permeação de substâncias na pele, e pode ser utilizada para uma liberação dirigida, devido à profundidade que os apêndices atingem. Dependendo da região anatômica, o percentual de distribuição dos folículos na superfície da pele pode variar entre 0,09% e 1,28% (SCHNEIDER et al., 2009). Sistemas nanoparticulados possuem uma grande afinidade pelos folículos pilosos, que podem atuar como depósitos, e desempenham um importante papel na penetração/permeação das substâncias nanoencapsuladas (CONTRI et al., 2011).

O conhecimento do comportamento de absorção de um fármaco é importante para o desenvolvimento de formulações tópicas e transdérmicas, e também para avaliações toxicológicas (FÖRSTER et al., 2009). O grau de penetração cutânea não depende somente das características físico-químicas da molécula (ex.: tamanho, solubilidade e coeficiente de partição), mas também de fatores relacionados à pele, ao veículo, e à interação entre ambos. Entre os fatores relacionados à pele encontram-se a região anatômica, a hidratação, a presença de doenças, o metabolismo cutâneo, a descamação, a irritação/sensibilização cutânea, a temperatura e o fluxo sanguíneo. Os fatores relacionados ao veículo podem incluir, entre outros, a solubilidade e a concentração do fármaco na formulação, a composição óleo/água, o pH, o tamanho das partículas e a presença de promotores de absorção (ROSEN et al., 2005). O maior desafio na liberação tópica ou transdérmica consiste em adequar o veículo para que a substância atinja o alvo desejado. Sistemas de liberação, como, por exemplo, lipossomas, vesículas elásticas, micro e nanopartículas, atuam modificando a interação da substância ativa e a formulação e/ou a pele (FÖRSTER, et al., 2009).

3.2 Avaliação da penetração cutânea *in vitro*

Por razões éticas, os estudos preliminares de absorção cutânea não são realizados em modelos *in vivo*. Uma alternativa para a obtenção das informações desejadas é a utilização de modelos *in vitro*. Alguns documentos fornecem informações básicas sobre esses modelos, como a *Guideline 428* em combinação com o *Guidance 28* da *Organization for Economic Cooperation and Development* (OECD), o *Guideline* do *Scientific Committee on Cosmetic and Non-Food Products Intended for*

Consumers (SCCNFP), o guia da Comissão Europeia e o *Guideline* do *Food and Drug Administration* (FDA), dos Estados Unidos (SCHAEFER et al., 2008).

Os estudos de permeação *in vitro* são frequentemente realizados utilizando células de difusão de Franz. Essas células possuem um compartimento doador superior, que é separado de um compartimento receptor inferior por uma membrana de pele excisada. O compartimento inferior é preenchido com meio receptor, que permanece em agitação magnética e temperatura controlada durante o estudo (OECD, 2011). As coletas e reposições do meio receptor são realizadas através de um braço vertical das células de Franz (SELZER et al., 2013). Ao final do estudo as células são desmontadas, e técnicas como *tape stripping* e separação por calor são usadas para efetuar a separação das camadas da pele, para posterior quantificação da substância em cada uma delas (OECD, 2011). Métodos ópticos como microscopia confocal e espectroscopia Raman também podem ser utilizados para a obtenção de perfis de penetração semi quantitativos (SELZER et al., 2013; WHO, 2006).

O uso da pele humana como membrana deve ser priorizado, quando possível, porém a pele de porco tem se mostrado uma boa alternativa e é comumente utilizada pela indústria cosmética e farmacêutica em estudos *in vitro* desta natureza (WHO, 2006). O regime de doses é outra variação a ser destacada, pois esses experimentos podem ser realizados com aplicação de dose infinita ou finita de substâncias sobre a membrana (OECD, 2011). No caso de doses infinitas, a quantidade de substância aplicada é grande o suficiente para que durante todo o tempo de experimento o fluxo de difusão permaneça em estado estacionário, permitindo um cálculo correto da constante de permeabilidade, ao impedir que a evaporação da substância ou a penetração/permeação já ocorrida cause um decaimento repentino do fluxo de difusão (DE ANDRADE et al., 2015; MELERO et al., 2014). No caso de doses finitas, procura-se mimetizar situações reais de aplicação, não devendo haver a oclusão do compartimento doador (OECD, 2011; SELZER et al., 2013; WHO, 2006).

3.3 Nanopartículas como sistemas de entrega e liberação cutânea

Entre os objetivos da utilização de nanopartículas em formulações para administração cutânea, encontram-se a liberação controlada de substâncias para a pele e seus apêndices (DE ANDRADE et al., 2015; SHAMMA et al., 2014), a penetração transdérmica (MITTAL et al., 2015; MURA et al., 2014), a retenção nas camadas superficiais da pele (OURIQUE et al., 2011; SIQUEIRA et al., 2010), a proteção contra degradação química prematura (OKONOGI et al., 2015; OURIQUE et al., 2011) e a diminuição da irritação cutânea (AGRAWAL, 2015; CONTRI et al., 2014a).

Nanopartículas inorgânicas, utilizadas em fotoprotetores, e nanopartículas orgânicas, utilizadas como carreadores de fármacos, podem apresentar diferenças no comportamento de penetração/permeação cutânea (BOLZINGER et al., 2011). Estudos realizados sugerem que as primeiras são capazes de penetrar no estrato córneo, mas não são capazes de atravessá-lo (TAN et al., 1996; SCHULZ et al., 2002 e MIQUEL-JEANJEAN et al., 2012), enquanto as segundas, dependendo de sua flexibilidade e tamanho, podem ou não penetrar intactas no estrato córneo, e permitir a liberação/permeação do fármaco associado para as camadas mais profundas da pele (ALVAREZ-ROMAN et al., 2004; DE BRUM et al., 2015 e YU et al., 2015). A carga superficial das partículas e os excipientes presentes na formulação também podem influenciar seu comportamento de penetração/permeação cutânea (BOLZINGER et al., 2011).

A rota transanexial, especialmente através dos folículos pilosos, exerce um papel importante na penetração/permeação das nanopartículas. Os folículos pilosos podem atuar como um depósito para as nanopartículas, o que não é considerado em si como absorção. Porém, como o *clearance* nessa região é mais lento do que, por exemplo, no estrato córneo, as nanopartículas ficam, até certo ponto, protegidas de processos como descamação, contato com tecidos e remoção por lavagem, podendo liberar as substâncias ativas associadas aos carreadores para as camadas viáveis da pele ou para a circulação sanguínea durante um tempo mais prolongado (ALVAREZ-ROMAN et al., 2004; GŁOWKA et al., 2014; SCHNEIDER et al., 2009). Tais depósitos podem ser formados pela agregação das nanopartículas em regiões mais

profundas ou mais superficiais dos folículos (DESAI et al., 2010; GŁOWKA et al., 2014).

Apesar dos aspectos discutidos previamente, a aplicabilidade clínica dos lipossomas e de carreadores lipídicos coloidais (nanopartículas lipídicas sólidas e carreadores lipídicos nanoestruturados) é limitada devido à baixa estabilidade físico-química desses sistemas, ao não esclarecimento do mecanismo de penetração cutânea dos lipossomas na pele intacta e à baixa capacidade de carga de fármacos nos carreadores lipídicos coloidais (BATHEJA et al., 2011).

Entretanto, nos últimos anos os sistemas nanoestruturados à base de polímeros vem ganhando atenção, principalmente aqueles baseados em materiais que possuem características intrínsecas de biocompatibilidade e biodegradabilidade, para aplicação cutânea. Neste cenário, as nanopartículas poliméricas tem se mostrado promissoras (BATHEJA et al., 2011), destacando-se as nanocápsulas, que são estruturas vesiculares, compostas por um núcleo envolto por uma parede polimérica, estabilizada por um sistema tensoativo. Essas estruturas apresentam diâmetro submicrométrico e movimento browniano (POHLMANN et al., 2013). Além das nanocápsulas convencionais de núcleo oleoso, Venturini e colaboradores (2011) relataram recentemente a produção de nanocápsulas de núcleo lipídico, que possuem propriedades mecânicas diferenciadas conferidas pela dispersão de um lipídeo sólido (monoesterato de sorbitano) em um óleo, que compõe seu núcleo.

De Brum e colaboradores (2015) realizaram estudo comparativo de penetração cutânea *in vitro* de nanocápsulas poliméricas e nanocápsulas poliméricas de núcleo lipídico, marcadas com rodamina. Os resultados obtidos por microscopia confocal demonstraram que as nanocápsulas poliméricas penetram mais profundamente na pele, atingindo a derme, enquanto que as nanocápsulas de núcleo lipídico permanecem nas camadas mais superficiais, atuando como um reservatório na epiderme. Esse resultado foi relacionado à diferença de flexibilidade existente entre os dois tipos de nanocápsulas, a partir de estudos empregando microscopia de força atômica. A menor flexibilidade das nanocápsulas de núcleo lipídico foi conferida pela presença do monoestearato de sorbitano em seu núcleo.

As suspensões de nanocápsulas poliméricas podem ser aplicadas diretamente à pele ou veiculadas em formulações semissólidas como cremes e géis (CONTRI et al., 2011). Devido à maior facilidade de aplicação na pele, as formulações semissólidas são geralmente preferidas às suspensões. Os hidrogéis tem sido frequentemente utilizados para a veiculação de nanocápsulas e para a avaliação do comportamento de penetração/permeação cutânea das substâncias associadas a essas formulações (CONTRI et al., 2011), pois nesses estudos a utilização de formulações mais complexas que os hidrogéis poderia dificultar a avaliação da influência das nanopartículas na penetração/permeação cutânea (BOLZINGER et al., 2011).

Nanocápsulas de benzofenona-3, revestidas com quitosana, veiculadas em hidrogel de hidroxietilcelulose promoveram uma maior retenção da benzofenona-3 na superfície da pele, assim como menores concentrações no compartimento receptor da célula de Franz em comparação com a substância livre incorporada em hidrogel de mesma natureza (SIQUEIRA et al., 2010).

A diminuição da taxa de lavabilidade foi observada para um hidrogel de quitosana contendo nanocápsulas de capsaicina e di-hidrocapsaicina em relação a um hidrogel de hidroxietilcelulose, avaliada em célula de Franz modificada. Além disso, quando as peles foram lavadas, maiores concentrações de capsaicinóides foram quantificadas na epiderme e na derme para essa formulação. Em peles não lavadas ambas as formulações promoveram a retenção das substâncias na camada mais externa, a epiderme (CONTRI et al., 2014a).

Em estudo *in vivo* empregando modelo animal, um hidrogel de Carbopol Ultrez 10 NF contendo nanocápsulas de núcleo lipídico de clobetasol demonstrou maior eficácia no tratamento da dermatite de contato em comparação com um hidrogel contendo o fármaco livre (FONTANA et al., 2011). Esse resultado foi associado à diminuição da taxa de penetração cutânea do clobetasol, sem alterar sua distribuição relativa nas camadas da pele, verificada para o hidrogel contendo nanocápsulas em estudo *in vitro* empregando células de Franz (DE ANDRADE et al., 2015).

3.4 Secagem de nanopartículas por aspersão

Entre as limitações para justificar o ainda reduzido emprego industrial das formulações de nanopartículas poliméricas, dentre outros fatores, pode estar a sua obtenção na forma de suspensões aquosas coloidais, propensas a instabilidades físico-químicas em tempos prolongados de armazenamento, como a agregação das nanopartículas e/ou instabilidade química do polímero, do fármaco ou das demais matérias-primas. Formas farmacêuticas líquidas são também propensas à proliferação microbiana, sendo necessária a adição de um conservante em sua constituição (GUTERRES et al., 2009; SCHAFFAZICK et al., 2003).

A secagem das suspensões de nanopartículas pode evitar ou retardar essas limitações físico-químicas e microbiológicas, possibilitando o desenvolvimento de formas farmacêuticas sólidas contendo nanopartículas ou levando à obtenção de produtos intermediários mais estáveis, com maior facilidade de armazenamento e transporte, para, por exemplo, a produção de cosméticos e formas farmacêuticas de uso tópico (MARCHIORI et al., 2013; TERROSO et al., 2009). Com esses propósitos, métodos de sublimação (liofilização) e aspersão (*spray drying*) vem sendo utilizados na desidratação das suspensões de nanopartículas (HOFFMEISTER et al., 2012; MARCHIORI et al., 2012; MORA-HUERTAS et al., 2010).

A liofilização é um processo de desidratação comumente utilizado para produtos biofarmacêuticos, que abrange basicamente três etapas: congelamento, secagem primária e secagem secundária. Durante o congelamento ocorre a formação e o crescimento de cristais de gelo, que são posteriormente removidos por sublimação (secagem primária) e por dessorção (secagem secundária). Porém, além desse processo consumir bastante tempo e apresentar custos elevados (WALTERS et al., 2014), a fina parede polimérica das nanocápsulas pode não suportar a tensão mecânica gerada durante o congelamento (ABDELWAHED et al., 2006; MORA-HUERTAS et al., 2010).

Na secagem por aspersão a amostra é atomizada, formando pequenas gotículas que entram em contato com um gás de secagem em temperatura adequada. A evaporação do solvente ocorre rapidamente, e a temperatura do produto final é

mantida baixa, permitindo a secagem de substâncias termosensíveis (SOLLOHUB et al., 2010).

Müller e colaboradores (2000) propuseram, de forma pioneira e inédita, a utilização da técnica de secagem por aspersão como alternativa para a secagem de nanocápsulas poliméricas, utilizando dióxido de silício coloidal como adjuvante. Os pós obtidos foram caracterizados como partículas micrométricas revestidas por nanocápsulas.

A utilização de temperaturas elevadas e/ou de condições não otimizadas no processo de secagem por aspersão pode causar a fusão das nanocápsulas, levando ao aumento do tamanho das partículas (GUTERRES et al., 2009 e PELTONEN et al., 2010). Na ausência de adjuvantes, a secagem por aspersão de nanopartículas de policaprolactona não resulta na formação de agregados de pós secos, mas de películas poliméricas, mesmo quando temperaturas baixas são utilizadas (entre 70 °C e 100 °C) (KHO et al., 2010).

Schaffazick e colaboradores (2006) demonstraram que os pós contendo nanopartículas de melatonina produzidos por aspersão, também utilizando dióxido de silício coloidal como adjuvante, apresentaram um aumento da estabilidade física em comparação com a suspensão de nanocápsulas original. Além disso, as formulações pulverulentas demonstraram um perfil de liberação controlado em comparação com uma solução do fármaco livre.

Beck e colaboradores (2007) produziram micropartículas de dexametasona nanorrevestidas, nas quais uma dispersão do fármaco em dióxido de silício coloidal compunha o núcleo, que foi revestido por nanocápsulas de Eudragit S 100[®], empregando a técnica de secagem por aspersão. Essas micropartículas promoveram uma liberação prolongada do fármaco e seu transporte mais lento através de monocamadas de células Caco-2.

Produtos pulverulentos redispersíveis em água foram produzidos por Tewa-Tagne e colaboradores (2007) a partir das suspensões de nanocápsulas sem fármaco utilizando adjuvantes de secagem hidrossolúveis (manitol, lactose, maltodextrina, polivinilpirrolidona K30, polivinilpirrolidona K90 e hidroxipropilcelulose), com uma

concentração de nanocápsulas de 1% (m/v). Os melhores resultados foram obtidos utilizando 10% de lactose como adjuvante.

Hoffmeister e colaboradores (2012) incorporaram os produtos obtidos pela secagem de nanocápsulas de melatonina com excipientes hidrossolúveis (lactose e maltodextrina) em hidrogéis. Os autores demonstraram um maior controle da liberação da melatonina a partir desses hidrogéis em comparação com o hidrogel produzido diretamente com a suspensão de nanocápsulas, além de uma modulação na permeação do fármaco em experimento de permeação *in vitro*.

3.5 Tretinoína

A tretinoína, ou ácido trans-retinóico (*Figura 1*) é o representante mais ativo da classe dos retinóides, que são análogos químicos da vitamina A (BERSHAD, 2001). Esta substância está envolvida no controle da diferenciação e proliferação celular de vários tecidos, especialmente do epitélio cutâneo. Ela é utilizada principalmente no tratamento de acne, psoríase, câncer de pele e fotoenvelhecimento. Seu mecanismo de ação é ainda parcialmente conhecido, mas envolve a ativação de receptores nucleares para o ácido retinóico (RAR α , RAR β e RAR γ) (SHAPIRO et al., 2011).

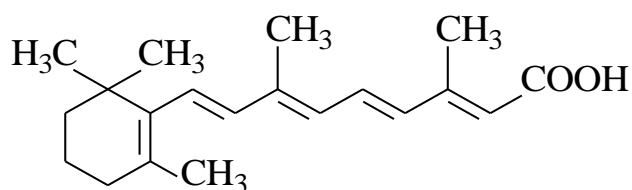


Figura 1 - Estrutura molecular do ácido trans-retinóico.

Apesar da sua efetividade considerável, o uso da tretinoína em formulações dermatológicas apresenta alguns inconvenientes devido à sua alta instabilidade na presença de luz, calor e oxigênio, à sua baixa solubilidade e ao desenvolvimento de reações adversas locais (LEHMAN et al., 1988), como vermelhidão, descamação e ressecamento da pele. Em relação aos efeitos sistêmicos, a superexposição à tretinoína apresenta potencial teratogênico (ASCENSO et al., 2014b). Os produtos gerados pela

degradação da tretinoína, além de não possuírem a atividade original, podem ser irritantes à pele (KIRCIK, 2014).

As formulações contendo tretinoína comercialmente disponíveis apresentam-se nas formas de géis, cremes e loções, com concentrações do fármaco que variam entre 0,01% e 0,1%. Os géis são geralmente prescritos para pacientes com pele oleosa, enquanto os cremes o são para pacientes com pele sensível (SERRI et al., 2008).

Existem poucos estudos comparando diretamente a efetividade de géis e cremes contendo tretinoína. Entre esses estudos encontra-se o trabalho desenvolvido por Maia Campos e colaboradores (2015), que avaliou a atividade da tretinoína na modulação do crescimento e da diferenciação celular, em linhagem de camundongos sem pelo (HRS/J-hairless). Os autores constataram que os efeitos de diminuição da espessura da camada córnea e de espessamento da epiderme foram independentes do tipo de veículo utilizado: gel, gel-creme ou creme.

Em estudo clínico duplo-cego, randomizado, controlado por placebo, realizado com géis e cremes das marcas Retin-A[®] e Tretin-X[®], em pacientes com acne moderada para severa, Webster (2006) relatou a bioequivalência clínica entre os produtos das duas marcas. Além disso, para géis e cremes com concentração de 0,025% de tretinoína, seus estudos mostram um percentual de redução do número médio total de lesões de 52,5% em média com os cremes, e de 56,5% em média com os géis. É possível concluir, a partir deste estudo, que géis e cremes com a mesma concentração de tretinoína podem apresentar efetividade clínica similar.

Ainda, em outro estudo clínico, realizado por Lehman e colaboradores (2012) utilizando géis e cremes (ambos da marca Retin-A[®]) contendo tretinoína na concentração de 0,25 mg/g, foi constatado o aumento da perda de água transepidérmica em pacientes tratados com o gel contendo tretinoína em relação a pacientes tratados com o creme. Esses dados foram relacionados ao possível aumento da penetração da tretinoína e a efeitos do próprio veículo quando géis contendo etanol são utilizados.

A adequação do veículo e da concentração de tretinoína na formulação, bem como o uso de sistemas de liberação mais sofisticados, são estratégias que vem sendo utilizadas para aumentar a efetividade e diminuir a irritação cutânea associada ao tratamento, além de proteger o fármaco contra degradação química. Alguns exemplos

de formulações desenvolvidas levando em conta tais estratégias, que se encontram comercialmente disponíveis, são: Retin-A[®] micro (contendo microesferas porosas), Atralin[®] (contendo tretinoína micronizada), Ziana[®] (contendo microcristais de tretinoína em associação com clindamicina) e Avita[®] (contendo cadeias poliméricas longas) (ROSEN et al., 2005 e KIRCIK, 2014).

Buscando o aprimoramento e a avaliação de formulações tópicas de tretinoína, diversos estudos científicos tem sido realizados nas últimas duas décadas. A incorporação da tretinoína em lipossomas mostrou o aumento de sua estabilidade química, atividade comedolítica e tolerabilidade local (BRISAERT et al., 2001). Além disso, testes de permeação cutânea *in vitro*, realizados utilizando pele de porco como membrana, revelaram que a tretinoína contida em formulações niossomais apresenta uma retenção cutânea maior em comparação com uma formulação comercial de lipossomas (MANCONI et al., 2006).

Nanopartículas lipídicas sólidas contendo tretinoína reduziram a irritação cutânea, avaliada em modelos animais de camundongos *Rhino* e de coelhos, em comparação com uma formulação comercial convencional contendo tretinoína (Vitanol-A[®]), ao passo que mantiveram a atividade comedolítica e o espessamento da epiderme similares, avaliados em modelo de camundongos *Rhino* (CASTRO et al., 2011).

A utilização de lipossomas com promotores de penetração, como carreadores para tretinoína, levou a uma maior retenção cutânea do fármaco, diminuindo sua permeação em comparação com uma dispersão de tretinoína livre, de mesma composição das vesículas, avaliadas em experimento *in vitro* em célula de Franz, utilizando pele de porco como membrana (MANCONI et al., 2011).

Ridolfi e colaboradores (2012) produziram nanopartículas lipídicas sólidas contendo tretinoína, com adição de quitosana na fase aquosa. Essas nanopartículas aumentaram a estabilidade física do fármaco e, além disso, a associação com quitosana levou a uma atividade antibacteriana importante contra *Propionibacterium acnes*, microrganismo associado à acne, podendo aumentar a eficácia terapêutica da tretinoína no tratamento tópico dessa doença.

Ascenso e colaboradores (2014a) avaliaram a liberação e a penetração cutânea *in vitro* e o potencial de irritação cutânea *in vivo* da tretinoína encapsulada em vesículas ultradeformáveis. A formulação promoveu uma liberação controlada do fármaco e uma maior retenção no estrato córneo em comparação com uma formulação comercial (Ketrel[®]), evitando a passagem da tretinoína para o meio receptor em 24 horas de estudo. A formulação contendo as vesículas também obteve menor potencial de irritação cutânea em estudo *in vivo* em modelo animal, utilizando camundongos BALB/c.

Considerando a tretinoína encapsulada em nanocápsulas poliméricas, Ourique e colaboradores (2008) demonstraram um aumento da fotoestabilidade da tretinoína frente à radiação UVC ($t_{1/2}$ de $95,18 \pm 4,84$ min) em comparação com uma solução metanólica do fármaco ($t_{1/2}$ de $40,07 \pm 4,23$ min). Em outro estudo dos mesmos autores (OURIQUE et al., 2010), nanocápsulas de núcleo lipídico demonstraram estabilidade físico-química superior às nanocápsulas poliméricas convencionais, avaliada durante quatro meses de armazenamento, sem que a mudança da estrutura das partículas interferisse na fotoproteção conferida pelas nanocápsulas poliméricas. Os autores atribuíram o aumento da estabilidade físico-química à maior viscosidade do núcleo, responsável por diminuir a permeabilidade do fármaco através da parede polimérica nas nanocápsulas de núcleo lipídico. A suspensão de nanocápsulas de núcleo lipídico demonstrou maior estabilidade química frente à radiação UVC ($t_{1/2} = 85 \pm 12$ min) e UVA ($t_{1/2} = 124 \pm 21$ min) em relação à solução metanólica do fármaco ($t_{1/2} = 40 \pm 04$ min e 45 ± 06 min, respectivamente).

Em outro estudo, Ourique e colaboradores (2011) propuseram também a incorporação das suspensões de nanocápsulas de núcleo lipídico em hidrogéis, no intuito de adequar a formulação para utilização dermatológica. Os hidrogéis mantiveram as características de aumento da fotoestabilidade contra a radiação UVA ($t_{1/2} = 26,6 \pm 9,75$ h), conferidas pela nanoencapsulação, em comparação com um hidrogel comercial contendo o fármaco livre (Vitanol-A) ($t_{1/2} = 3,8 \pm 0,42$ h). Os autores demonstraram também uma menor permeabilidade da tretinoína ($K_p = 0,33 \pm 0,01$ $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$) em comparação com um hidrogel contendo tretinoína livre ($K_p = 0,73 \pm 0,12$ $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$), avaliadas em experimentos *in vitro* utilizando células de Franz e

pele de abdome humana (proveniente de cirurgia plástica) como membrana. Além disso, a fase *lag* da curva de permeação aumentou duas vezes para a formulação contendo nanocápsulas, indicando a maior retenção da tretinoína na superfície da pele.

Na sequencia destes estudos, Marchiori et al. (2012) propuseram a secagem por aspersão das suspensões de nanocápsulas de núcleo lipídico contendo tretinoína, usando a lactose como adjuvante, como estratégia para aumentar a estabilidade microbiológica e facilitar o armazenamento e transporte das formulações convertidas em pós. O processo de secagem não interferiu na fotoproteção da tretinoína, originalmente conferida pelas nanopartículas de núcleo lipídico. Ainda, hidrogéis produzidos através da adição direta dos pós obtidos por tal processo, ou de sua redispersão em água, demonstraram características apropriadas para uso dermatológico (espalhabilidade, propriedades reológicas e pH). Em relação à proteção contra a radiação UVA, os hidrogéis contendo nanocápsulas de núcleo lipídico, submetidos ou não à secagem, demonstraram tempos de meia-vida similares ($t_{1/2}=19,6 \pm 0,32$ h, e $t_{1/2}=20,7 \pm 1,4$ h; respectivamente) e superiores em relação à suspensão de nanocápsulas original ($t_{1/2}$ de aproximadamente 2 h) e a um hidrogel comercial contendo tretinoína livre (Vitanol A[®]) ($t_{1/2} = 3,8 \pm 0,4$ h) (MARCHIORI et al., 2013).

Os trabalhos discutidos nos últimos parágrafos demonstraram vantagens dos hidrogéis contendo nanocápsulas de núcleo lipídico de tretinoína, em relação ao aumento da fotoestabilidade e à diminuição da permeabilidade do fármaco na pele, em comparação com um hidrogel comercial convencional. Além disso, provaram a viabilidade da secagem das suspensões de nanocápsulas por aspersão, e da incorporação do produto obtido em uma formulação semissólida, com manutenção das características de fotoestabilidade presentes no hidrogel produzido com a suspensão. Porém, o desempenho de um hidrogel produzido com nanocápsulas de tretinoína secas por aspersão quanto à penetração/permeação cutânea da tretinoína ainda não foi demonstrado. Nesse sentido, o presente estudo tem a intenção de avaliar os perfis de distribuição nas camadas da pele (estrato córneo, epiderme e derme), absorção cutânea e liberação do fármaco a partir de hidrogéis contendo nanocápsulas de núcleo lipídico de tretinoína, obtidos tanto a partir das suspensões, quanto de seus produtos secos,

investigando a influência da secagem das suspensões nas propriedades biofarmacêuticas desses hidrogéis.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1 Matérias-primas

- Tretinoína (PharmaNostra, São Paulo – SP, Brasil);
- Poli (ϵ -caprolactona) Mn 80.000Da (Sigma-Aldrich, São Paulo – SP, Brasil);
- Monoestearato de sorbitano (Sigma-Aldrich, São Paulo – SP, Brasil);
- Triglicerídeos dos ácidos cáprico/caprílico (Brasquim, Porto Alegre – RS, Brasil);
- Polissorbato 80 (Henrifarma, São Paulo – SP, Brasil);
- Carbopol Ultrez 10 NF (Deg, São Paulo – SP, Brasil);
- Imidazolidinil ureia (Delaware, Porto Alegre – RS, Brasil);
- Trietanolamina (Delaware, Porto Alegre – RS, Brasil);
- Lactose (LH 201, DFE Pharma, Borculo, Países Baixos);
- Polivinilpirrolidona K 30 (Sigma-Aldrich, São Paulo – SP, Brasil).

4.1.2 Solventes e outros materiais

- Água Milli-Q (Destilador/deionizador Milli-Q – Millipore, Billeria – MA, EUA);

Acetona padrão-analítico (Vetec, Duque de Caxias – RJ, Brasil);

- Acetonitrila grau CLAE (Tédia Brazil, Rio de Janeiro – RJ, Brasil);
- Ácido acético glacial p.a (LabSynth, Diadema – SP, Brasil);
- Álcool etílico absoluto p.a (Nuclear, Diadema – SP, Brasil);
- Membranas de polivideno HVLP 0,45 μ m (Millipore, Billeria – MA, EUA);
- Hastes flexíveis de algodão (Cremer, Blumenau – SC, Brasil);
- Fita adesiva 3M (Scotch, Sumaré – SP, Brasil);

- Membrana de diálise de celulose – MW 10,000 kDa - (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA);
- Tubos de ensaio Falcon (TPP, Switzerland, Suíça);
- Metanol grau CLAE (Tédia Brazil, Rio de Janeiro – RJ, Brasil);
- Cloreto de sódio (Nuclear, Diadema – SP, Brasil);
- Fosfato de potássio (KH₂PO₄) (Nuclear, Diadema – SP, Brasil);
- Lâminas de bisturi número 24 (Feather, Osaka, Japão);
- Bisturi número 4 (Feather, Osaka, Japão);
- Grids de cobre com revestimento carbono-formvarm (Electron Microscopy Science, Hatfield – PA, EUA);
- Vitacid[®], gel contendo tretinoína 0,25 mg/g – lote: k577, fabricação: 09/2014, validade:09/2016 (Theraskin[®]);
- Vitanol-A[®], creme contendo tretinoína 0,25 mg/g – lote:1050493, fabricação:10/2014, validade:10/2016 (Stiefel);
- Pele de abdome de porcos (fêmeas) (Abatedouro Araldi, Nova Roma do Sul – RS, Brasil);
- Coluna RP-18 (5 µm, 150 mm x 4,60 mm), (Phenomenex, Torrance – CA, EUA);
- Pré-coluna (Phenomenex, Torrance – CA, EUA).

4.1.3 Aparelhos e Equipamentos

- Balança analítica modelo APX-200 (Denver Instrument, Bohemia – NY, EUA);
- Rotaevaporador, Rotavapor[®], RII (Büchi[®], Flawil – Suíça);
- Martersizer 2000[®] (Malvern - Worcestershire, Reino Unido);
- Zetasizer[®], modelo ZEN 3600 (Malvern instruments, Southborough - MA, EUA);
- Potenciômetro Ultra-Basic (Denver Instrument, Bohemia – NY, EUA);
- Mini Spray Dryer B-290 (Büchi[®], Flawil – Suíça);
- Balança de infravermelho MB45 (OHAUS[®], Heuwinkelstrasse – Suíça);

- Viscosímetro LV-DV-II+Pro (Brookfield Engineering Laboratories, Middleboro – MA, EUA):
 - Spindle SC4-25
 - Software: Rheocalc[®];
- Ultrassom - 1400A Ultracleaner, (Unique, Indaiatuba – SP, Brasil);
- Centrífuga modelo 5417R (Eppendorff, São Paulo – SP, Brasil);
- Microscópio eletrônico de transmissão (Jeol JEM-1200 ExII, Tóquio, Japão);
- Microscópio eletrônico de varredura (Jeol JSM-6060, Tóquio, Japão);
- Célula de difusão de Franz Automatizada (Célula de Franz Microette Plus-Hanson Research[®] - Chatsworth, EUA);
- Células de difusão de Franz manuais;
- Medidor de espessura (Mitutoyo, Kanagawa, China);
- Vórtex (Certomat MV, B. Braun Biotech);
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) (Shimazu[®] - Tóquio, Japão):
 - Auto-injetor (LC-20A Prominence)
 - Detector UV-Vis
 - Bomba S-200
 - Software: Lab Solutions[®].

4.2 Métodos

4.2.1 Produção e caracterização físico-química das suspensões de nanocápsulas de núcleo lipídico

As suspensões de nanocápsulas contendo tretinoína (LNC-TTN) (n=3) foram preparadas pelo método da deposição interfacial do polímero pré-formado (JÄGER et al., 2009; VENTURINI et al., 2011). A fase orgânica da formulação contendo 0,1 g de poli- ϵ (caprolactona) (Mn 80.000); 0,038 g de monoestearato de sorbitano; 162 μ L de triglicerídeos dos ácidos cáprico e caprílico; 2,5 mg de tretinoína e 27 mL de acetona, foi mantida em banho-maria a uma temperatura de 40°C, sob agitação magnética, até a completa solubilização dos componentes. Após, esta fase orgânica foi injetada, com

auxílio de um funil apropriado, na fase aquosa da formulação, composta por 0,077 g de polissorbato 80 e 53 mL de água ultrapura, sob agitação magnética moderada. Em rotaevaporador, o solvente orgânico foi removido e a formulação foi concentrada para o volume final de 10 mL, para a obtenção de uma concentração final de tretinoína de 0,25 mg/mL. Da mesma forma, suspensões de nanocápsulas brancas (LNC-Br) (n=3) foram preparadas, porém omitindo-se a adição do fármaco. As suspensões (lotes de 10 mL) foram preparadas e analisadas em triplicata. Após a preparação, as amostras foram armazenadas em frasco âmbar e à temperatura ambiente, até o momento das análises.

4.2.1.1 Diâmetro das partículas e polidispersão

O diâmetro médio das partículas foi avaliado por difração de laser (Mastersizer[®] 2000, Malvern, Reino Unido) e espalhamento de luz dinâmico (Zetasizer[®] nano-ZS, modelo ZEN 3600, Malvern, EUA). A análise por difração de laser foi realizada adicionando-se uma alíquota da amostra diretamente na unidade de dispersão por via úmida do equipamento (Mastersizer[®] 2000, Hydro SM) com velocidade de agitação de 2.000 rpm. O índice de refração utilizado foi de 1,59 (relativo ao látex de poliestireno) (DA SILVA et al., 2013). A distribuição de tamanho foi expressa pelo valor de *Span*, calculado pela *Equação 1*. As medidas de $D(v\ 0,1)$; $D(v\ 0,5)$ e $D(v\ 0,9)$ foram obtidos a partir dos diâmetros das esferas equivalentes por volume (partícula e esfera com mesmos volumes) e representam os diâmetros abaixo do qual estão respectivamente 10%, 50% e 90% do volume (*v*) acumulado das partículas da amostra (VENTURINI et al., 2011).

$$Span = \frac{D_{(v\ 0,9)} - D_{(v\ 0,1)}}{D_{(v\ 0,5)}}$$

(Equação 1)

Para a análise por espalhamento de luz dinâmico, a amostra foi diluída 500 vezes (v/v) em água ultrapura previamente filtrada em membrana de 0,45 µm

(Millipore). Além do diâmetro médio, o índice de polidispersão (IPd) também foi calculado empregando essa técnica.

4.2.1.2 Morfologia

A morfologia das partículas das suspensões de nanocápsulas foi avaliada por microscopia eletrônica de transmissão (MET) (Jeol 1200 ExII, Tóquio, Japão).

A amostra foi diluída 10 vezes (v/v) em água ultrapura, depositada em *grid* de cobre com revestimento de formvar/carbono, contrastada com solução aquosa de acetato de uranila a 2%, e mantida em dessecador até a realização da análise no Centro de Microscopia da UFRGS, com equipamento operando com tensão de aceleração do feixe de elétrons de 80 kV. As imagens foram obtidas no aumento de 150.000 vezes.

4.2.1.3 Potencial zeta

O potencial zeta foi medido por mobilidade eletroforética (Zetasizer[®] nano-ZS modelo ZEN 3600, Malvern, EUA). A amostra foi diluída 500 vezes em solução de NaCl 10 mM previamente filtrada por membrana de 0,45 µm (Millipore). Foram realizadas três leituras para cada amostra.

4.2.1.4 Teor e eficiência de encapsulação

O teor de tretinoína nas suspensões de nanocápsulas e a eficiência de encapsulação foram determinadas empregando um método cromatográfico validado por Ourique e colaboradores (2010). O sistema cromatográfico utilizado foi composto por um cromatógrafo Shimadzu LC-20A (Shimadzu, Tokyo, Japão) equipado com uma coluna cromatográfica Gemini de fase reversa C18 (150 x 4.60 mm, 5 µm, 110 Å de diâmetro de poro, Phenomenex®, Torrance, EUA), fase móvel constituída por metanol e água (85:15), com 1% de ácido acético glacial, fluxo de fase móvel de 1mL/min, volume de injeção de amostra de 20 µL, comprimento de onda de detecção

de 342 nm. Esse método foi co-validado, de acordo com a RE n.º 899/2003 (ANVISA).

Para a análise do teor, a extração da tretinoína das formulações foi realizada com metanol. As amostras foram submetidas a ultrassom por 30 minutos, centrifugação por 5 minutos a 2,050 x g; e filtração por membrana de 0,45 µm (Millipore), antes da injeção no sistema cromatográfico.

A determinação da eficiência de encapsulação foi realizada pela diferença entre a concentração total de tretinoína na formulação e a concentração presente na fase aquosa da suspensão. A análise da concentração de tretinoína na fase aquosa foi realizada por técnica de ultrafiltração-centrifugação das suspensões com a utilização de membranas Microcon[®] (MC Millipore 10,000 Da) durante 5 minutos a 12.000 rpm. Após, o ultrafiltrado foi injetado diretamente no sistema cromatográfico.

4.2.1.5 pH

O pH foi determinado diretamente nas suspensões de nanocápsulas, utilizando um medidor potenciométrico previamente calibrado com soluções tampão pH 4,0 e pH 7,0.

4.2.2 Produção e caracterização físico-química dos pós

Os pós contendo nanocápsulas de núcleo lipídico com tretinoína (*LNC-TTN-SD*) e nanocápsulas de núcleo lipídico brancas (sem o fármaco) (*LNC-Br-SD*) foram produzidos pela secagem das suspensões de nanocápsulas por aspersão (*spray-drying*), utilizando como adjuvante uma mistura de lactose e PVP K30 (1:1 m/m), na concentração de 10% (m/v). Os adjuvantes foram previamente dispersos nas suspensões de nanocápsulas, com auxílio de agitação magnética por 20 minutos. Os parâmetros utilizados no processo foram: fluxo de ar comprimido de 600 L/h, fluxo de alimentação da amostra de 5 mL/min, temperatura de entrada de 120 °C±5, e aspiração de 100 %. Foram produzidos três lotes (50 mL) de cada amostra. Os pós obtidos foram armazenados em dessecador, sob proteção da luz, até o momento das análises.

4.2.2.1 Diâmetro das partículas após redispersão em água

O diâmetro das partículas após redispersão em água dos pós LNC-TTN-SD e LNC-Br-SD foi avaliado por difração de laser (Mastersizer[®] 2000, Malvern, Reino Unido). Os pós foram adicionados diretamente na unidade de dispersão por via úmida do equipamento (Mastersizer 2000, Hydro SM) em quantidade suficiente para atingir uma obscuração de 2%, utilizando velocidade de agitação de 2.000 rpm. As leituras foram realizadas no tempo de 5 minutos. O índice de refração utilizado foi de 1,59 (relativo ao látex de poliestireno).

4.2.2.2 Teor

A tretinoína foi extraída dos pós utilizando metanol. As amostras foram mantidas em agitação magnética por 30 min e posteriormente em ultrassom por 30min. Após, foram filtradas em membrana de 0,45 µm (Millipore), conforme método validado por Marchiori e colaboradores (2012), e o fármaco foi quantificado utilizando as condições descritas no item 4.2.1.4.

4.2.2.3 Morfologia e diâmetro das partículas

A caracterização morfológica dos pós foi realizada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) (Jeol JSM-6060, Tóquio, Japão), no Centro de Microscopia da UFRGS. Os pós foram depositados em *stubs* e metalizados com ouro (Jeol Jee 4BSVG-IN, Tóquio, Japão). O microscópio foi operado em intensidade de 11 kv. As fotomicrografias foram obtidas em aumentos entre 500 e 20.000 vezes. As imagens foram analisadas utilizando o software *Image J* (versão 1.44u, *National Institutes of Health*) para determinar a distribuição de tamanho e o diâmetro médio das partículas.

4.2.2.4 Perda por dessecação

As análises de perda por dessecação foram realizadas em balança de infravermelho (OHAUS, MB45), utilizando 1,0 g da amostra, temperatura de 105°C, e tempo de 1 minuto, conforme recomendação da Farmacopéia Brasileira, V edição (2010).

4.2.3 Produção e caracterização dos hidrogéis

Hidrogéis contendo nanocápsulas de núcleo lipídico foram produzidos a partir das suspensões aquosas (G-LNC) ou de seus produtos secos (G-LNC-SD). As formulações contendo tretinoína (G-LNC-TTN e G-LNC-TTN-SD) ou não contendo tretinoína (G-LNC-Br e G-LNC-Br-SD) foram preparadas da seguinte forma: 0,6 g de imidazolinidil ureia foram solubilizados em quantidade suficiente para 100 g de suspensão de nanocápsulas (no caso das formulações G-LNC) ou de água ultrapura (no caso das formulações G-LNC-SD). Essa fase aquosa foi adicionada, sob homogeneização com pistilo, em gral de porcelana contendo 0,5 g de Carbopol Ultrez 10[®]. Após, foram adicionados 0,2 g de trietanolamina, sob homogeneização manual, para o ajuste do pH e formação da rede polimérica. Para as formulações G-LNC-SD, quantidades suficientes dos pós foram incorporados nos hidrogéis previamente preparados com água ultrapura, conforme descrito acima. A concentração teórica final de tretinoína nas formulações foi de 0,25 mg/g. Da mesma forma, hidrogéis brancos sem o fármaco (G-Br) foram preparados seguindo o mesmo procedimento, omitindo-se a adição da suspensão de nanocápsulas ou do pó.

4.2.3.1 Diâmetro das partículas

O perfil de distribuição do diâmetro das partículas foi avaliado por difração de laser (Mastersizer[®] 2000, Malvern, Reino Unido). As amostras de géis foram diluídas 20 vezes em água ultrapura. Para as amostras dos géis G-LNC-SD, também foram realizadas análises com amostras submetidas a ultrassom por 20 minutos, com o

objetivo de causar o desprendimento das nanocápsulas dos microaglomerados e possibilitar a sua detecção pelo equipamento. As amostras foram adicionadas diretamente na unidade de dispersão por via úmida do equipamento (Mastersizer 2000, Hydro SM) e analisadas utilizando velocidade de agitação de 2.000 rpm. O índice de refração utilizado foi de 1,59 (relativo ao látex de poliestireno).

4.2.3.2 Teor

Um grama das formulações foi transferido para balão volumétrico de 25 mL, seguido da adição de uma quantidade suficiente de metanol, como líquido extrator. As amostras foram submetidas a ultrassom por 30 minutos, o volume do balão volumétrico foi então completado com metanol e as amostras foram centrifugadas em velocidade de 3.500 rpm por 15 minutos. Após, as amostras foram filtradas em papel filtro (Quantitative papel filtro, JP4, 28 μm) e filtro de membrana (Millipore, 0,45 μm), conforme método validado por Ourique e colaboradores (2011) e alterado por Oliveira (2013), e a concentração de tretinoína foi determinada utilizando as condições descritas no item 4.2.1.4.

4.2.3.3 Comportamento reológico

O comportamento reológico das formulações foi determinado em viscosímetro rotacional (LVDV-II+ PRO Digital, Brookfield Instruments, Reino Unido), utilizando *spindle* SC4-25 com adaptador SSA. As amostras foram acondicionadas em porta-amostra, acoplado a banho termostatizado à temperatura de 25°C \pm 1. As velocidades de rotação do *spindle* foram selecionadas com base em testes preliminares, para atender os limites de torque (entre 10% e 100%). Os reogramas foram construídos com base nos parâmetros fornecidos pelo software do equipamento (Rheocalc[®]), a partir da representação gráfica das velocidades de cisalhamento em função das tensões de cisalhamento. O comportamento reológico foi determinado testando-se os quatro modelos matemáticos para fluidos não newtonianos descritos na *Tabela 1*, onde τ é a tensão de cisalhamento, τ_0 é a tensão inicial de cisalhamento, η é a viscosidade, n é o

índice de fluxo, κ é o índice de consistência e γ é a taxa de cisalhamento (KIM et al. 2003). O modelo com coeficiente de regressão mais próximo de 1 foi escolhido como o que melhor descreve o comportamento das formulações semissólidas.

Tabela 1 - Modelos matemáticos que descrevem fluidos não newtonianos.

Modelo	Comportamento	Equação
Bingham	Fluxo plástico perfeito	$\tau = \tau_0 + \eta\gamma$
Casson	Fluxo plástico	$\tau^{0.5} = \tau_0^{0.5} + \eta^{0.5}\gamma^{0.5}$
Ostwald	Fluxo pseudoplástico ($n < 1$)	$\tau = K\gamma^n$
Herschel-Bulkley	Fluxo pseudoplástico com valor de cedência	$\tau = \tau_0 + K\gamma^n$

4.2.3.4 Morfologia

A análise morfológica das nanoestruturas presentes nos hidrogéis foi realizada por microscopia eletrônica de transmissão (JEM-1200 ExII (Jeol, Tóquio, Japão)). As amostras foram diluídas 10 vezes (v/v) em água ultrapura, depositadas em *grids* de cobre com revestimento de formvar/carbono, contrastadas com solução aquosa de acetato de uranila a 2% (m/v), e mantidas em dessecador até a realização da análise no Centro de Microscopia da UFRGS, com equipamento operando a 80 kV. As amostras foram previamente filtradas em membrana de 1 μ m, a fim de evitar o rompimento do filme durante a análise. Foram obtidas imagens nos aumentos de 100.000 e 200.000 vezes.

4.2.4 Liberação *in vitro* da tretinoína a partir das formulações semissólidas

A liberação *in vitro* da tretinoína a partir das formulações semissólidas produzidas (n =3) foi avaliada em comparação com formulações comerciais de gel (Vitacid[®]) e creme (Vitanol A[®]) contendo a mesma concentração do fármaco. Os experimentos foram realizados utilizando células de difusão de Franz com área de difusão de 1,76 cm² e membranas de celulose de 10 kDa (membranas de saco de

diálise). O meio receptor foi composto por tampão fosfato pH 7,4 e etanol (70:30), o qual foi mantido em agitação magnética e aquecimento por banho de água circulante em temperatura de $37\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1$, com o objetivo de manter a temperatura na superfície da membrana em $32\text{ }^{\circ}\text{C}$, que é próxima à temperatura fisiológica da pele (AULTON et al., 2013; BARTH et al., 2011; HASLER-NGUYEN et al., 2012; LEE et al., 2010; SAMAH et al., 2010). No início dos experimentos foram aplicados 0,3 g das formulações semissólidas sobre as membranas. Durante o experimento, coletas de 1mL de meio receptor foram realizadas nos tempos de 2, 8, 12, 14, 16, 20, 24, 36, 48 e 60 horas, sendo que o volume coletado nestes tempos foi automaticamente repostado com meio receptor novo. A tretinoína foi quantificada nas amostras conforme método validado por Oliveira (2013), empregando os parâmetros descritos no item 4.2.1.4, com alteração do volume de injeção para 100 μL . Foram construídos gráficos do percentual de tretinoína liberado *versus* o tempo. Os modelos matemáticos que descrevem os comportamentos de liberação *in vitro* de fármacos (Tabela 2) foram aplicados a esses perfis. O modelo com R^2_{ajustado} mais próximo de 1 (COSTA et al., 2001) foi escolhido como o que melhor descreve a liberação da tretinoína a partir das formulações semissólidas.

Tabela 2 - Modelos matemáticos que descrevem os perfis de liberação *in vitro* de fármacos.

Modelo	Equação
Ordem zero	$Q_t = Q_0 + K_0 t$
Primeira ordem	$\log(Q_t) = \log(Q_0) + \frac{K_1 t}{2,303}$
Hixson-Crowell	$W_0^{1/3} - W_t^{1/3} = K_s t$
Weibull	$\log[-h(1-m)] = b \log(t - T_i) - \log(a)$
Higuchi	$Q_t = f_t = K_H \sqrt{t}$
Baker-Lonsdale	$\frac{3}{2} \left[1 - \left(1 - \frac{M_t}{M_\infty} \right)^{2/3} \right] - \frac{M_t}{M_\infty} = K_t$
Korsmeyer-Peppas	$\frac{M_{(t-l)}}{M_\infty} = a(t-l)^n + b$
Quadrático	$Q_t = 100(K_1 t^2 + K_2 t)$
Logístico	$Q_t = \frac{A}{[1 + e^{-K(t-y)}]}$
Gompertz	$Q_t = \frac{A}{e^{e^{-K(t-y)}}$
Hopfenberg	$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - [1 - K_1 t(t-l)]^n$

Para os modelos de ordem zero e primeira ordem, Q_t é a quantidade de fármaco dissolvido no tempo t , Q_0 é a quantidade inicial de fármaco dissolvido na solução, e K_0 e K_1 são, respectivamente, as constantes de liberação de ordem zero e primeira ordem. Para o modelo de *Weibull*, α define a escala de tempo do processo, T_i representa o intervalo de tempo antes do início da liberação, b é o parâmetro de forma que caracteriza a curva como exponencial (se $b=1$), sigmóide (se $b>1$) ou parabólica (se $b<1$). Para o modelo de *Higuchi*, K_H é a constante de dissolução de *Higuchi*. Para o modelo de *Hixson-Crowell*, W_0 é a quantidade inicial de fármaco existente na forma farmacêutica, W_t é a quantidade de fármaco existente na forma farmacêutica no tempo t e K_s é a constante que incorpora a relação superfície/volume. Para o modelo de *Kosmeyer-Peppas*, a é uma constante que incorpora características estruturais e

geométricas da forma farmacêutica, n é o expoente de liberação, a função de t é M_t/M_∞ , e l é o tempo de espera para o início da liberação do fármaco a partir da forma farmacêutica. Para o modelo de *Baker-Lonsdale*, M_t é a quantidade de fármaco liberado no tempo t , M_∞ é a quantidade de fármaco liberado em um tempo infinito, D_m é o coeficiente de difusão, r_0 é o raio da matriz esférica e C_0 é a concentração inicial do fármaco na matriz. Para o modelo de *Hopfenberg*, M_t/M_∞ é a fração de fármaco dissolvido; $k_1 = k_0/C_0 a_0$, onde, k_0 é a constante da taxa de erosão, C_0 é a concentração inicial do fármaco na matriz e a_0 é o raio inicial da esfera ou cilindro ou da meia altura da placa, e n é o valor de 1, 2 ou 3 para uma placa, cilindro e esfera, respectivamente. No modelo quadrático, k_1 é a constante que denota a liberação do fármaco dependente do quadrado do tempo (t^2), k_2 é a constante que denota a contribuição relativa do tempo (t) na liberação do fármaco. No modelo logístico, A é a fração máxima de fármaco liberada em um tempo infinito, y é igual ao tempo onde $Q_t = A/2$, e k é o parâmetro de forma que caracteriza a curva. No modelo de *Gompertz*, A é a fração máxima de fármaco liberada em um tempo infinito, y é igual ao tempo onde $Q_t = A/\log(1)$, e k é o parâmetro de forma que caracteriza a curva.

O fluxo médio de liberação do fármaco em $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ foi calculado para todas as formulações e representa a média de três replicatas.

4.2.5 Estudo da penetração cutânea da tretinoína

4.2.5.1 Preparação das membranas

Para os estudos de permeação *in vitro*, foram utilizadas membranas de pele de abdome de porco (fêmea) (Abatedouro Araldi, Nova Roma do Sul – RS, Brasil). As peles utilizadas foram retiradas logo após o sacrifício e armazenadas adequadamente sob refrigeração até a dissecação. Antes da utilização nos experimentos, os pelos e o tecido adiposo subcutâneo foram retirados. Foram recortados círculos da pele, que tiveram sua espessura devidamente medida. Círculos de pele com espessura entre 1,5 e 2,0 mm foram selecionados para a realização dos experimentos de permeação. A limpeza final da pele foi realizada na superfície interna com éter de petróleo, visando

retirar o tecido adiposo excedente, e na superfície externa com solução de lauril sulfato de sódio a 1%. As peles foram então lavadas com água corrente e a seguir com água ultrapura. Depois de secos, os círculos foram embalados individualmente em papel alumínio, e congelados a -4°C . Entre a preparação e o uso como membranas, todos os círculos de pele permaneceram congelados por tempo não superior a 3 meses.

4.2.5.2 Condições experimentais

O perfil de penetração cutânea da tretinoína foi avaliado ($n=6$) nos tempos de 12, 14 e 16 horas para as formulações contendo nanocápsulas de núcleo lipídico (G-LNC-TTN e G-LNC-TTN-SD) e para formulações comerciais de gel (Vitacid[®]) e creme (Vitanol A[®]). Os experimentos foram realizados utilizando células de difusão de Franz, com área de difusão de $1,76\text{ cm}^2$; pele de abdome de porco como membrana, meio receptor composto por tampão fosfato pH 7,4 e etanol (70:30) e regime de doses infinitas. O meio receptor foi mantido sob agitação magnética, em banho aquecido a temperatura de $37^{\circ}\text{C}\pm 1$, para que a temperatura na superfície da pele permanecesse em torno de 32°C , assim como descrito no experimento de liberação. No início dos experimentos foram aplicados 0,3 g das formulações semissólidas sobre as membranas. O compartimento doador das células foi coberto com papel alumínio. Ao final de cada tempo, as células de Franz foram desmontadas, as membranas retiradas e o meio receptor coletado e filtrado através de membrana de $0,45\text{ }\mu\text{m}$ (Millipore) diretamente para os frascos do injetor automático do sistema cromatográfico. O excesso de formulação na superfície da membrana foi removido com auxílio de um *swab* e um pedaço de fita adesiva. No final, as técnicas de *tape stripping* e separação por calor foram realizadas para os estudos de retenção, conforme descrito a seguir.

4.2.5.3 Retenção no estrato córneo (Técnica de *tape stripping*)

As camadas do estrato córneo foram retiradas com o auxílio de 18 pedaços de fita adesiva Scotch 3M, medindo $25\times 25\text{ mm}$. As fitas foram colocadas em tubos Falcon para extração e análise cromatográfica conforme descrição a seguir.

4.2.5.4 Retenção na epiderme e na derme (técnica de separação por calor)

Após a retirada das camadas do estrato córneo, a epiderme e a derme foram separadas a partir da imersão da pele em água ultrapura a 60°C, por 45 segundos. A epiderme foi então removida com o auxílio de bisturi, e colocada em eppendorf de 2mL. A derme foi picotada e colocada em tubo Falcon de 10 mL. Todas as amostras foram submetidas à extração e análise cromatográfica conforme descrição a seguir.

4.2.5.5 Extração e quantificação da tretinoína nas camadas da pele

A tretinoína foi extraída das camadas da pele com metanol, conforme metodologia validada por Oliveira (2013). Nos tubos contendo as camadas do estrato córneo (fitas) e nos tubos contendo a derme picotada foram adicionados 5 mL de extrator, enquanto nos eppendorfs contendo a epiderme foi adicionado 1 mL de extrator. As amostras foram submetidas ao vórtex por 2 minutos, a ultrassom com temperatura de 32° C por 30 minutos e à centrifugação a 3.500 rpm por 30 minutos. Após a extração, as amostras foram filtradas diretamente para os frascos do injetor automático do sistema cromatográfico, empregando filtros de membrana de 0,45 µm (Millipore). A tretinoína foi quantificada nas amostras do meio receptor, do estrato córneo, da epiderme e da derme empregando o método cromatográfico descrito no item 4.2.1.4, com modificação do volume de injeção para 100 µL.

4.2.6 Análise estatística dos resultados

O tratamento estatístico dos dados obtidos foi realizado por 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.

4.2.7 Descarte de resíduos

Todos os resíduos químicos, bem como aqueles oriundos de material biológico, gerados durante a realização deste trabalho, foram segregados, acondicionados e identificados segundo normas do Plano de Gerenciamento de Resíduos implementado pela Resolução COSAT 01/07 da Faculdade de Farmácia – UFRGS.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização das formulações

5.1.1 Caracterização das suspensões de nanocápsulas

Os dados de distribuição de tamanho das partículas, obtidos por difração de laser ($D(4,3)$; $D(0,1)$; $D(0,5)$; $D(0,9)$) e por espalhamento de luz dinâmico (d), assim como os valores de Span e IPd, calculados a partir dos respectivos resultados dessas técnicas, o potencial zeta, o pH, o teor e a eficiência de encapsulação das suspensões de nanocápsulas contendo tretinoína (LNC-TTN) ou brancas (sem o fármaco) (LNC-Br) estão apresentados na *Tabela 3*.

Tabela 3 - Características físico-químicas das suspensões de nanocápsulas LNC-TTN e LNC-Br (n=3).

Propriedade	LNC-TTN	LNC-Br
$D(4,3)$ (nm)	194,0±7,9	172,7±7,6
$D(0,1)$ (nm)	75,0±1,7	74,0±3,6
$D(0,5)$ (nm)	164,3±6,8	149,3±6,0
$D(0,9)$ (nm)	326,0±42,6	304,0±18,4
Span	1,7±0,1	1,5±0,1
d (nm)	190,5±0,9	190,1±3,4
IPd	0,09±0,02	0,04±0,03
PZ (mV)	-8,2±1,2	-6,4 ±0,3
pH	6,2±0,2	6,9±0,3
Teor (mg/mL)	0,255±0,004	*
EE (mg/mL)	0,246	*

* não se aplica

As formulações preparadas apresentaram características consistentes, quando comparadas com as descritas na literatura para suspensões de nanocápsulas de núcleo

lipídico (VENTURINI et al., 2011; DE BRUM et al., 2014; DE ANDRADE et al., 2015).

O diâmetro médio de *De Brouckere* $D(4,3)$, também conhecido como média de volume ponderado, tem fórmula dada na *Equação 2*:

$$D(4,3) = \frac{\sum d^4}{\sum d^3}$$

(Equação 2)

Na equação 2, d representa o diâmetro de cada partícula. Esta fórmula leva em conta o volume e a área superficial das partículas e introduz uma dimensão, por isso o volume apresenta dependência na quarta potência em d e a área superficial tem dependência cúbica em d . O diâmetro médio de *De Brouckere* indica o tamanho médio das partículas, isto é, o ponto central ao redor do qual a distribuição de frequência do tamanho das partículas irá ocorrer, sendo o centro de gravidade da distribuição das partículas (RAWLE, 2003). Esses valores foram de $172,7 \pm 7,6$ para a LNC-Br e $194,0 \pm 7,9$ para a LNC-TTN, e não apresentaram diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$, teste t). Os valores de *Span* indicam o intervalo de distribuição do tamanho das partículas da amostra, e foram de $1,7 \pm 0,1$ e $1,5 \pm 0,1$ para a LNC-TTN e para a LNC-Br, respectivamente, indicando uma distribuição estreita do tamanho das partículas dessas amostras. Na *Figura 2* é apresentado o perfil de distribuição do tamanho por volume das partículas da formulação LNC-TTN, obtida por difração de laser que demonstrou uma população monomodal, sem a presença de partículas micrométricas. Os dados discutidos acima demonstram a adequada otimização quali e quantitativa da formulação, assim como do processo de produção, levando à formação de partículas exclusivamente nanométricas.

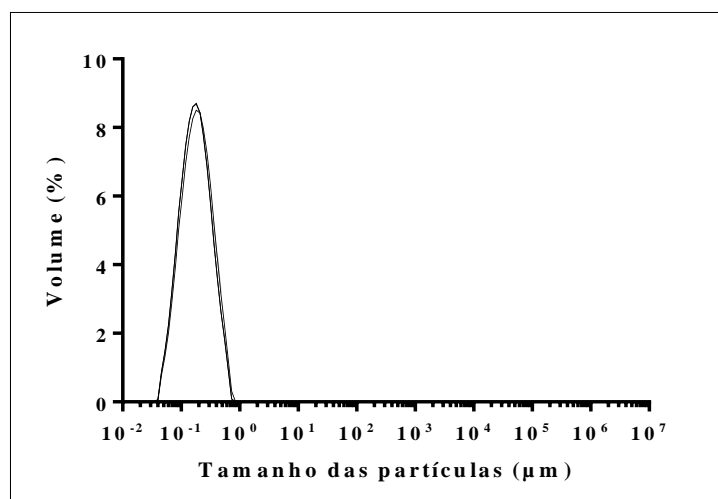


Figura 2 - Distribuição de tamanho por volume das partículas da amostra LNC-TTN, avaliada por difração de laser (n=3).

A distribuição de tamanho das partículas também foi avaliada por espalhamento de luz dinâmico. Nas *Figuras 3 e 4* estão apresentados os perfis de distribuição do tamanho das partículas da LNC-TTN por intensidade e por volume, respectivamente.

Essa técnica mede o movimento Browniano, iluminando as partículas e relacionando as flutuações na *intensidade* da luz espalhada com o seu tamanho. O movimento Browniano é gerado devido às colisões das partículas com as moléculas do líquido no qual estão dispersas, e é maior quanto menor forem as partículas. As distribuições de tamanho das partículas por *número* e por *volume* podem ser geradas a partir dos resultados obtidos originalmente por *intensidade*. Uma amostra contendo duas populações de partículas, em mesmo número, uma tendo partículas com tamanho de 5 nm e outra de 50 nm, apresentará uma distribuição para as duas populações nas proporções 1:1 por número, 1:1.000 por volume (o volume de uma esfera é igual a $\frac{4}{3}\pi(r)^3$) e 1:1.000.000 por intensidade (a intensidade da luz espalhada por uma partícula é proporcional à sexta potência do seu diâmetro) (Malvern Instruments, 2009).

A distribuição de tamanho das partículas é uma característica importante, e que pode causar grandes impactos na farmacocinética, na biodistribuição e na segurança do produto (DESAI, 2012). As partículas das formulações sem fármaco apresentaram diâmetro médio em torno de 190 nm, que não foi alterado quando a tretinoína foi adicionada. A presença de um único pico nos gráficos de distribuição do tamanho das

partículas por intensidade e por volume, e a estreita distribuição de tamanho (índice de polidispersão abaixo de 0,1) são características cruciais para a qualidade nanotecnológica da formulação (POLLETO e al., 2011).

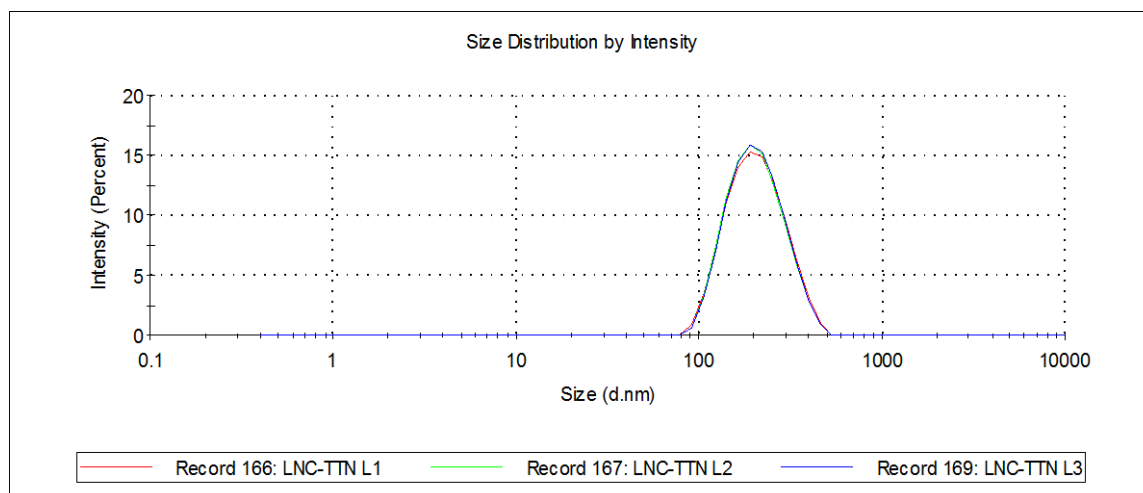


Figura 3 - Distribuição de tamanho das partículas da amostra LNC-TTN por intensidade, obtida pela técnica de espalhamento de luz dinâmico (n=3).

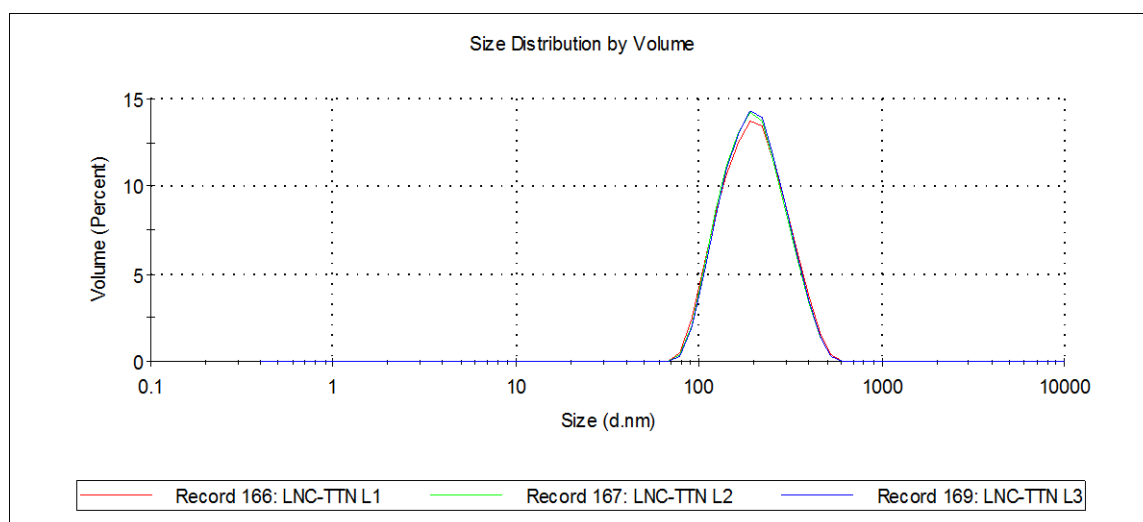


Figura 4 - Distribuição de tamanho das partículas da amostra LNC-TTN por volume, obtida pela técnica de espalhamento de luz dinâmico (n=3).

A eficiência de encapsulação obtida para as nanocápsulas contendo tretinoína foi de 98,5 %, indicando que uma grande quantidade do fármaco encontra-se associado às partículas. A concentração de tretinoína nas suspensões ficou próxima da teórica (0,25 mg/mL), concentração escolhida com base em testes preliminares realizados, que apontaram que suspensões produzidas com quantidade maior do fármaco (0,5 mg/mL)

apresentavam um perfil de distribuição de tamanho de partícula bimodal, provavelmente devido à limitação da solubilidade da tretinoína nos materiais que compõe o núcleo/parede das nanocápsulas.

As imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão das nanocápsulas de núcleo lipídico estão apresentadas na *Figura 5* e confirmam a presença de estruturas esféricas, similares entre si, com diâmetro próximo a 200 nm, nas formulações LNC-Br e LNC-TTN.

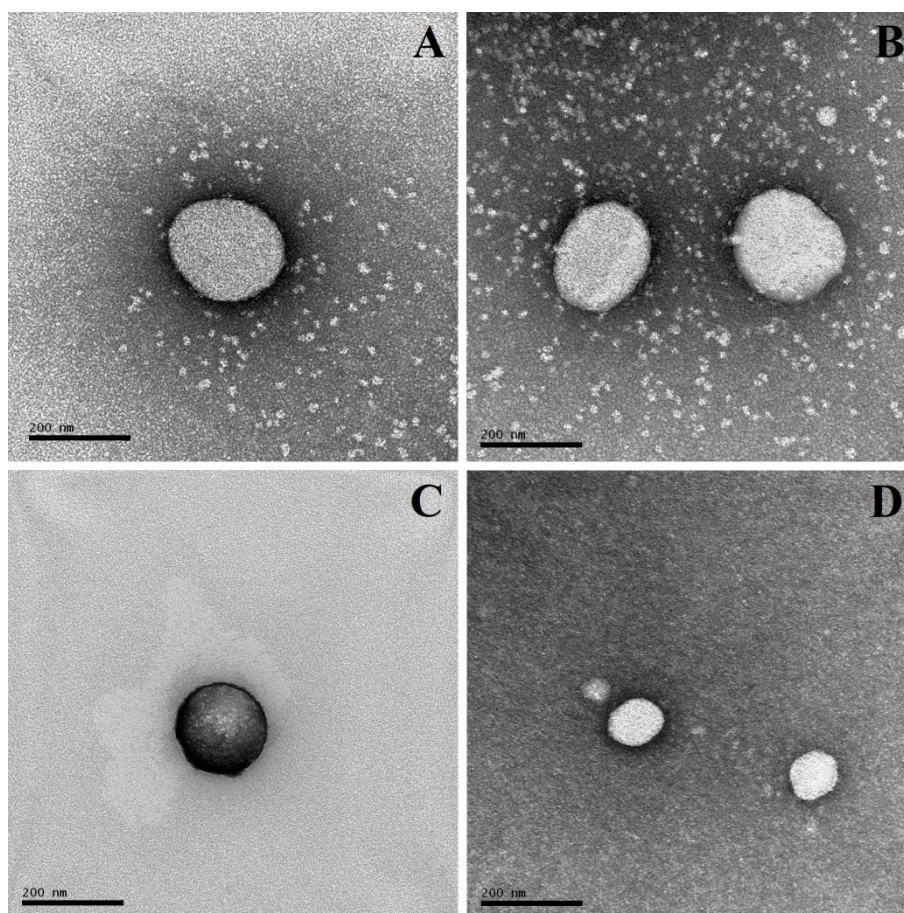


Figura 5 - Imagens obtidas pela análise por microscopia eletrônica de transmissão das formulações LNC-TTN (A e B) e LNC-Br (C e D) no aumento de 150.000 x.

Em relação à estabilidade física, apesar de o potencial zeta (ζ), próximo à neutralidade, não representar um fator preditivo da manutenção das nanopartículas em suspensão, devido à baixa repulsão eletrostática conferida, fatores estéricos resultantes da organização das cadeias de tensoativo (polissorbato 80) na superfície das nanopartículas podem o representar (VENTURINI et al., 2011). O pH levemente ácido

apresentado pelas suspensões, próximo a 6,5; é adequado para o uso tópico pretendido após a incorporação em forma semissólida, por ser próximo ao pH fisiológico da pele (SCHMID-WENDTNER et al., 2006).

5.1.2 Caracterização dos pós

Os dados de teor, rendimento, perda por dessecação, diâmetro médio por número, após redispersão em água, considerando 90% das partículas – $D(n\ 0,9)$ e diâmetro médio (d) dos pós obtidos pela secagem das suspensões de nanocápsulas contendo tretinoína (LNC-TTN-SD) e das suspensões de nanocápsulas brancas (LNC-Br-SD) estão apresentadas na *Tabela 4*.

Tabela 4 - Características físico-químicas dos pós LNC-Br-SD e LNC-TTN-SD obtidos por secagem por aspersão (n=3).

Formulação	Teor (mg/g)	Rendimento (%)	PD (%)	$D(n\ 0,9)$ (nm)	D (μm)
LNC-Br-SD	*	65,4±0,1	2,3±0,01	125,3±9,2	23,45±8,71
LNC-TTN-SD	1,68±0,02	72,6±0,1		125,7±2,9	21,18 ±6,92

PD = Perda por dessecação * Não se aplica

O teor obtido para os pós LNC-TTN-SD foi de 1,68±0,02 mg/g; que representa aproximadamente 92,4% da concentração teórica esperada (1,82 mg/g), indicando assim, pequena perda do fármaco durante o processo de secagem ou durante a preparação, o que é característico do método utilizado (SCHAFFAZICK et al., 2006). O rendimento em torno de 70% pode ser considerado alto em comparação aos rendimentos descritos na literatura, empregando-se o mesmo método (OURIQUE et al., 2011; HOFFMEISTER et al., 2012), e próximo àqueles obtidos utilizando somente a lactose como adjuvante (aproximadamente 80%).

Inicialmente, havia sido proposta a utilização de lactose 10% (m/v) como único adjuvante de secagem para as suspensões (LNC-TTN-SD-lac). Porém, os pós assim obtidos não apresentaram uma adequada redispersão das nanoestruturas quando em

contato com a água, servindo apenas como comparativo em algumas avaliações (Figuras 6).

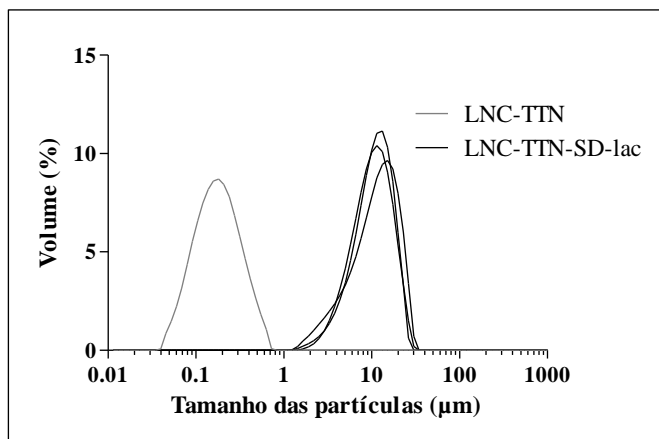


Figura 6 - Perfil de distribuição de tamanho das partículas por volume, avaliado por difração de laser, no tempo de 5 minutos, de amostras de pós contendo nanocápsulas de núcleo lipídico de tretinoína, obtidos utilizando lactose como suporte de secagem (LNC-TTN-SD-lac) (n=3) em comparação com o perfil de distribuição de tamanho das partículas por volume da LNC-TTN.

Em outros estudos (ABDELWAHED et al., 2006; KHO et al., 2010; LEBHARDT et al., 2011) verificou-se também que a secagem de suspensões de nanopartículas poliméricas, por liofilização ou por aspersão, empregando-se lactose como adjuvante não permitiu a redispersão das nanoestruturas em água a partir dos agregados formados, corroborando com o resultado encontrado neste trabalho. Kho e colaboradores (2010) justificaram tal comportamento pela elevada higroscopia da lactose, que leva ao aumento da coesividade entre as partículas.

A PVP vem sendo empregada como adjuvante de secagem para nanopartículas (poliméricas e lipídicas), tanto por liofilização (ABDELWAHED et al., 2006) quanto por aspersão (PELTONEN et al., 2010 e KHO et al., 2010; LEDET et al., 2015), e sua utilização tem possibilitado a recuperação do diâmetro nanométrico das partículas após a redispersão dos pós em água (ABDELWAHED et al., 2006; PELTONEN et al., 2010; KHO et al., 2010 e LEDET et al., 2015). Conforme Peltonen e colaboradores (2010), a PVP protege as nanopartículas pela formação de uma camada ao seu redor, que absorve a maior parte do calor gerado durante o processo de secagem.

A Figura 7 apresenta os perfis de distribuição do tamanho das partículas, obtidos por difração de laser, após a dispersão dos pós produzidos com a mistura de excipientes PVP e lactose (LNC-TTN-SD e LNC-Br-SD) em água. É possível observar que o uso da polivinilpirrolidona permitiu a obtenção de um produto com boa dispersão aquosa das nanopartículas a partir dos microaglomerados.

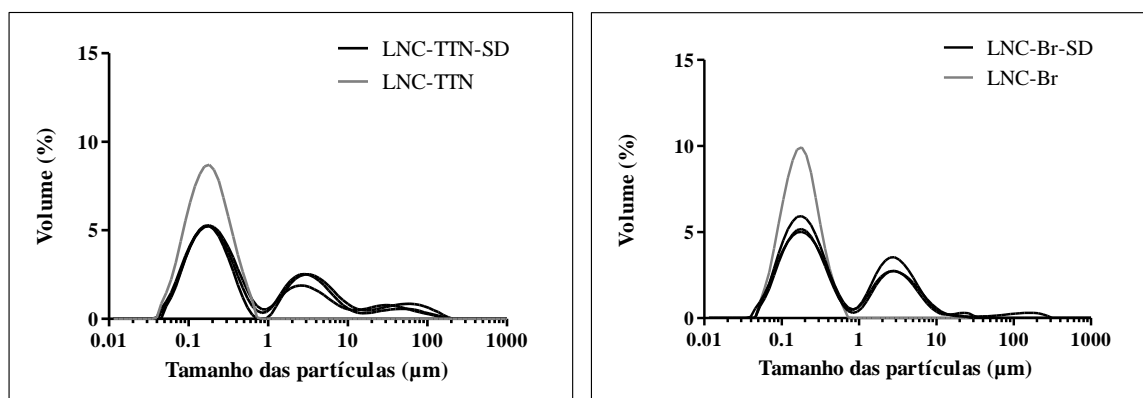


Figura 7 - Perfil de distribuição de tamanho das partículas dos pós LNC-TTN-SD e LNC-Br-SD após dispersão em água, no tempo de 5 minutos, avaliados por difração de laser ($n=3$), em comparação com o perfil de distribuição de tamanho das partículas da LNC-TTN.

O perfil de distribuição das partículas da LNC-TTN-SD, após contato com a água, indica a existência de três populações de partículas, sendo uma nanométrica (de tamanho aproximado ao da suspensão original) e outras duas micrométricas. Os perfis de distribuição de tamanho das partículas da LNC-TTN e de dispersão em água da LNC-TTN-SD foram obtidos a partir de análise por difração de laser, assim como os valores de $D(v\ 4,3)$ e $D(n\ 0,9)$. O equipamento fornece originalmente as medidas de diâmetro médio por volume (v), mas permite a conversão para diâmetro médio por número (n).

O valor de $D(v\ 4,3)$ para as partículas da LNC-TTN foi de $194,0 \pm 7,9$ nm, enquanto para as partículas da LNC-TTN-SD esse valor foi de $6,3 \pm 1,4$ µm. Um resultado expresso *por volume* indica o percentual do volume das partículas que estão em uma dada faixa de diâmetro em relação ao *volume* total ocupado por todas as partículas da amostra. Por outro lado, um resultado *por número* indica o percentual de partículas em uma dada faixa de diâmetro, em relação ao *número* total de partículas

(Malvern Instruments, 2004). Em uma população não homogênea, onde há a presença de algumas partículas com diâmetros muito maiores do que o tamanho médio apresentado pelas nanocápsulas, ocorre um grande aumento no diâmetro médio $D(v4,3)$ devido à presença dessas partículas muito maiores. Isso dificulta a visualização do diâmetro da população nanométrica presente nos pós e hidrogéis e sua respectiva comparação com a população original da suspensão de nanocápsulas. Por isso o $D(n 0,9)$ foi também utilizado. A partir dos valores de $D(n 0,9)$ é possível confirmar que a população nanométrica da amostra LNC-TTN-SD apresenta tamanho médio por número, que foi de 129 ± 8 nm, próximo ao obtido na suspensão de nanocápsulas original. Para melhor visualização dos resultados, o perfil de distribuição do tamanho das partículas por número LNC-TTN-SD, após dispersão em água da, é apresentado na *Figura 8*.

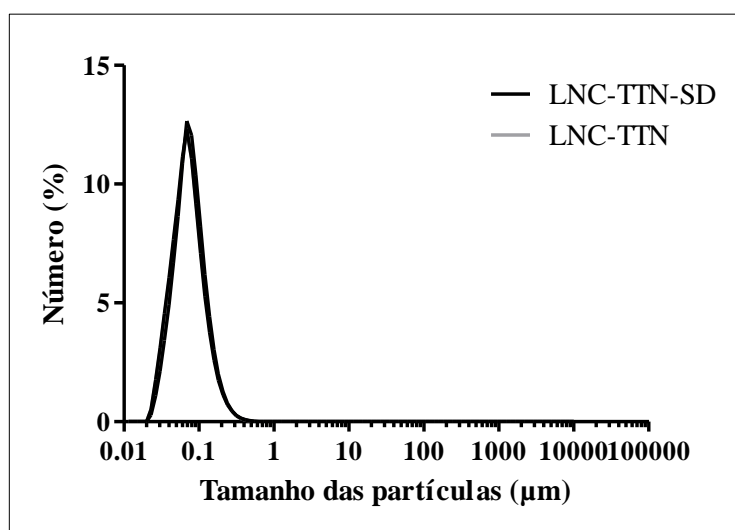


Figura 8 - Perfil de distribuição de tamanho das partículas da suspensão (LNC-TTN) e do pó (LNC-TTN-SD) por número, obtido por difração de laser ($n=3$).

A recuperação de partículas nanométricas, após contato dos pós com a água pode ter ocorrido devido a uma característica particular desses pós produzidos com a utilização dos adjuvantes polivinilpirrolidona e lactose. A presença de poros na superfície das partículas (*Figura 9*) pode facilitar o contato dos pós com a água e, conseqüentemente, o intumescimento das matrizes e desprendimento das nanocápsulas para o meio aquoso. Na presença apenas da lactose, essa dispersão e recuperação do

tamanho nanométrico ficou comprometida. Além disso, os pós produzidos com a mistura de excipientes (polivinilpirrolidona e lactose) também apresentaram maior facilidade de incorporação nos hidrogéis quando comparados aos pós produzidos utilizando somente lactose como adjuvante. Por somar as características de bons rendimentos (conferidos pela lactose) e capacidade de redispersão das nanoestruturas em água (conferida pelo PVP), a mistura de excipientes foi escolhida como adjuvante de secagem neste trabalho.

O diâmetro médio das partículas, analisado por microscopia eletrônica de varredura foi próximo a 25 μm para os pós contendo nanocápsulas e próximo a 13 μm para os pós contendo somente PVP e lactose (1:1). O baixo percentual de perda por dessecação, obtido por análise do pó em balança de infravermelho, permitiu confirmar a eficiência do processo de secagem. A obtenção de produtos com baixos teores de umidade, que possibilita um longo tempo de vida útil, é característica do método de secagem por aspersão (BECK et al., 2012). Os resultados apresentados demonstram a potencialidade de utilização da mistura de polivinilpirrolidona e lactose (1:1) a 10% (m/v) como adjuvante durante o processo de secagem por aspersão.

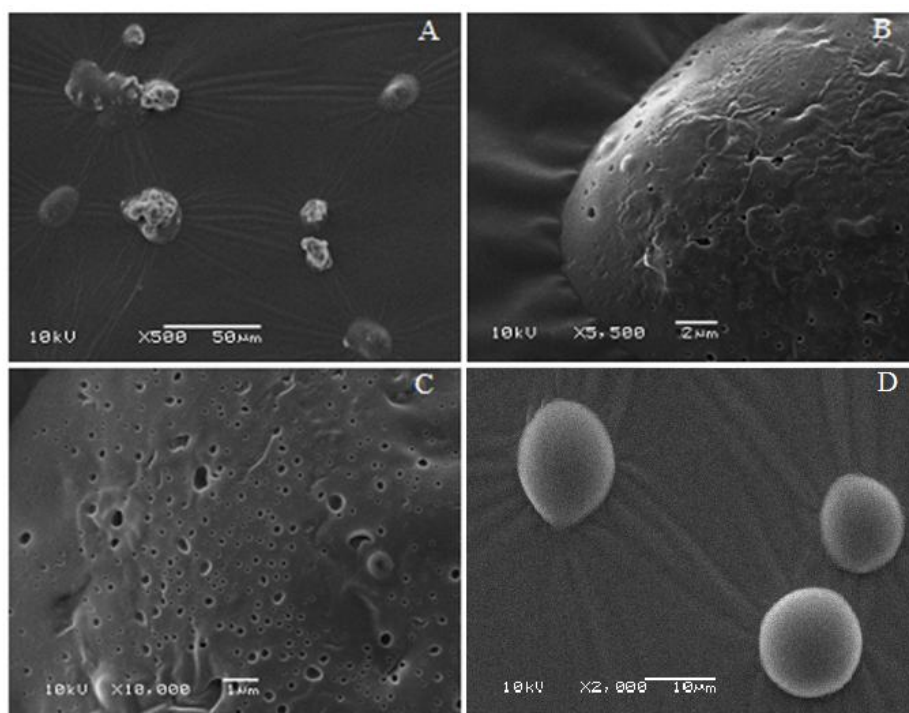


Figura 9 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura da LNC-TTN-SD, A – 500x; B – 5.000x; C – 10.000x; e do PVP-lac-SD, D – 2.000x.

5.1.3 Caracterização dos produtos semissólidos

A *Tabela 5* apresenta as características de teor, pH e diâmetro médio das partículas por volume – $D(v\ 4,3)$ e por número – $D(n\ 0,9)$ das formulações semissólidas desenvolvidas.

Tabela 5 - Características físico-químicas dos produtos semissólidos contendo tretinoína associada à nanocápsulas de núcleo lipídico (G-LNC-TTN), nanocápsulas brancas (G-LNC-Br), pós secos a partir de nanocápsulas de núcleo lipídico contendo ou não tretinoína (G-LNC-TTN-SD ou G-LNC-Br-SD, respectivamente) (n=3).

Formulação	Teor (mg/g)	pH	$D(v\ 4,3)$ (μm)	$D(n\ 0,9)$ (nm)
G-LNC-TTN	0,245±0,02	6,20±0,04	18,4±1,1	135,5±8,5
G-LNC-Br	*	6,70±0,02	13,7±1,3	137,3±9,0
G-LNC-TTN-SD	0,251±0,01	6,30±0,03	14,5±2,0	124,0±1,4
G-LNC-Br-SD	*	6,50±0,01	14,5±2,8	123,5±2,1

* não se aplica

Todas as formulações apresentaram concentração próxima à teórica com teores percentuais variando de 98% a 101%. O pH das formulações pode ser considerado apropriado para o uso tópico (SCHMID-WENDTNER et al., 2006). Tanto o pH, quanto a viscosidade das formulações semissólidas são fatores que podem influenciar na liberação e na interação das substâncias veiculadas com a pele. Em estudo realizado por Shin e colaboradores (2005) o aumento do pH de hidrogéis de Carbopol, em uma faixa de 5 a 8, levou a um aumento na taxa de liberação da tretinoína. Esse autor também demonstrou que hidrogéis de carbopol possuem maior viscosidade e bioadesão em pHs próximos à neutralidade. Portanto, é importante destacar que as formulações desenvolvidas neste estudo apresentaram valores de pH muito próximos, podendo-se descartar o seu efeito sobre os resultados a serem apresentados quanto aos estudos de permeação e penetração cutânea.

Em relação à viscosidade, os reogramas obtidos para as formulações desenvolvidas estão apresentados na *Figura 10*.

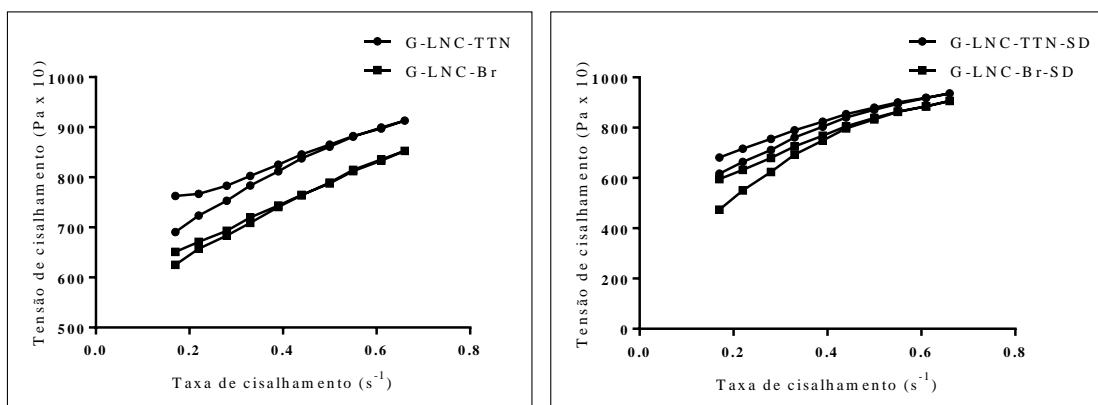


Figura 10 - Comportamento reológico das formulações semissólidas: G-LNC Br e G-LNC TTN, G-LNC Br SD e G-LNC TTN SD (n=3).

Todas as formulações avaliadas apresentaram comportamento não newtoniano, pois não houve relação linear entre os valores das tensões de cisalhamento e os valores das velocidades de cisalhamento. Modelos matemáticos que descrevem os fluxos plástico perfeito (Bingham), plástico (Casson), pseudoplástico (Ostwald) e pseudoplástico com valor de cedência (Hershel-Bulkley) foram aplicados aos perfis apresentados. Os coeficientes de correlação obtidos para estes modelos estão apresentados na *Tabela 6*.

Tabela 6 - Coeficientes de correlação referentes aos modelos que descrevem os perfis reológicos das formulações semissólidas G-LNC-Br, G-LNC-TTN, G-LNC-Br-SD e G-LNC-TTN-SD.

Formulação	Bingham	Casson	Ostwald	Hershel-Bulkley
G-LNC-Br	0,993±0,003	0,996±0,003	0,987±0,011	0,994±0,006
G-LNC-TTN	0,987±0,008	0,996±0,003	0,994±0,005	0,998±0,001
G-LNC-Br-SD	0,983±0,001	0,995±0,001	0,992±0,003	0,996±0,001
G-LNC-TTN-SD	0,993±0,001	0,996±0,003	0,988±0,008	0,988±0,011

O modelo de Hershel-Bulkley, que descreve o fluxo pseudoplástico com valor de cedência, foi o que melhor se adaptou aos perfis reológicos dos hidrogéis desenvolvidos. O coeficiente de regressão obtido para esse modelo foi de 0,998±0,001 e de 0,997±0,002 para as formulações G-LNC e G-LNC-SD, respectivamente.

Os fluidos pseudoplásticos com valor de cedência apresentam resistência para iniciar o fluxo quando baixas tensões de cisalhamento são aplicadas. A viscosidade desses fluidos diminui gradualmente com o aumento da tensão e, portanto, não possuem um único valor de viscosidade, sendo mais bem caracterizados por vários valores de viscosidade aparentes em pontos específicos da curva: taxa de cisalhamento *versus* tensão de cisalhamento (AULTON et al., 2013). A diminuição da viscosidade quando altas tensões de cisalhamento são aplicadas (aplicação na pele) permite que o produto possa cobrir a pele de forma uniforme (RIGO et al., 2011; ROSEN et al., 2005). Os adjuvantes de secagem utilizados não influenciaram no comportamento apresentado pelas formulações, considerando que não houve diferença entre as formulações preparadas com as suspensões de nanocápsulas e seus respectivos pós secos por aspersão. O perfil apresentado já foi descrito para hidrogéis de Carbopol Ultrez 10 NF contendo tretinoína associada à nanocápsulas de núcleo lipídico ou seus pós obtidos por secagem por aspersão, utilizando lactose como adjuvante (MARCHIORI et al., 2013).

Em relação aos parâmetros reológicos a partir da aplicação do modelo de Herschel-Bulkley, os géis preparados diretamente a partir das suspensões (G-LNC) e os géis preparados com os pós (G-LNC-SD) não apresentaram diferenças estatísticas significativas nos índices de fluxo e nos valores de cedência ($p > 0,05$, teste t). Entretanto, o índice de consistência (k) foi maior para a formulação G-LNC-SD ($96545 \pm 1974 \text{ mPa.s}$) que o calculado para a formulação G-LNC ($54406 \pm 5655 \text{ mPa.s}$) ($p < 0,05$, teste t). Os valores de k encontrados para as formulações G-LNC são condizentes com os valores encontrados por Marchiori e colaboradores (2013). Entretanto, naquele estudo, onde a lactose foi utilizada como adjuvante de secagem para as suspensões, apesar de ter sido observada uma tendência para o aumento do índice de consistência, não foram observadas diferenças significativas entre os valores comparando-se os hidrogéis produzidos com as suspensões e os hidrogéis produzidos com os pós. A diferença encontrada neste estudo pode ser relacionada à utilização da polivinilpirrolidona no nosso estudo, que pode agir também como um espessante (GODDARD, 1999).

Quanto à distribuição de tamanho das partículas após diluição dos hidrogéis em água, as formulações G-LNC-Br e G-LNC-TTN apresentaram perfis bimodais por volume, com uma população de partículas micrométrica e outra nanométrica. Os diâmetros nanométricos foram semelhantes às partículas da suspensão original (*Figura 12*), o que pode ser confirmado pela semelhança dos valores de $D(n\ 0,9)$ encontrados para essas formulações (entre 120 nm e 140 nm).

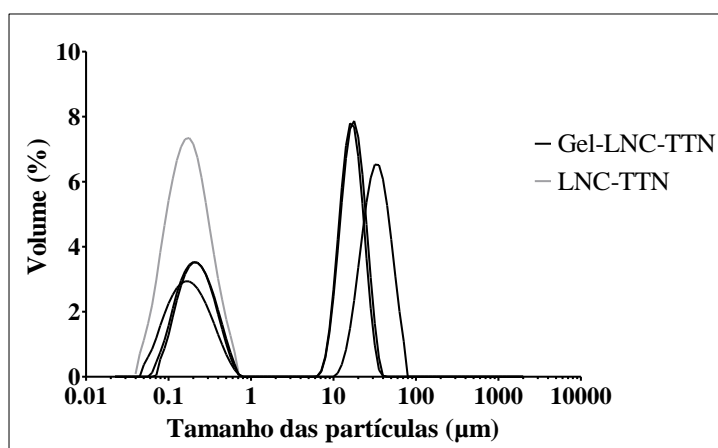


Figura 11 - Perfil de distribuição de tamanho das partículas por volume do G- LNC-TTN (linhas pretas) em comparação com o perfil de distribuição de tamanho das partículas por volume da LNC-TTN (linha cinza), obtidos por difração de laser.

Em contrapartida, as amostras dos hidrogéis produzidos com os pós secos por aspersão (LNC-Br-SD e LNC-TTN-SD) apresentaram, em um primeiro momento, um perfil monomodal com distribuição exclusivamente micrométrica. Somente após a diluição ser submetida a 20 minutos de ultrassom foi possível detectar a presença de partículas da população nanométrica original nessas formulações (*Figura 13*). Esse resultado indica que as nanopartículas, embora presentes nas formulações G-LNC-Br-SD e G-LNC-TTN-SD, estão retidas nos microaglomerados formados durante a secagem, independente da presença do fármaco.

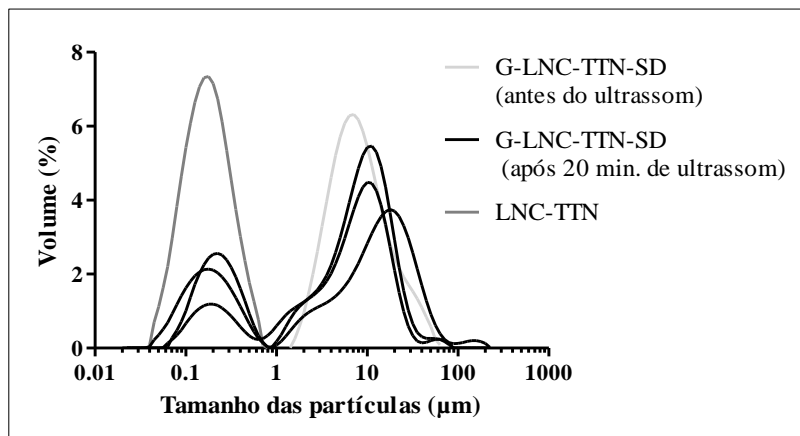


Figura 12 - Perfil de distribuição de tamanho das partículas por volume do G-LNC-TTN-SD antes do ultrassom (linha cinza clara), depois do ultrassom (linhas pretas) ($n=3$), em comparação com o perfil de distribuição de tamanho das partículas por volume da LNC-TTN (linha cinza escura).

Adicionalmente, as imagens de microscopia eletrônica de transmissão confirmaram a presença de estruturas com tamanho de aproximadamente 200 nm nos géis redispersos, com características semelhantes às nanocápsulas de núcleo lipídico da suspensão original, tanto para as formulações preparadas a partir da suspensão líquida (G-LNC-Br, G-LNC-TTN; *Figura 13*), quanto a partir dos pós secos por aspersão (G-LNC-Br-SD e G-LNC-TTN-SD; *Figura 14*).

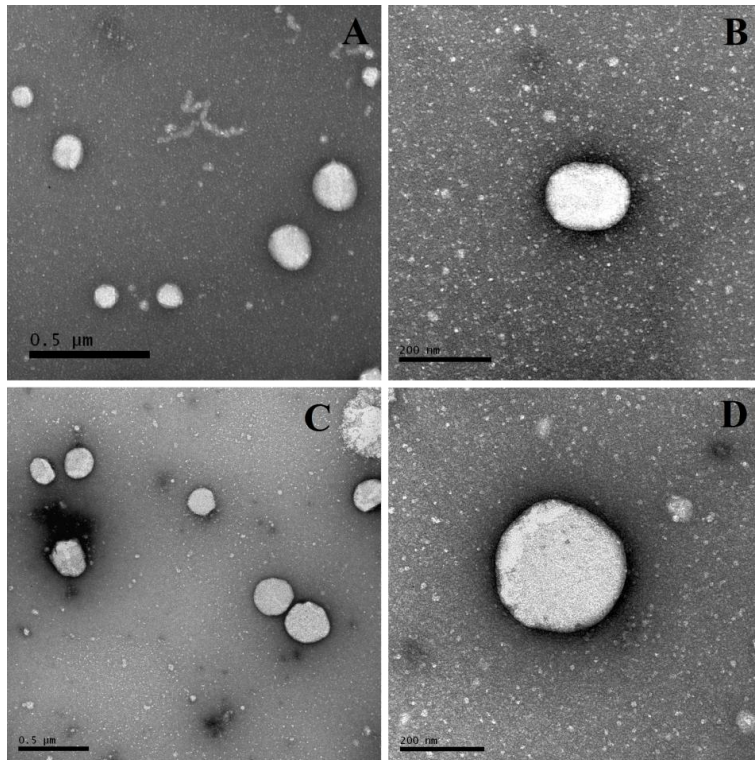


Figura 13 - Imagens de microscopia eletrônica de transmissão do G-LNC TTN (A e B) e G-LNC-Br (C e D) em aumentos de 50.000 x (A e C) e 150.000 x (B e D).

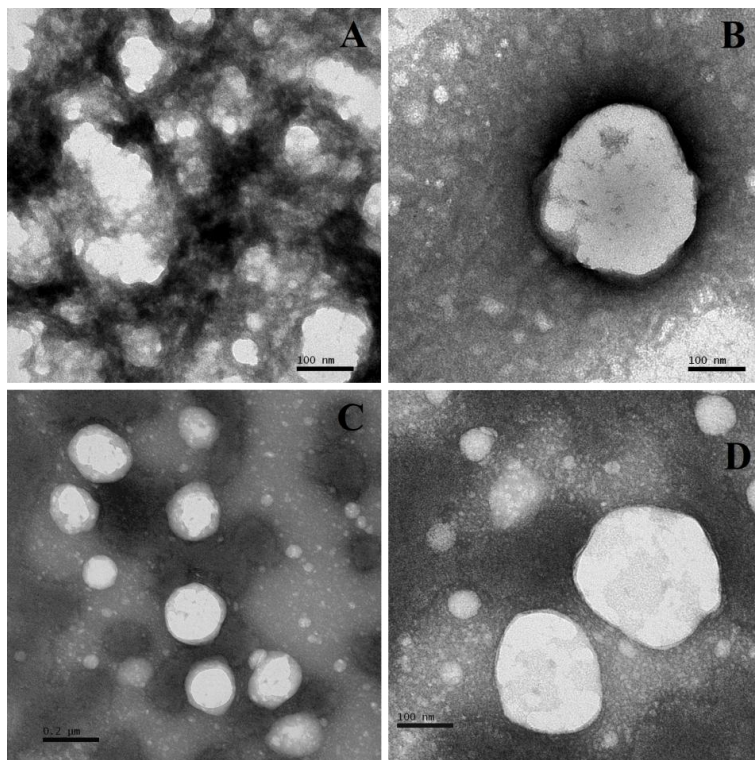


Figura 14- Imagens de microscopia eletrônica de transmissão do G-LNC-TTN-SD (A e B) e G-LNC-Br-SD (C e D). Em aumentos de 100.000 x (A e C) e 200.000 x (B e D).

O produto intermediário proposto (LNC-TTN-SD) mostrou-se adequado para a produção de hidrogéis contendo nanocápsulas de núcleo lipídico de tretinoína, considerando os resultados apresentados. Além disso, a presença de polivinilpirrolidona em sua composição é bastante atrativa para a incorporação em produtos semissólidos de uso dermatológico, pois proporciona umectação e brilho para a formulação, e ajuda a hidratar a pele (GODDARD, 1999). Polímeros de alto peso molecular, como a PVP, também são utilizados em formulações cosméticas por proporcionarem a suavização da pele e aumentarem sua rigidez, reduzindo linhas e rugas (JACHOWICZ et al., 2008). Ainda, conforme a *Cosmetic Ingredient Review* (CIR, 2015), a utilização da PVP em produtos cosméticos é considerada segura.

Em ciência da possibilidade do desenvolvimento de hidrogéis contendo nanocápsulas de núcleo lipídico de tretinoína, a partir das suspensões aquosas ou desidratadas, a questão central deste trabalho foi investigar o desempenho dessas formulações em relação à liberação e à permeação/penetração cutânea, considerando uma possível influência dos diferentes produtos intermediários empregados. Características como maior estabilidade físico-química, possibilidade de incorporação em diferentes formulações, diminuição dos custos de armazenamento e transporte e possibilidade de incorporação da tretinoína em bases hidrofílicas sem o uso de co-solventes, fazem do pó um produto intermediário com maior viabilidade do que a suspensão aquosa para produção de formulações semissólidas de uso dermatológico em escala industrial (MARCHIORI et al., 2013). Produtos comerciais contendo tretinoína nas formas de creme (Vitanol A[®]) e gel (Vitacid[®]), em mesma concentração dos produtos desenvolvidos, foram utilizados como comparativos nesses estudos, e tiveram suas características de teor, pH e viscosidade avaliadas.

O gel comercial (Vitacid[®]) apresentou um teor de $0,238 \pm 0,007$ mg/g, que corresponde a $95,3 \pm 3,1\%$ da concentração teórica, e um pH de $6,4 \pm 0,06$. O creme comercial (Vitanol A[®]) apresentou um teor de $0,246 \pm 0,004$ mg/g, que corresponde a $98,5 \pm 1,6\%$ da concentração teórica, e um pH de $7,0 \pm 0,20$. O comportamento reológico de ambas as formulações (*Figura 15*) foi mais bem ajustado pelo modelo de Casson, que caracteriza o fluxo plástico, com coeficiente de correlação de $0,989 \pm 0,212$ para o creme (Vitanol A[®]) e $0,990 \pm 0,636$ para o gel (Vitacid[®]).

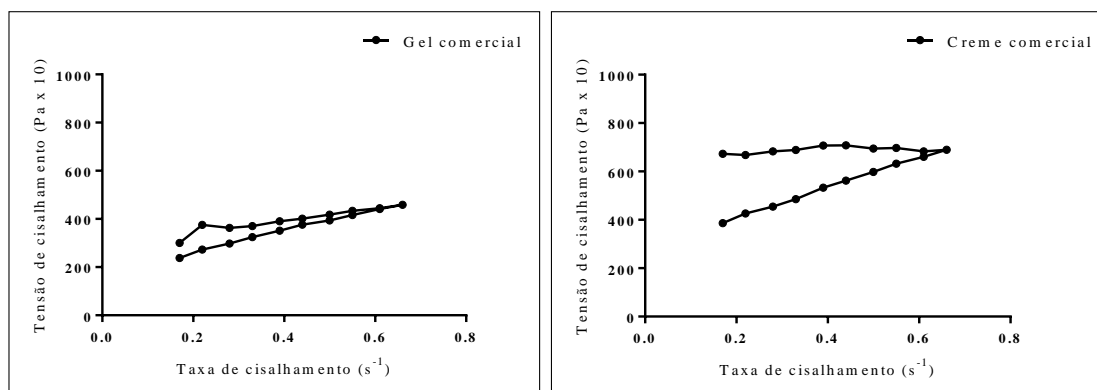


Figura 15 - Comportamento reológico das formulações semissólidas comerciais na forma de gel (Vitacid[®]) e creme (Vitanol[®]) (n=3).

Os fluidos com comportamento plástico são caracterizados por comportarem-se como sólidos em baixos cisalhamentos, começando a fluir somente depois da aplicação de uma determinada tensão de cisalhamento, denominada tensão limite de cisalhamento, e após ela, apresentam um comportamento linear (AULTON et al., 2013). Essas diferenças em relação ao comportamento reológico dos hidrogéis produzidos neste estudo já eram esperadas devido à variação na composição das formulações, porém todos os perfis encontrados são descritos para formulações semissólidas de uso dermatológico (PREET et al., 2013).

Para melhor comparação entre as formulações utilizadas nos estudos de liberação e penetração/permeação, na *Figura 16* apresentamos um gráfico da viscosidade (mPa.s) *versus* a taxa de cisalhamento (s^{-1}).

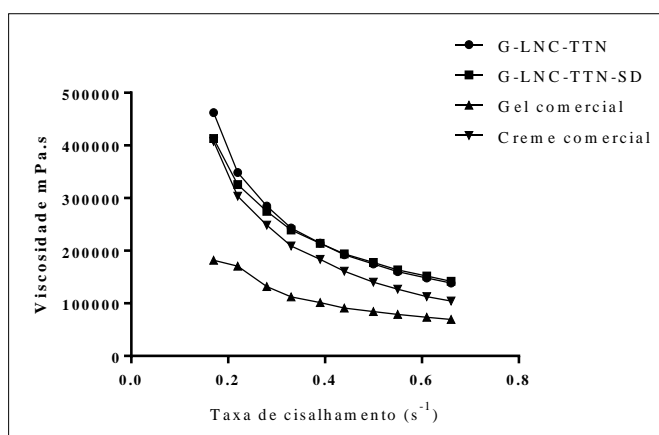


Figura 16 - Perfis de viscosidade *versus* taxa de cisalhamento para as formulações G-LNC-TTN, G-LNC-TTN-SD, gel comercial e creme comercial (n=3).

Como pode ser observado, as formulações desenvolvidas e o creme comercial apresentaram valores de viscosidade aparentemente próximos entre si, e maiores do que os valores apresentados para o gel comercial. Por exemplo, na taxa de cisalhamento de $0,44 \text{ s}^{-1}$ não foram observadas diferenças significativas entre os valores de viscosidade aparente para o G-LNC-TTN, o G-LNC-TTN-SD e o creme comercial ($192199 \pm 34562 \text{ mPa.s}$; $190439,4 \pm 23900,3 \text{ mPa.s}$ e $160885,7 \pm 9957,9 \text{ mPa.s}$, respectivamente), mas todas essas formulações diferiram significativamente do valor apresentado para o gel comercial ($91180,5 \pm 6238,7 \text{ mPa.s}$) (ANOVA, Teste de Tukey, $p \leq 0,05$).

5.2 Estudos de liberação *in vitro*

Os perfis de liberação da tretinoína a partir das formulações semissólidas contendo nanocápsulas de núcleo lipídico (G-LNC-TTN, G-LNC-TTN-SD) e das formulações comerciais na forma de gel (Vitacid®) e creme (Vitanol®) estão apresentados na *Figura 17*.

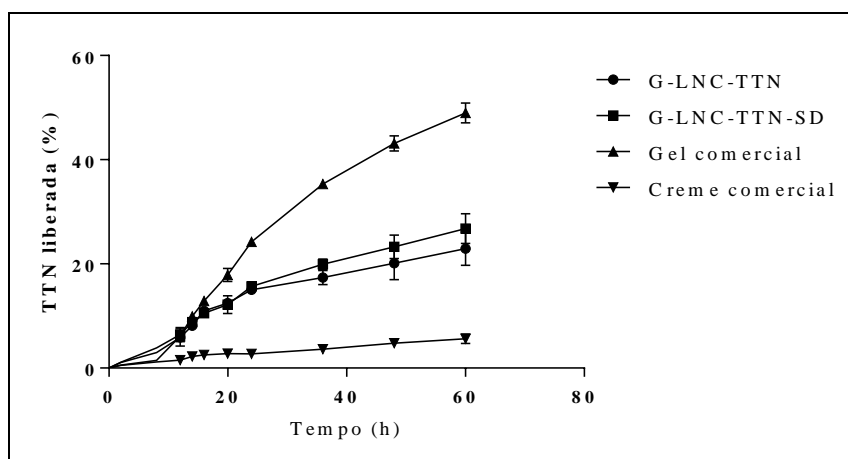


Figura 17 - Perfis de liberação *in vitro* da tretinoína a partir das formulações semissólidas contendo nanocápsulas de núcleo lipídico (G-LNC-TTN, G-LNC-TTN-SD), e das formulações comerciais na forma de gel (Vitacid®) e creme (Vitanol A®), avaliado em célula de Franz, empregando membranas de celulose de 10 kDa, meio receptor composto por PBS pH 7,4 e etanol (70:30), em temperatura de $37^{\circ}\text{C} \pm 1$ ($n=3$).

Os perfis de liberação obtidos para as formulações G-LNC-TTN e G-LNC-TTN-SD apresentaram comportamento logarítmico e melhor se ajustaram ao modelo

de Higuchi, com valor de R^2_{ajustado} de 0,945 e 0,974, respectivamente. Os tempos de latência foram de $6,09 \pm 1,03$ h e de $7,24 \pm 0,65$ h enquanto os valores de k (constante de liberação de Higuchi) foram de $3,108 \pm 0,127$ e $3,632 \pm 0,304$; para as formulações G-LNC-TTN e G-LNC-TTN-SD, respectivamente, não havendo diferenças para nenhum dos dois parâmetros (teste t, $p > 0,05$). Os fluxos médios de liberação (taxas de liberação) foram de $0,218 \pm 0,011$ $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ para a formulação G-LNC-TTN e $0,241 \pm 0,036$ $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ para a formulação G-LNC-TTN-SD, e também não apresentaram diferenças estatísticas significativas (teste t, $p > 0,05$).

O modelo de Higuchi descreve a liberação do fármaco como um processo baseado na lei de difusão de Fick e é aplicável a várias formas farmacêuticas de liberação modificada (COSTA, 2001). Os perfis apresentados são condizentes com os encontrados em outros estudos para formulações de hidrogéis contendo nanocápsulas de núcleo lipídico (FONTANA et al., 2011; HOFFMEISTER, 2012; MELERO et al., 2014). O tipo de produto intermediário utilizado (suspensões ou respectivos pós) não exerceu influência sobre o perfil de liberação de hidrogéis contendo nanocápsulas de núcleo lipídico de tretinoína, mostrando que o processo de secagem e os excipientes utilizados não prejudicam ou alteram as características de liberação que são associadas a formulações contendo nanocápsulas.

O perfil de liberação do gel comercial Vitacid[®] apresentou modelagem de primeira ordem, com $R^2_{\text{ajustado}} = 0,970$. Conforme o modelo, o tempo de latência para essa formulação foi de $4,43 \pm 0,04$ h, e o fluxo médio calculado foi de $0,508 \pm 0,017$ $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$, sendo o tempo de latência menor e o fluxo médio maior do que para o G-LNC-TTN e para o G-LNC-TTN-SD (teste t, $p < 0,05$). Porém, nos tempos de 12, 14 e 16 horas, a quantidade de tretinoína liberada foi similar à das formulações G-LNC-TTN e G-LNC-TTN-SD, não havendo diferenças entre os três (ANOVA, teste de Tukey, $p > 0,05$). O creme comercial Vitanol-A[®] apresentou perfil de liberação melhor ajustado pelo modelo de Weibull, $R^2_{\text{ajustado}} = 0,9731$, com comportamento parabólico (definido pelo valor de $b < 1$). O fluxo médio de liberação calculado para a formulação foi de $0,048 \pm 0,009$ $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$. Devido ao baixo fluxo médio de liberação, quando comparado aos fluxos apresentados pelas outras formulações avaliadas, é

possível identificar uma forte interação entre o fármaco e as substâncias que compõe a base deste produto.

5.3 Estudos de penetração/permeação cutânea

Os perfis de penetração da tretinoína no estrato córneo, na epiderme e na derme, a partir dos estudos com as formulações G-LNC-TTN, G-LNC-TTN-SD, gel comercial e creme comercial, estão apresentado nas *Figuras 18, 19 e 20* respectivamente. Os asteriscos indicam diferença estatística significativa entre as formulações, sendo $p < 0,05$ (*); $p < 0,01$ (**); $p < 0,001$ (***) ou $p < 0,0001$ (****).

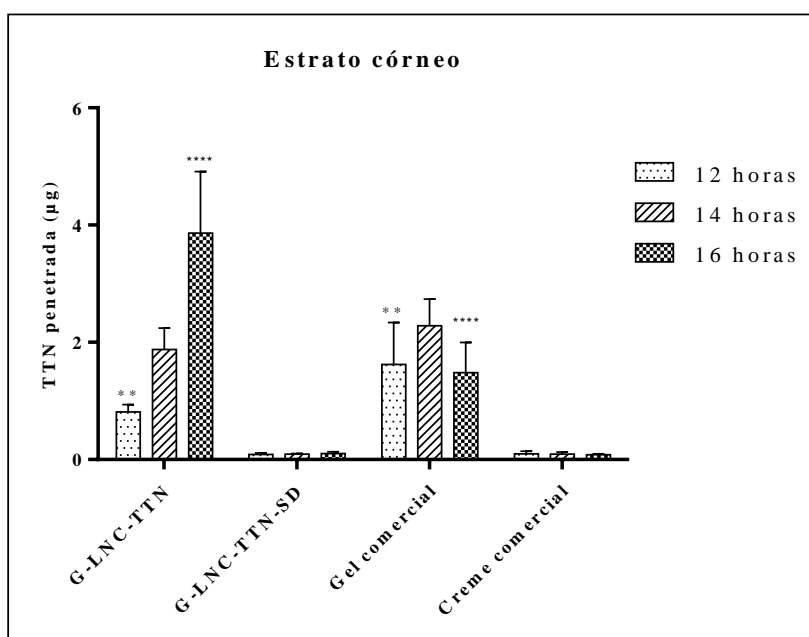


Figura 18 - Perfis de penetração da tretinoína no estrato córneo a partir das formulações G-LNC-TTN, G-LNC-TTN-SD (fora do LQ – limite de quantificação), gel comercial e creme comercial (fora do LQ), obtido por experimento *in vitro* realizado utilizando células de Franz, pele de abdome de porco como membrana, e meio receptor composto por PBS pH 7,4 e etanol (70:30), em temperatura de $37^{\circ}\text{C} \pm 1$ (n=6).

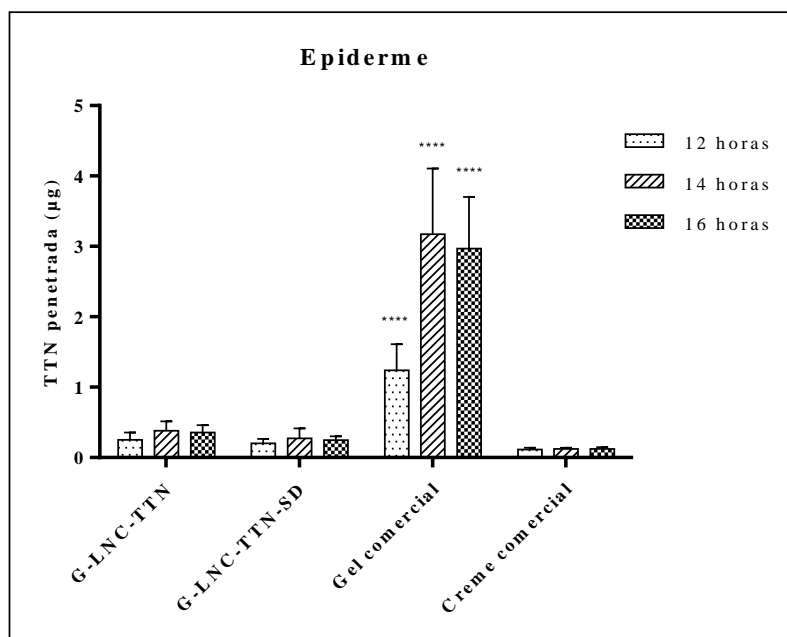


Figura 19 - Perfis de penetração da tretinoína na epiderme a partir das formulações G-LNC-TTN, G-LNC-TTN-SD, gel comercial e creme comercial, obtido por experimento *in vitro* realizado utilizando células de Franz, pele de abdome de porco como membrana, e meio receptor composto por PBS pH 7,4 e etanol (70:30), em temperatura de $37^{\circ}\text{C}\pm 1$ (n=6).

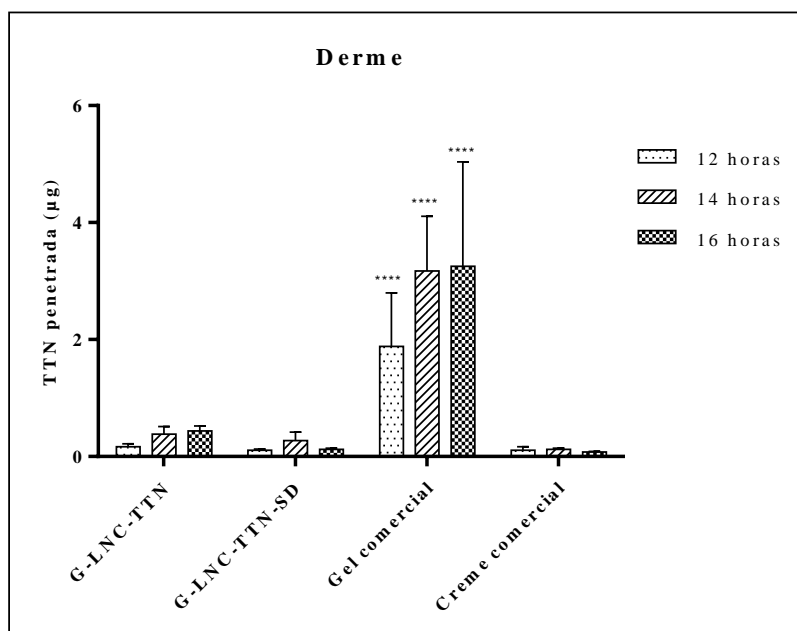


Figura 20 - Perfis de penetração da tretinoína na derme, a partir das formulações G-LNC-TTN, G-LNC-TTN-SD, gel comercial e creme comercial obtido por experimento *in vitro* realizado utilizando células de Franz, pele de abdome de porco como membrana, e meio receptor composto por PBS pH 7,4 e etanol (70:30), em temperatura de $37^{\circ}\text{C}\pm 1$ (n=6).

No estrato córneo, as quantidades de tretinoína penetradas (*Figura 18*) a partir da formulação G-LNC-TTN em 12 horas ($0,81 \pm 0,13 \mu\text{g}$), em 14 horas ($1,88 \pm 0,36 \mu\text{g}$) e em 16 horas ($3,86 \pm 1,05 \mu\text{g}$) foram maiores do que as quantidades penetradas a partir das formulações G-LNC-TTN-SD e creme comercial, para as quais esses valores foram abaixo do limite de quantificação (LQ) de $0,1 \mu\text{g/mL}$. Comparando-se o G-LNC-TTN com o gel comercial, as quantidades de tretinoína penetradas no estrato córneo em 14 horas foram semelhantes ($1,88 \pm 0,36 \mu\text{g}$ e $2,28 \pm 0,45 \mu\text{g}$, respectivamente), porém em 12 horas foram maiores para o gel comercial ($0,81 \pm 0,13 \mu\text{g}$ e $1,62 \pm 0,71 \mu\text{g}$, respectivamente) e em 16 horas para o G-LNC-TTN ($3,86 \pm 1,05 \mu\text{g}$ e $1,48 \pm 0,51 \mu\text{g}$, respectivamente) (ANOVA, teste de Tukey, $p \leq 0,05$). O fluxo médio da tretinoína da formulação para o estrato córneo foi de $0,420 \mu\text{g/cm}^2/\text{h}$ para o gel comercial e $0,416 \mu\text{g/cm}^2/\text{h}$ para o G-LNC-TTN-SD, considerando os mesmos tempos, sendo estatisticamente iguais (teste t, $p > 0,05$).

As quantidades de tretinoína permeadas para a epiderme (*Figura 19*) a partir das formulações G-LNC-TTN, G-LNC-TTN-SD e creme comercial em 12h ($0,25 \pm 0,10 \mu\text{g}$; $0,20 \pm 0,06 \mu\text{g}$ e $0,11 \pm 0,02 \mu\text{g}$, respectivamente), em 14h ($0,38 \pm 0,13 \mu\text{g}$; $0,27 \pm 0,14 \mu\text{g}$ e $0,12 \pm 0,018 \mu\text{g}$, respectivamente) e em 16 horas ($0,35 \pm 0,10 \mu\text{g}$; $0,25 \pm 0,05 \mu\text{g}$ e $0,12 \pm 0,02 \mu\text{g}$, respectivamente) (todas acima do LQ) não apresentaram diferenças estatísticas significativas entre si e foram estatisticamente menores do que as quantidades permeadas a partir do gel comercial nesses mesmos tempos ($1,24 \pm 0,37 \mu\text{g}$; $3,17 \pm 0,93 \mu\text{g}$ e $2,97 \pm 0,73 \mu\text{g}$, respectivamente) (ANOVA, teste de Tukey, $p \leq 0,05$).

Da mesma forma, as quantidades de tretinoína permeadas para a derme (*Figura 20*), a partir das formulações G-LNC-TTN, G-LNC-TTN-SD e creme comercial (todas abaixo do LQ) foram menores do que as quantidades de tretinoína permeadas a partir do gel comercial em 12, 14 e 16 horas ($1,88 \pm 0,92 \mu\text{g}$; $3,17 \pm 0,93 \mu\text{g}$ e $3,25 \pm 1,78 \mu\text{g}$, respectivamente) (ANOVA, teste de Tukey, $p \leq 0,05$).

Comparando-se os perfis de penetração/permeação cutânea da tretinoína a partir das formulações contendo nanocápsulas de núcleo lipídico (G-LNC-TTN e G-LNC-TTN-SD), a diferença nas quantidades penetradas no estrato córneo é notável, apesar da semelhança dos perfis nas demais camadas (epiderme e derme). Uma possível

explicação para isso relaciona-se à organização das nanocápsulas na matriz dos géis. As nanocápsulas possuem uma elevada área superficial, o que facilita o contato com a pele (BETTONI et al., 2012). Além disso, possuem afinidade pela superfície da epiderme e capacidade de deposição nos folículos pilosos (DE BRUM et al., 2015). Esses fatores justificam o acúmulo exponencial de tretinoína no estrato córneo, ao longo do tempo, a partir da formulação G-LNC-TTN. Na formulação G-LNC-TTN-SD, as nanopartículas estão presas a microaglomerados que possuem menor área superficial e superfície modificada, como discutido na análise granulométrica dos géis, e por esse motivo deixam de apresentar tais comportamentos. Dessa forma, se o local de ação da substância encapsulada fosse o estrato córneo, como no caso de fotoprotetores (POHLMANN et al., 2013), o tipo de produto intermediário utilizado poderia ter uma grande influência na efetividade da formulação final.

Formulações comerciais de tretinoína contendo o pré-polímero poli-2, em estudos pré-clínicos, promoveram a retenção do fármaco no estrato córneo, e diminuíram sua penetração parcial e cumulativa na pele. Em estudo clínico, essas formulações demonstraram maior tolerabilidade (diminuição do eritema e edema causados pela tretinoína) em comparação com uma formulação convencional, e a diminuição da irritação cutânea não levou à diminuição da efetividade do tratamento (QUIGLEY et al., 1998). Em nosso estudo, ambas as formulações desenvolvidas, G-LNC-TTN e G-LNC-TTN-SD, permitiram a chegada de pequenas e constantes quantidades de tretinoína na epiderme e na derme, o que pode contribuir para o aumento da tolerabilidade ao tratamento. Para nenhuma das duas formulações (G-LNC-TTN e G-LNC-TTN-SD) foi detectada a presença de tretinoína no compartimento receptor da célula de Franz, o que também representa um indicativo de seu baixo risco de absorção sistêmica a partir da aplicação cutânea (SCCS, 2010) das formulações desenvolvidas neste estudo. Porém, a efetividade e a segurança dessas formulações ainda devem ser avaliadas por meio de testes específicos.

Conforme já apresentado, realizamos também os mesmos estudos de penetração e permeação para os produtos comerciais na forma farmacêutica de gel e creme. Estes estudos foram conduzidos para comparação e para aprofundamento da discussão, visto que os comportamentos de liberação *in vitro* das formulações comerciais diferiram

completamente entre si, e também se comparados às formulações desenvolvidas no estudo, conforme anteriormente apresentado e discutido (*Figura 17*).

Os perfis de penetração da tretinoína no estrato córneo a partir do gel comercial e do G-LNC-TTN foram comparáveis. No entanto, as quantidades de tretinoína retida no estrato córneo foram exponenciais para o G-LNC-TTN ao longo do tempo, enquanto que para o gel comercial a permeação para a epiderme e a derme ocorreu rapidamente. Uma possível explicação para isso relaciona-se à presença de substâncias co-solventes como etanol e propilenoglicol no produto comercial. Essas substâncias podem causar alterações no estrato córneo, como a extração dos lipídios que o compõe, aumentando assim a penetração/permeação de substâncias, e também o potencial de irritação cutânea da formulação (ROSEN et al., 2005). Nos experimentos realizados com o gel comercial a tretinoína foi detectada no compartimento receptor da célula de Franz, porém em quantidades inferiores ao limite de quantificação do método empregado.

O perfil apresentado no estudo de penetração/permeação da tretinoína a partir do creme comercial Vitanol-A[®] foi bastante similar ao apresentado pela formulação G-LNC-TTN-SD (*Figuras 18, 19 e 20*) em todas as camadas da pele e tempos de experimento. Entretanto, assim como para o gel comercial, foi detectada a presença de fármaco no compartimento receptor, em concentração abaixo do limite de quantificação do método. No caso do creme comercial, a liberação da tretinoína da formulação, que é mais lenta do que para as outras formulações, como demonstrada nos estudos de liberação, parece ser um importante modulador da penetração. Apesar das grandes diferenças nos perfis de liberação e penetração/permeação neste trabalho, estudos clínicos já citados anteriormente mostram que géis e cremes, contendo a mesma concentração de tretinoína, podem apresentar efetividade clínica similar (WEBSTER et al., 2006; MAIA CAMPOS et al., 2015).

É importante destacar que, como a tretinoína é fotossensível (OURIQUE et al., 2011), sua detecção nas camadas da pele, em todos os estudos realizados, provavelmente apenas foi possível devido aos cuidados de proteção contra a luz que foram adotados. É possível também que, caso não houvessem tais cuidados, o fármaco liberado das formulações comerciais tivesse sofrido degradação química antes de

penetrar em determinada profundidade da pele. Conforme descrito anteriormente, os produtos gerados pela degradação da tretinoína não possuem a efetividade inicial e contribuem para o desenvolvimento de reações adversas (KIRCIK, 2014). A fotoproteção reconhecidamente conferida pelas formulações contendo nanocápsulas (OURIQUE et al., 2011) pode ter sido subestimada, neste estudo, como um fator regulador da chegada da tretinoína não degradada na epiderme e na derme. Em situações reais de exposição, a aplicação noturna e o uso de fotoprotetores são recomendados durante a terapia com tretinoína (ASCENSO et al., 2014b).

Para a formulação G-LNC-TTN, as nanopartículas podem ficar depositadas nos folículos pilosos e se não forem removidas com a produção de sebo e crescimento dos pelos, podem continuar liberando substância ativa não degradada por longos períodos (GLÓWKA et al., 2014). Além disso, a vetorização para os folículos pilosos pode contribuir para o tratamento de doenças como a acne (RANCAN et al., 2014).

Finalmente, é importante dizer que, para as formulações G-LNC-TTN e G-LNC-TTN-SD, a incorporação da tretinoína, de natureza lipofílica, nos géis hidrofílicos desenvolvidos se deu sem a adição de substâncias que causam prejuízo à camada córnea, permitindo a obtenção de um produto não oleoso, com capacidade de regular a penetração da tretinoína na pele e protegê-la contra fotodegradação durante o armazenamento e após a aplicação. Nesse sentido, a LNC-TTN-SD parece ser um produto intermediário potencial para a produção de formas farmacêuticas semissólidas contendo tretinoína, e sua comercialização permitiria a utilização da tecnologia agregada em diversos produtos, sem que as indústrias necessariamente disponham de infraestrutura para a produção das nanocápsulas, mas pudessem adquirir os pós como produtos intermediários.

6 CONCLUSÕES

A secagem por aspersão de suspensões de nanocápsulas de núcleo lipídico contendo tretinoína, empregando como adjuvantes a mistura de PVP e lactose (1:1m/m), em concentração de 10% (m/v), levou à obtenção de pós com boas características de dispersão em água. Amostras avaliadas por difração de laser apresentaram diâmetro por número próximo ao da suspensão original, considerando-se 90% das partículas ($D(0,9)$). Além disso, os pós apresentaram bons rendimentos (aproximadamente 70%), baixo teor de substâncias voláteis, e teores de tretinoína acima de 92%.

Os hidrogéis produzidos com as suspensões (G-LNC-TTN) ou com os respectivos pós (G-LNC-TTN-SD) apresentaram características adequadas para a utilização dermatológica. Os perfis reológicos foram semelhantes para as duas formulações, com comportamento pseudoplástico, apesar do pequeno aumento da viscosidade observado para o G-LNC-TTN-SD. Em análise por difração de laser, amostras diluídas do G-LNC-TTN demonstraram perfil bimodal por volume e diâmetro (por número) semelhante ao da suspensão inicial, considerando-se 90% das partículas ($D(0,9)$). Amostras diluídas do G-LNC-TTN-SD apresentaram perfil monomodal de distribuição de tamanho das partículas, exclusivamente micrométrico, sem nenhuma semelhança na distribuição de tamanho das partículas com a suspensão inicial. Somente após a submissão ao ultrassom, de tais amostras diluídas, ocorreu o desprendimento das nanocápsulas dos microaglomerados formados na secagem, e o diâmetro por número obtido foi novamente próximo ao da suspensão inicial, considerando-se 90% das partículas ($D(0,9)$).

O tipo de produto intermediário (suspensão aquosa ou respectivo pó) utilizado na produção dos hidrogéis contendo nanocápsulas de núcleo lipídico não influenciou no perfil de liberação *in vitro* da tretinoína, que se ajustou ao modelo de Higuchi, em conformidade com o descrito na literatura para formulações similares.

Nos estudos de penetração cutânea realizados foram obtidos perfis diferentes de penetração do fármaco no estrato córneo, dependendo do tipo de produto intermediário utilizado. A partir do G-LNC-TTN, maiores quantidades de tretinoína foram

detectadas no estrato córneo em todos os tempos do experimento. Esse comportamento foi associado às diferenças na organização das nanocápsulas na matriz dos géis, quando os diferentes produtos intermediários são utilizados. Ambas as formulações permitiram a chegada de pequenas e constantes quantidades de fármaco na epiderme e na derme. No meio receptor não foi detectada tretinoína para nenhuma das formulações produzidas.

A pequena permeação do fármaco para as camadas mais profundas da pele e para o meio receptor são indicativos de uma baixa absorção sistêmica da tretinoína a partir da aplicação tópica das formulações desenvolvidas. Além disso, a menor penetração/permeação na pele, aliada à proteção contra fotodegradação, verificada em trabalhos anteriores do grupo de pesquisa, podem contribuir na redução dos efeitos adversos relacionados com o uso tópico da tretinoína.

A incorporação da tretinoína em hidrogel, para essas formulações, foi realizada sem a adição de substâncias co-solventes, causadoras de prejuízos ao estrato córneo. Isso permite a obtenção de um produto não oleoso, com capacidade de regular a penetração da tretinoína na pele e de protegê-la contra fotodegradação, durante o armazenamento e após a aplicação. A avaliação da efetividade e segurança desses produtos deve ser feita por meio de estudos específicos.

A secagem das suspensões de nanocápsulas de núcleo lipídico por aspersão, empregando PVP e lactose (1:1) a 10% como adjuvantes, forneceu um potencial intermediário para a produção de formas farmacêuticas semissólidas. Sua comercialização permitiria a utilização da tecnologia agregada, sem que necessariamente as indústrias responsáveis pelos produtos finais disponham de infraestrutura para a produção de nanopartículas.

7 REFERÊNCIAS

ABDELWAHED, W.; DEGOBERT, G.; FESSI, H. A pilot study of freeze drying of poly (epsilon-caprolactone) nanocapsules stabilized by poly (vinyl alcohol): formulation and process optimization. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 309, n. 1, p. 178-188, 2006.

AGRAWAL, U.; GUPTA, M.; VYAS, S. P. Capsaicin delivery into the skin with lipidic nanoparticles for the treatment of psoriasis. **Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology**, v. 43, n. 1, p. 33-39, 2015.

ALVAREZ-ROMÁN, R. et al. Skin penetration and distribution of polymeric nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, v. 99, n. 1, p. 53-62, 2004.

ASCENSO, A. et al. In vitro and in vivo topical delivery studies of tretinoin-loaded ultradeformable vesicles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 2014a.

ASCENSO, A. et al. Is tretinoin still a key agent for photoaging management? **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 8, p. 629-641, 2014b.

AULTON, Michael E.; TAYLOR, Kevin MG. **Aulton's pharmaceutics: the design and manufacture of medicines**. Elsevier Health Sciences, 2013.

BARTH, A. B. et al. A simple and rapid method to assess butenafine hydrochloride in skin samples and a comparative cutaneous retention study of two marketed formulations. **Biomedical Chromatography**, v. 25, n. 10, p. 1132-1137, 2011.

BATHEJA, P. et al. Topical drug delivery by a polymeric nanosphere gel: Formulation optimization and in vitro and in vivo skin distribution studies. **Journal of Controlled Release**, v. 149, n. 2, p. 159-167, 2011.

BECK, R. C. R. et al. Dexamethasone-loaded nanoparticle-coated microparticles: Correlation between in vitro drug release and drug transport across Caco-2 cell monolayers. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 67, n. 1, p. 18-30, 2007.

BECK, R. C. R. et al. Nanoparticle-coated organic-inorganic microparticles: experimental design and gastrointestinal tolerance evaluation. **Química Nova**, v. 29, n. 5, p. 990-996, 2006.

BECK, R. C. R. et al. Spray-dried polymeric nanoparticles for pharmaceutics: A review of patents. **Recent Patents on Drug Delivery and Formulation**, v. 6, n. 3, p. 195-208, 2012.

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

BETTONI, C. C. et al. Isotretinoin-loaded nanocapsules: stability and cutaneous penetration by tape stripping in human and pig skin. **J Biomed Nanotechnol**, v. 8, n. 2, p. 258-71, 2012.

BOLZINGER, M. A. et al. Penetration of drugs through skin, a complex rate-controlling membrane. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 17, n. 3, p. 156-165, 2012.

BOLZINGER, M. A., BRIANÇON, S., & CHEVALIER, Y. Nanoparticles through the skin: managing conflicting results of inorganic and organic particles in cosmetics and pharmaceuticals. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology**, n.3 v.5, p. 463-478, 2011.

BRISAERT, M. et al. Liposomes with tretinoin: A physical and chemical evaluation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 26, n. 5-6, p. 909-917, 2001.

CASTRO, G. A. et al. Comedolytic effect and reduced skin irritation of a new formulation of all-trans retinoic acid-loaded solid lipid nanoparticles for topical treatment of acne. **Archives of Dermatological Research**, v. 303, n. 7, p. 513-520, 2011.

CONTRI, R. V. et al. Combined effect of polymeric nanocapsules and chitosan hydrogel on the increase of capsaicinoids adhesion to the skin surface. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 10, n. 5, p. 820-830, 2014a.

CONTRI, R. V. et al. The use of nanoencapsulation to decrease human skin irritation caused by capsaicinoids. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, n. 1, p. 951-962, 2014b.

CONTRI, R. V. et al. Transport of substances and nanoparticles across the skin and in vitro models to evaluate skin permeation and/or penetration. In: (Ed.). *Nanocosmetics and Nanomedicines*: Springer, 2011. p.3-35.

COSTA, P.; SOUSA LOBO, J. M. Modeling and comparison of dissolution profiles. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 13, n. 2, p. 123-133, 2001.

DA SILVA, A. L. M. et al. Vitamin K1-loaded lipid-core nanocapsules: Physicochemical characterization and in vitro skin permeation. **Skin Research and Technology**, v. 19, n. 1, p. e223-e230, 2013.

DE ANDRADE, D. F. et al. Nanoencapsulation of clobetasol propionate decreases its penetration to skin layers without changing its relative skin distribution. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 15, n. 1, p. 875-879, 2015.

DE BRUM, T. L. et al. Polymeric nanocapsules and lipid-core nanocapsules have diverse skin penetration. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 15, n. 1, p. 773-780, 2015.

DESAI, P.; PATLOLLA, R. R.; SINGH, M. Interaction of nanoparticles and cell-penetrating peptides with skin for transdermal drug delivery. **Molecular Membrane Biology**, v. 27, n. 7, p. 247-259, 2010.

FONTANA, M. C. et al. Improved efficacy in the treatment of contact dermatitis in rats by a dermatological nanomedicine containing clobetasol propionate. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 79, n. 2, p. 241-249, 2011.

FÖRSTER, M. et al. Topical delivery of cosmetics and drugs. Molecular aspects of percutaneous absorption and delivery. **European Journal of Dermatology**, v. 19, n. 4, p. 309-323, 2009.

GLÓWKA, E. et al. Polymeric nanoparticles-embedded organogel for roxithromycin delivery to hair follicles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 88, n. 1, p. 75-84, 2014.

GODDARD, E. D.; GRUBER, J. V. Principles of polymer science and technology in cosmetics and personal care. CRC Press, 1999.

GUTERRES, S. S.; ALVES, M. P.; POHLMANN, A. R. Polymeric Nanoparticles, Nanospheres and Nanocapsules, for Cutaneous Applications. **Drug Target Insights**, v. 2, n. DTI-2-Guterres-et-al, p. 147-157, 2007.

GUTERRES, S. S.; BECK, R. C. R.; POHLMANN, A. R. Spray-drying technique to prepare innovative nanoparticulated formulations for drug administration: A brief overview. **Brazilian Journal of Physics**, v. 39, n. 1A, p. 205-209, 2009.

HASLER-NGUYEN, N.; FOTOPOULOS, G. Effect of rubbing on the in vitro skin permeation of diclofenac- diethylamine 1.16% gel. **BMC Research Notes**, v. 5, 2012.

HOFFMEISTER, C. R. D. et al. Hydrogels containing redispersible spray-dried melatonin-loaded nanocapsules: A formulation for transdermal-controlled delivery. **Nanoscale Research Letters**, v. 7, p. 1-24, 2012.

INSTRUMENTS, L. M. **Mastersizer 2000 User Manual**. United Kingdom, 2004.

INSTRUMENTS, M. **Zetasizer nano series user manual**. Worcestershire: Malvern Instruments Ltd, 2009.

JACHOWICZ, J., MCMULLEN, R., & PRETTYPAUL. Alteration of skin mechanics by thin polymer films. **Skin Research and Technology**, v. 14, n. 3, p. 312-319, 2008.

JÄGER, E. et al. Sustained release from lipid-core nanocapsules by varying the core viscosity and the particle surface area. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 5, n. 1, p. 130-140, 2009.

KHO, K., CHEOW, W. S., LIE, R. H., & HADINOTO, K. Aqueous re-dispersibility of spray-dried antibiotic-loaded polycaprolactone nanoparticle aggregates for inhaled anti-biofilm therapy. **Powder Technology**, v. 203, n. 3, p. 432-439, 2010.

KIELHORN, J.; MELCHING-KOLLMUSS, S.; MANGELSDORF, I. **Dermal Absorption, Environmental Health Criteria 235**: World Health Organization 2006.

KIM, G. B.; HYUN, J. M.; KWAK, H. S. Transient buoyant convection of a power-law non-Newtonian fluid in an enclosure. **International journal of heat and mass transfer**, v. 46, n. 19, p. 3605-3617, 2003.

KIRCIK, L. H. Evaluating tretinoin formulations in the treatment of acne. **Journal of Drugs in Dermatology**, v. 13, n. 4, p. 466-470, 2014.

LEBHARDT, T., ROESLER, S., UUSITALO, H. P., & KISSEL, T. Surfactant-free redispersible nanoparticles in fast-dissolving composite microcarriers for dry-powder inhalation. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 78, n. 1, p. 90-96, 2011.

LEDET, G. A., GRAVES, R. A., GLOTZER, E. Y., MANDAL, T. K., & BOSTANIAN, L. A. Preparation and in vitro evaluation of hydrophilic fenretinide nanoparticles. **International journal of pharmaceutics**, v. 479, n. 2, p. 329-337, 2015.

LEE, W. R. et al. Fractional laser as a tool to enhance the skin permeation of 5-aminolevulinic acid with minimal skin disruption: A comparison with conventional erbium:YAG laser. **Journal of Controlled Release**, v. 145, n. 2, p. 124-133, 2010.

LEHMAN, P. A.; FRANZ, T. J. Assessing the bioequivalence of topical retinoid products by pharmacodynamic assay. **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 25, n. 5, p. 269-280, 2012.

LEHMAN, P. A.; SLATTERY, J. T.; FRANZ, T. J. Percutaneous absorption of retinoids: Influence of vehicle, light exposure, and dose. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 91, n. 1, p. 62-68, 1988.

MAIA CAMPOS, P. M. B. G., GASPAR, L. R., GONÇALVES, G. M. S., PEREIRA, L. H. T. R., SEMPRINI, M., & LOPES, R. A. Comparative Effects of Retinoic Acid or Glycolic Acid Vehiculated in Different Topical Formulations. **BioMed Research International**, v. 2015, 2015.

MANCONI, M. et al. Niosomes as carriers for tretinoin: III. A study into the in vitro cutaneous delivery of vesicle-incorporated tretinoin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 311, n. 1-2, p. 11-19, 2006.

MANCONI, M. et al. Penetration enhancer containing vesicles as carriers for dermal delivery of tretinoin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 412, n. 1-2, p. 37-46, 2011.

MARCHIORI, M. C. et al. Improved tretinoin photostability in a topical nanomedicine replacing original liquid suspension with spray-dried powder with no loss of effectiveness. **Drug Dev Ind Pharm**, v. 39, n. 4, p. 579-86, 2013.

MARCHIORI, M. C. L. et al. Spray-dried powders containing tretinoin-loaded engineered lipid-core nanocapsules: Development and photostability study. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 12, n. 3, p. 2059-2067, 2012.

MAYNARD, A. D. *Nanotechnology: A Research Strategy for Addressing Risk* 2006.

MELERO, A. et al. Nanoencapsulation in lipid-core nanocapsules controls mometasone furoate skin permeability rate and its penetration to the deeper skin layers. **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 27, n. 4, p. 217-228, 2014.

MIQUEL-JEANJEAN, C., CRÉPEL, F., RAUFAST, V., PAYRE, B., DATAS, L., BESSOU-TOUYA, S., & DUPLAN, H. Penetration Study of Formulated Nanosized Titanium Dioxide in Models of Damaged and Sun-Irradiated Skins. **Photochemistry and photobiology**, v. 88, n. 6, p. 1513-1521, 2012.

MITTAL, A. et al. Efficient nanoparticle-mediated needle-free transcutaneous vaccination via hair follicles requires adjuvantation. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 11, n. 1, p. 147-154, 2015.

MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 385, n. 1-2, p. 113-142, 2010.

MÜLLER, C. R. et al. Preparation and characterization of spray-dried polymeric nanocapsules. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 26, n. 3, p. 343-347, 2000.

MURA, P. et al. Development of liposomal and microemulsion formulations for transdermal delivery of clonazepam: Effect of randomly methylated β -cyclodextrin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 475, n. 1, p. e306-e314, 2014.

MURTHY, S. N. *Dermatokinetics of Therapeutic Agents*. CRC Press, 2011.

NAIR, B. Final report on the safety assessment of polyvinylpyrrolidone (PVP). **International Journal of Toxicology**, v. 17, n. SUPPL. 4, p. 95-130, 1998.

OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development). **Series on Testing and Assessment No. 156: Guidance Notes On Dermal Absorption**, 2011.

OKONOGI, S.; RIANGJANAPATEE, P. Physicochemical characterization of lycopene-loaded nanostructured lipid carrier formulations for topical administration. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 478, n. 2, p. 726-735, 2015.

OLIVEIRA, D. **Influência da adição de um insumo nanoestruturado comercial em formulações semissólidas contendo tretinoína: caracterização e estudo da permeação/retenção cutânea**. Dissertação, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) Porto Alegre, RS, 2013.

OURIQUE, A. F. et al. Improved photostability and reduced skin permeation of tretinoin: Development of a semisolid nanomedicine. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 79, n. 1, p. 95-101, 2011.

OURIQUE, A. F. et al. Lipid-core nanocapsules as a nanomedicine for parenteral administration of tretinoin: Development and in vitro antitumor activity on human myeloid leukemia cells. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 6, n. 3, p. 214-223, 2010.

OURIQUE, A. F. et al. Tretinoin-loaded nanocapsules: Preparation, physicochemical characterization, and photostability study. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 352, n. 1-2, p. 1-4, 2008.

PELTONEN, L., VALO, H., KOLAKOVIC, R., LAAKSONEN, T., & HIRVONEN, J. Electro spraying, spray drying and related techniques for production and formulation of drug nanoparticles. **Expert opinion on drug delivery**, v. 7, n. 6, p. 705-719, 2010.

POHLMANN, A. R. et al. Poly(ϵ -caprolactone) microcapsules and nanocapsules in drug delivery. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 10, n. 5, p. 623-638, 2013.

POLETTI, F. S. et al. Polymeric nanocapsules: concepts and applications. In: (Ed.). **Nanocosmetics and Nanomedicines**: Springer, 2011. p.49-68.

PREET, L.; GULERI, T. K. Topical gel: a recent approach for novel drug delivery. **Asian Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences**, v. 3, n. 17, p. 1-5, 2013.

QUIGLEY, J. W.; BUCKS, D. A. W. Reduced skin irritation with tretinoin containing polyolprepolymer-2, a new topical tretinoin delivery system: A summary of preclinical and clinical investigations. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 38, n. 4, p. S5-S10, 1998.

RANCAN, F.; BLUME-PEYTAVI, U.; VOGT, A. Utilization of biodegradable polymeric materials as delivery agents in dermatology. **Clin Cosmet Investig Dermatol**, v. 7, p. 23-34, 2014.

RAWLE, A. Basic principles of particle-size analysis. **Surface Coatings International Part A: Coatings Journal**, v. 86, n. 2, p. 58-65, 2003.

RIDOLFI, D. M. et al. Chitosan-solid lipid nanoparticles as carriers for topical delivery of tretinoin. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 93, p. 36-40, 2012.

RIGO, L. A.; RASCOVETZKI, R. H.; BECK, R. C. R. Sunscreen formulations containing rice bran or soybean oil: rheological properties, spreadability and in vitro sun protection factor. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 30, 2011.

ROSEN, M. **Delivery System Handbook for Personal Care and Cosmetic products: technology, applications and formulations.** William Andrew, 2005.

SAMAH, N. A.; WILLIAMS, N.; HEARD, C. M. Nanogel particulates located within diffusion cell receptor phases following topical application demonstrates uptake into and migration across skin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 401, n. 1-2, p. 72-78, 2010.

SCHAEFER, U. F. et al. **Models for skin absorption and skin toxicity testing.** In: (Ed.). *Drug Absorption Studies*: Springer, 2008. p.3-33. ISBN 0387749004.

SCHAFFAZICK, S. R. et al. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003.

SCHAFFAZICK, S. R. et al. Development of nanocapsule suspensions and nanocapsule spray-dried powders containing melatonin. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 17, n. 3, p. 562-569, 2006.

SCHMID-WENDTNER, M.-H.; KORTING, H. C. The pH of the skin surface and its impact on the barrier function. **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 19, n. 6, p. 296-302, 2006.

SCHNEIDER, M. R.; SCHMIDT-ULLRICH, R.; PAUS, R. The hair follicle as a dynamic miniorgan. **Curr Biol**, v. 19, n. 3, p. R132-42, 2009.

SCHULZ, J., HOHENBERG, H., PFLÜCKER, F., GÄRTNER, E., WILL, T., PFEIFFER, S., ... & WITTERN, K. P. Distribution of sunscreens on skin. **Advanced drug delivery reviews**, v. 54, p. S157-S163, 2002.

SELZER, D. et al. Finite and infinite dosing: difficulties in measurements, evaluations and predictions. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, n. 2, p. 278-294, 2013.

SELZER, D. et al. Finite dose skin mass balance including the lateral part: comparison between experiment, pharmacokinetic modeling and diffusion models. **Journal of Controlled Release**, v. 165, n. 2, p. 119-128, 2013.

SERRI, R.; IORIZZO, M. Cosmeceuticals: focus on topical retinoids in photoaging. **Clinics in Dermatology**, v. 26, n. 6, p. 633-635, 2008.

SHAMMA, R. N.; ABURAHMA, M. H. Follicular delivery of spironolactone via nanostructured lipid carriers for management of alopecia. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, p. 5449, 2014.

SHAPIRO, S. et al. Use of topical tretinoin and the development of noncutaneous adverse events: Evidence from a systematic review of the literature. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 65, n. 6, p. 1194-1201, 2011.

SHIN, S. C., KIM, H. J., OH, I. J., CHO, C. W., & YANG, K. H. Development of tretinoin gels for enhanced transdermal delivery. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics**, v. 60, n. 1, p. 67-71, 2005.

SIQUEIRA, N. et al. Innovative sunscreen formulation based on benzophenone-3-loaded chitosan-coated polymeric nanocapsules. **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 24, n. 3, p. 166-174, 2010.

SOLLOHUB, K.; CAL, K. Spray drying technique: II. Current applications in pharmaceutical technology. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, n. 2, p. 587-597, 2010.

TAN, M. H., COMMENS, C. A., BURNETT, L. & SNITCH, P. J. A pilot study on the percutaneous absorption of microfine titanium dioxide from sunscreens. **Australasian Journal of Dermatology**, v. 37, n. 4, p. 185-187, 1996.

TERROSO, T., KÜLKAMP, I. C., JORNADA, D. S., POHLMANN, A. R., & GUTERRES, S. S. Development of semi-solid cosmetic formulations containing coenzyme Q10-loaded nanocapsules. **Lat Am J Pharm**, v. 28, n. 6, p. 819-26, 2009.

TEWA-TAGNE, P.; BRIANÇON, S.; FESSI, H. Preparation of redispersible dry nanocapsules by means of spray-drying: development and characterization. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 30, n. 2, p. 124-135, 2007.

TOUITOU, E. et al. Transdermal delivery of tetrahydrocannabinol. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 43, n. 1, p. 9-15, 1988.

VENTURINI, C. G. et al. Formulation of lipid core nanocapsules. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 375, n. 1, p. 200-208, 2011.

VIJAYA SHANTI, B. Novel Applications of Nanotechnology in Life Sciences. **Journal of Bioanalysis & Biomedicine**, 2011.

VOLPATO, N. M.; DE FREITAS, Z. M. F. & STORPIRTIS, S. Biofarmacotécnica e bioequivalência de formulações dermatológicas semissólidas. In: STORPIRTIS, S. et al. **Biofarmacotécnica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. Cap, v. 4, p. 32-65, 2009.

WALTERS, R. H. et al. Next Generation Drying Technologies for Pharmaceutical Applications. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 103, n. 9, p. 2673-2695, 2014.

WEBSTER, G. F. Safety and efficacy of Tretin-X compared with Retin-A in patients with mild-to-severe acne vulgaris. **Skinmed**, v. 5, n. 3, p. 114-8, 2006.

YU, H., TANG, Z., ZHANG, D., SONG, W., DUAN, T., GU, J., & CHEN, X. Poly (ornithine-co-arginine-co-glycine-co-aspartic Acid): Preparation via NCA Polymerization and its Potential as a Polymeric Tumor-Penetrating Agent. **Macromolecular bioscience**, 2015.

APÊNDICE A - Métodos analíticos empregados para extração e quantificação da tretinoína

A validação parcial é definida, conforme a RE 899/2003 da ANVISA, como uma modificação no método bioanalítico validado sem a necessidade de uma revalidação total. Os ensaios de validação parcial vão desde uma pequena determinação, como por exemplo a determinação da exatidão e precisão intraensaio, até uma quase validação total.

Neste trabalho, a maior parte dos métodos que foram empregados para a extração da tretinoína das amostras/matrizes, bem como para sua posterior quantificação em sistema cromatográfico (OURIQUE et al., 2010; MARCHIORI et al., 2012; OURIQUE et al., 2011 e OLIVEIRA et al., 2013), não sofreram alterações. As curvas analíticas obtidas são apresentadas nas *Figuras 22, 23 e 24*.

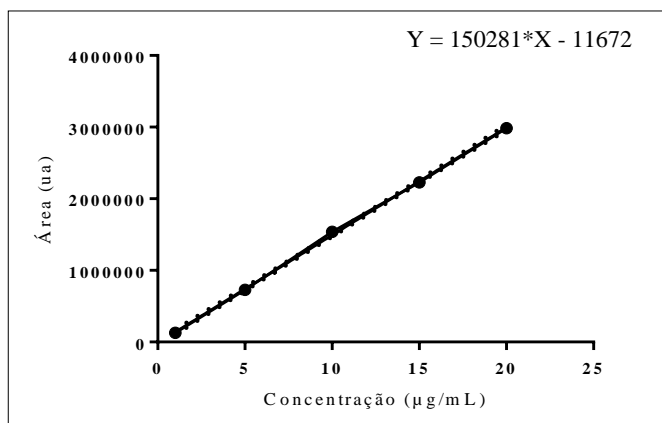


Figura 1 - Curva analítica média obtida para a quantificação da tretinoína em metanol, conforme método descrito por Ourique e colaboradores (2010), com $R^2 = 0,999$ ($n=3$), com volume de injeção de 20 µL.

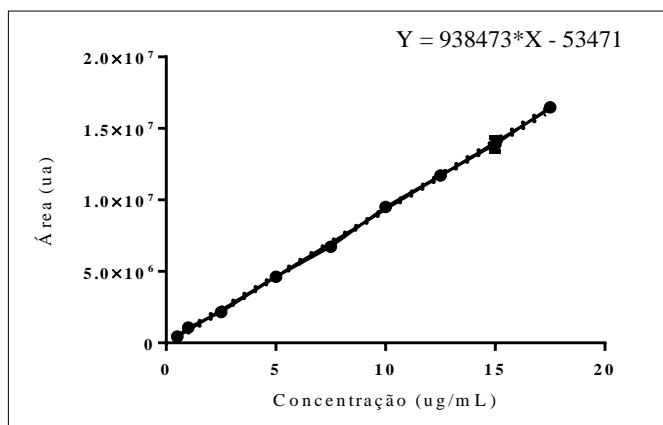


Figura 2 - Curva analítica média para a quantificação da tretinoína em tampão fosfato pH 7,4 e etanol (1:1), conforme método descrito por Oliveira (2013) com $R^2=0,998$ (n=3), com volume de injeção de $100\mu\text{L}$.

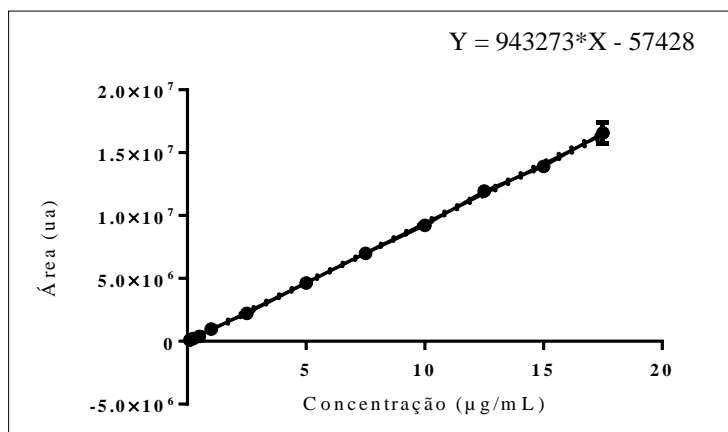


Figura 3 - Curva analítica média para a quantificação da tretinoína em metanol, conforme método descrito por Oliveira (2013), com $R^2=0,998$ (n=3), com volume de injeção de $100\mu\text{L}$.

Especificidade e precisão para a extração da tretinoína dos pós

Como ocorreu alteração na matriz dos pós contendo nanocápsulas de núcleo lipídico obtidos por secagem por aspersão, pelo acréscimo de PVP como adjuvante, a especificidade e a precisão foram avaliadas para essas amostras.

A especificidade do método para a quantificação da tretinoína nos pós LNC-TTN-SD foi analisada pela injeção de três amostras da LNC-Br-SD extraídas com metanol, previamente filtradas em membranas de $0,45\ \mu\text{m}$ (Millipore), em sistema cromatográfico, empregando as condições descritas no item 4.2.1.4. Os

cromatogramas obtidos para essas amostras (*Figura 4*) foram visualmente comparados com os cromatogramas obtidos para amostras de tretinoína em metanol (*Figura 5*). Como não foram detectados picos relativos a outras substâncias no mesmo tempo de retenção da tretinoína, considerou-se que a presença de PVP na matriz não interferiu na especificidade desse método.

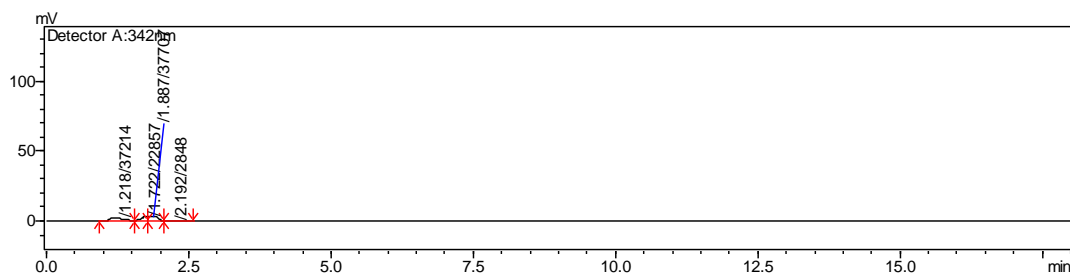


Figura 4 – Cromatograma obtido para amostras da LNC-Br-SD extraída com metanol, demonstrando ausência de picos no tempo de retenção da tretinoína (aproximadamente 15 min).

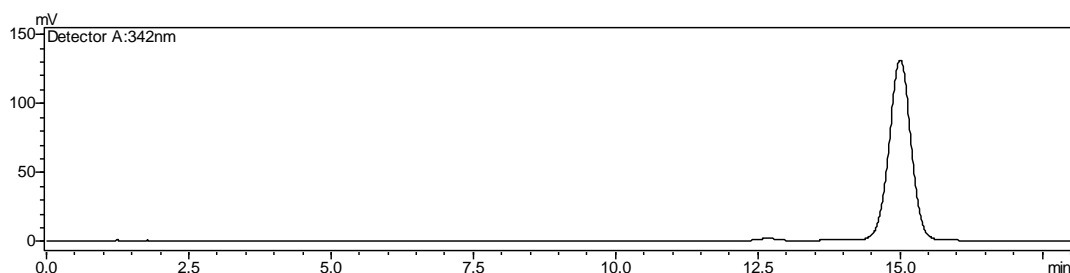


Figura 5 – Cromatograma obtido para amostras de tretinoína em metanol, demonstrando presença de pico em aproximadamente 15 minutos (pico referente à tretinoína).

A precisão da extração foi avaliada pela proximidade dos resultados obtidos para seis amostragens de uma mesma amostra, no mesmo dia (repetibilidade) e em um dia diferente (precisão intermediária). Os desvios-padrão relativos foram calculados para essas amostras e ficaram dentro dos limites aceitáveis (abaixo de 5%), correspondendo a $DPR = 0,81\%$ para a precisão intermediária e $DPR = 1,98\%$.

ANEXO A - Composição dos produtos comerciais utilizados

A composição do gel comercial Vitacid[®] e do creme comercial Vitanol A[®] utilizados nesse trabalho está apresentada nas *Figura 25* e *26*, que constituem trechos da bula dos respectivos produtos. Ambos os produtos utilizados apresentavam concentração de tretinoína de 0,25mg/g.

Vitacid[®] gel
tretinoína

APRESENTAÇÕES
Gel - 0,25 mg/g (0,025%) em bisnaga com 25g.

USO EXTERNO
VIA TÓPICA
USO ADULTO E PACIENTES ACIMA DE 12 ANOS

COMPOSIÇÃO
Vitacid-A[®] gel 0,025%
Cada grama do produto contém:
Tretinoína 0,25 mg
Excipientesq.s.p..... 1,0 g
Excipientes: nicotinamida, butilhidroxitolueno, álcool etílico, hiprolose, álcool isopropílico, fragrância.

Figura 4 - Trecho da bula do produto Vitacid[®] gel (Theraskin[®]), informando sua composição.

Vitanol-A[®]
tretinoína

APRESENTAÇÕES
Creme - 0,25 mg/g (0,025%) ou 0,50 mg/g (0,05%) ou 1,00 mg/g (0,1%) em bisnaga com 30 g.

USO EXTERNO
VIA TÓPICA
USO ADULTO E PACIENTES ACIMA DE 12 ANOS

COMPOSIÇÃO
Vitanol-A[®] creme 0,025%
Cada grama do produto contém 0,25 mg de tretinoína.
Vitanol-A[®] creme 0,05%
Cada grama do produto contém 0,50 mg de tretinoína.
Vitanol-A[®] creme 0,1%
Cada grama do produto contém 1,00 mg de tretinoína.

Excipientes: álcool cetílico, butil-hidroxianisol, butil-hidroxitolueno, ciclometicona e trimetilsiloxisilicato, glicerol, metilparabeno, propilparabeno, triglicérides do ácido cáprico/caprílico, pentilenoglicol, octildodecanol, ciclometicona e dimeticona crosspolímero, álcool cetílico e glucosídeo cetearílico, ectoína, hidroxietilacrilato/acroloildimetiltaurato de sódio e polissorbato 60 e água purificada.

Figura 5 - Trecho da bula do produto Vitanol A[®] creme (Stiefel), informando sua composição.