

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

**AVALIAÇÃO DA PENETRAÇÃO CUTÂNEA DE  
NANOCÁPSULAS DE ISOTRETINOÍNA POR *TAPE  
STRIPPING IN VITRO* EM PELE HUMANA E SUÍNA**

**CLARISSA CASSINI BETTONI**

Porto Alegre, 2009.



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

**AVALIAÇÃO DA PENETRAÇÃO CUTÂNEA DE  
NANOCÁPSULAS DE ISOTRETINOÍNA POR *TAPE  
STRIPPING IN VITRO* EM PELE HUMANA E SUÍNA**

Dissertação apresentada por  
**CLARISSA CASSINI BETTONI** para  
obtenção do GRAU DE MESTRE em  
Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Profa. Dra. Teresa Cristina Tavares Dalla Costa

Co-orientadora: Profa. Dra. Silvia Guterres

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas em nível de Mestrado – Produção e Controle de Qualidade de Produtos Farmacêuticos – da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 24.06.2009, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof. Dr. Helder Ferreira Teixeira  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marta Palma Alves  
Centro Universitário Franciscano

Prof. Dr. Pedro Eduardo Fröhlich  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

B565a Bettoni, Clarissa Cassini

Avaliação da penetração cutânea de nanocápsulas de isotretinoína por tape stripping in vitro em pele humana e suína / Clarissa Cassini Bettoni – Porto Alegre: UFRGS, 2009. – xiv, 107p.: il ., gráf., tab.

Dissertação (mestrado). UFRGS. Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Farmacologia. 2. Isotretinoína. 3. Nanocápsulas poliméricas. 4. Penetração cutânea. 5. Tape stripping. I. Dalla Costa, Teresa Cristina Tavares. II. Guterres, Silvia Stanisçuaski. III. Título.

CDU: 615.4

Bibliotecária responsável:  
Claudia da Silva Gonçalves de Leon, CRB10/1012

Este trabalho foi realizado nos laboratórios do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas e no Centro Bioanalítico de Medicamentos (CBIM) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul com bolsa de estudos financiada pela CAPES



## AGRADECIMENTOS

À minha querida orientadora Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Teresa Dalla Costa pela orientação, pela paciência, pela confiança depositada, pelas oportunidades concedidas, por fazer me apaixonar pela pesquisa e, sobretudo, pelo exemplo de profissionalismo.

À Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Silvia Guterres pela co-orientação e atenção dispensada nesse trabalho.

Agradeço, de forma especial, à bolsista Cristiane de Andrade pela dedicação incondicional, responsabilidade, competência e amizade.

Ao Programa de Pós-Graduação, à Faculdade de Farmácia da UFRGS e a todos os professores e funcionários dessa instituição.

Aos amigos do laboratório 405 pelo auxílio, cumplicidade, amizade e pelos momentos de descontração proporcionados.

Aos meus amigos farmacocinéticos Vitória Cattani, Flávia Uchoa, Daniela Conrado, Sandra Haas, Moacir Kaiser, Cristiane de Andrade, Rodrigo Freddo, Bibiana Araújo, Leandro Tasso, Cândice Felippi, Francine Johansson, Liberato Brum, Maiara Pigatto, Manoela Leal e à Karina Paese pelas discussões científicas, ajudas em experimentos, aprendizado, aconselhamentos e, sobretudo pelo companheirismo, amizade e cumplicidade. Sem vocês o caminho teria sido bem mais difícil.

À minha amiga Helen Pedroni pelo exemplo de profissionalismo e pela confiança ao me indicar para a bolsa de iniciação científica do meu mestrado em 2002 que daria início a minha carreira, a esse mestrado e principalmente a nossa amizade.

Aos meus amigos e colegas da graduação, em especial à Damiana Vianna, Alessandro Dallegrave, Luciana Habekost, Vanessa Domingos, Tales Pires e Tiago Cunha pelas longas horas de estudo, troca de conhecimentos, descontração e amizade. Ao meu afilhado Vitor e a todos os meus amigos, de perto ou de longe, pela compreensão e risadas.

Ao Bruno e a sua família pelo amor, compreensão, apoio, paciência e acolhimento no decorrer desta caminhada.

À minha família, em especial, aos meus pais Iracy e Iveliz, à minha irmã Isadora, à minha vó Dora e ao meu tio Fábio pelo exemplo, incentivo, carinho, apoio incondicional e compreensão. Vocês foram mais do que essenciais para vencer essa etapa.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Patogênese da acne.....	10
<b>Figura 2.</b> Estrutura molecular da isotretinoína. ....	12
<b>Figura 3.</b> Representação de nanocápsulas .....	20
<b>Figura 1.1.</b> Representação gráfica de uma sonda de microdiálise linear.....	47
<b>Figura 1.2.</b> Esquema para determinação das taxas de recuperação in vitro por diálise e retrodiálise. ....	52
<b>Figura 1.3.</b> Representação gráfica da curva de calibração média da isotretinoína em microdialisado obtida por CLAE/UV na faixa de 0,06 a 1,0 µg/mL. ....	57
<b>Figura 1.4.</b> Recuperação da isotretinoína pelos métodos de retrodiálise e diálise para diferentes fluxos de perfusão.....	60
<b>Figura 1.5.</b> Porcentagem de ligação da isotretinoína nos tubos de entrada e saída da sonda de microdiálise CMA 30 para diferentes fluxos de perfusão. ....	61



## RESUMO

**Objetivos:** objetivo geral deste trabalho foi avaliar a penetração cutânea da isotretinoína nanoencapsulada e livre utilizando técnicas de microdiálise e *tape stripping in vitro*. **Métodos:** A viabilidade da utilização da técnica de microdiálise para avaliar o perfil farmacocinético da isotretinoína após aplicação tópica foi investigada através da determinação da recuperação relativa (RR) *in vitro* por diálise e retrodiálise. A influência da concentração, do fluxo de perfusão e a ligação do fármaco à tubulação das sondas de microdiálise foram investigadas. A metodologia analítica para quantificação do fármaco em microdialisado foi validada. Em seguida, as penetrações cutâneas da isotretinoína livre e nanoencapsulada incorporada em géis hidrofílicos foram comparadas através da técnica de *tape stripping in vitro* em células de difusão de Franz utilizando pele humana e pele de porco. Para garantir a integridade das formulações, a estabilidade físico-química das mesmas foi avaliada. Os resultados de penetração cutânea foram comparados com os resultados *in vivo* obtidos em trabalho prévio do grupo de pesquisa. **Resultados e Conclusões:** Um método analítico simples e rápido para a determinação de isotretinoína em microdialisado foi validado de acordo com o FDA. A RR mostrou-se concentração independente e observou-se que há diferenças significativas entre as RR avaliadas pelos dois métodos utilizados, sendo a recuperação por retrodiálise 2,7 a 3,5 vezes superior que a obtida por diálise para os fluxos investigados. O fármaco aderiu às tubulações da sonda de microdiálise devido à sua lipofilicidade. Os hidrogéis de isotretinoína apresentaram estabilidade durante 2 meses de estocagem à 4 °C. Os experimentos de *tape stripping in vitro* mostraram que a isotretinoína não foi encontrada no compartimento receptor após 8 h, para ambas as formulações. A nanoencapsulação aumentou a penetração e prolongou a liberação da isotretinoína no estrato córneo de ambas as peles. A penetração cutânea em ambas as peles mostrou proporções similares para as duas formulações embora diferentes quantidades de fármaco tenham sido detectadas no estrato córneo. A pele de porco, mais permeável que a pele humana, é apropriada para prever a penetração cutânea da isotretinoína no estrato córneo humano *in vitro* (R = 0,79). O método *in vitro* não foi capaz de prever a penetração cutânea da isotretinoína *in vivo*.

**Palavras-chave:** isotretinoína, nanocápsulas poliméricas, microdiálise, *tape stripping in vitro*, pele humana, pele de porco.



## ABSTRACT

### Assessment of Cutaneous Penetration of Isotretinoin-loaded Nanocapsules by Tape Stripping *In Vitro* in Human and Pig Skin

**Objectives:** The aim of the present work was to assess the cutaneous penetration of isotretinoin free and loaded into polymeric nanocapsules using microdialysis and tape stripping *in vitro*. **Methods:** The feasibility of using microdialysis to determine the pharmacokinetic profile of isotretinoin after topical application was investigated through assessment of relative recovery (RR) *in vitro* by dialysis and retrodialysis. The influence of isotretinoin concentration, perfusion flow rate and drug binding to the probes were determined. The analytical method for quantification of microdialysate samples was validated. Furthermore the cutaneous penetration of isotretinoin free and loaded nanocapsules incorporated in hydrogel formulations were compared by tape stripping *in vitro* using Franz-type diffusion cells with excised human and pig skin. In order to ensure the integrity of the formulations used in this study, the chemical and physical stabilities were evaluated. The results of cutaneous penetration were compared with the results of tape stripping *in vivo* acquired in a previous study of our group. **Results and Conclusions:** A simple and rapid analytical method for quantification of isotretinoin in microdialysate samples was validated according to FDA. RR was concentration independent but method dependent under the conditions investigated being the retrodialysis recovery 3.5 to 2.7 times higher than the dialysis. Isotretinoin bound to the microdialysis tubing due to its high lipophilicity. The hydrogels showed storage stability for 2 months at 4 °C. *In vitro* tape stripping in human and pig skin showed that no isotretinoin reaches the receptor compartment for both formulations up to 8 h. Nanoencapsulation increased isotretinoin skin penetration for both stratum cornea and prolonged drug release. Similar proportion of cutaneous penetration for human and pig skin were observed although different amounts of drug were detected at the stratum corneum of both skin specimens. Pig skin, more permeable than human skin, is suitable for predicting cutaneous penetration of isotretinoin in humans *in vitro* ( $R = 0.79$ ). The *in vitro* experiments were not suitable to reflect the *in vivo* results for percutaneous penetration of isotretinoin.

**Keywords:** isotretinoin, polymeric nanocapsules, microdialysis, tape stripping *in vitro*, human skin, pig skin.



## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>7</b>
1. Acne .....	9
2. Isotretinoína .....	11
2.1. Efeitos adversos da isotretinoína.....	13
3. Pele como via de administração tópica .....	14
3.1. Tratamentos tópicos da acne.....	16
3.2. Isotretinoína tópica .....	18
4. Sistemas nanoestruturados .....	20
5. Microdiálise.....	24
6. <i>Tape stripping</i> .....	28
7. Referências .....	34
<b>CAPÍTULO 1: MICRODIÁLISE <i>IN VITRO</i>.....</b>	<b>45</b>
1. Introdução.....	47
2. Metodologia .....	49
2.1. Padrão, solventes e reagentes .....	49
2.2. Metodologia analítica para quantificação da isotretinoína em microdialisado por CLAE .....	49
2.2.1. Condições cromatográficas .....	49
2.2.2. Preparo da curva de calibração e controles de qualidade .....	50
2.2.3. Validação da metodologia analítica por CLAE para microdialisado.....	51
2.3. Microdiálise.....	51
2.3.1. Recuperação <i>in vitro</i> das sondas de microdiálise por diálise .....	52
2.3.2. Recuperação <i>in vitro</i> das sondas de microdiálise por retrodiálise .....	53
2.3.3. Experimentos de ligação da isotretinoína na tubulação da sonda de microdiálise.....	54
2.4. Descarte de resíduos químicos .....	54
3. Resultados e Discussão .....	54
3.1. Validação de metodologia analítica por CLAE para microdialisado.....	54

3.2. Recuperação das sondas de microdiálise <i>in vitro</i> e ligação da isotretinoína aos dispositivos de microdiálise .....	58
4. Conclusões .....	63
5. Perspectivas .....	63
6. Referências .....	64
<b>CAPÍTULO 2: Comparison of cutaneous penetration of isotretinoin-loaded nanocapsules by tape stripping <i>in vitro</i> in human and pig skin .....</b>	<b>67</b>
<b>DISCUSSÃO E CONCLUSÕES GERAIS .....</b>	<b>71</b>





A *acne vulgaris* é uma doença cutânea crônica, muito comum em adolescentes e adultos jovens, afetando mais de 90% dos homens e 80% das mulheres em todos os grupos étnicos (YOSIPOVITCH *et al.*, 2007). A isotretinoína ou ácido 13-cis retinóico vem sendo comercializada, desde a sua aprovação pelo FDA em julho de 1982 como Accutane<sup>®</sup>, para o tratamento de acne nodular severa. Recentemente, a terapia tópica com isotretinoína tem sido utilizada também em casos de acne comedonal ou papulopustular de leve a moderada, para pacientes que não respondem aos antibióticos (LAYTON, 2006). Desde sua introdução no mercado, a isotretinoína permanece sendo o fármaco mais eficaz disponível na terapêutica, revolucionando o tratamento anti-acne (STRAHAN e RAIMER, 2006; ZOUBOULIS, 2006).

Apesar da natureza quase impermeável da pele, algumas substâncias são capazes de penetrá-la (DEGIM, 2006), sendo o estrato córneo crucial no controle da absorção percutânea dos mesmos (ASBILL e MICHNIAK, 2000; HADGRAFT, 2001; DEGIM, 2006).

A penetração transdérmica e a biodisponibilidade sistêmica resultante da aplicação tópica da isotretinoína ainda não foram largamente investigados. Sabendo-se que embriotoxicidade e teratogenicidade, já comprovados após uso oral, são os maiores obstáculos a serem avaliados no uso terapêutico dos retinóides, informações sobre a penetração cutânea após uso tópico são necessárias para garantir o uso seguro desse fármaco, além de fornecer informações a respeito da sua eficácia (KRAUTHEIM e GOLLNICK, 2003).

Além da teratogenicidade, outros efeitos adversos bastante comuns à classe dos retinóides quando aplicados topicamente são eritema, escamação e irritação cutânea. Inicialmente, acreditava-se que os efeitos de irritação cutânea provocados pela isotretinoína eram essenciais para obtenção do efeito terapêutico. Hoje se sabe que esses efeitos são apenas adversos e não contribuem para a eficácia do fármaco (LEYDEN, 1998). A isotretinoína, ao agredir as barreiras celulares, pode modificar a penetração cutânea, tornando a sua permeabilidade aumentada. A acne também pode ocasionar uma alteração das condições da pele e, em consequência, pode modificar os processos difusionais de fármacos, de modo que, numa inflamação

cutânea, com a perda do estrato córneo e queratinização alterada, a permeabilidade pode aumentar (BARRY, 2005).

Nos últimos 30 anos, diferentes sistemas carreadores têm sido estudados com o intuito de controlar a liberação de fármacos em sítios de ação específicos, otimizar a velocidade de cedência, gerando respostas adequadas por períodos de tempo prolongados, otimizar regimes posológicos, e ainda, melhorar o índice terapêutico, ao aumentar a eficácia e/ou reduzir a toxicidade de fármacos, reduzindo a absorção sistêmica (BARRAT, 2003; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; GUTERRES *et al.*, 2007).

A aplicação tópica de carreadores coloidais tem como objetivo promover uma maior retenção do fármaco no sítio de administração, de maneira que a liberação sustentada desses fármacos nanoencapsulados pode suprir a pele por um período de tempo prolongado e propiciar a possibilidade de redução da absorção sistêmica e dos efeitos adversos em sítios não específicos, reduzindo a irritação provocada pelo fármaco no local de administração, proporcionando índices terapêuticos mais adequados (YOKOYAMA e OKANO, 1996; BARRATT, 2003).

Nesse contexto, nanocápsulas de isotretinoína foram desenvolvidas em nosso grupo de pesquisa com o intuito de aumentar a penetração cutânea deste fármaco, promovendo um aumento do índice terapêutico, impedindo a sua absorção sistêmica e reduzindo os efeitos adversos comumente apresentados no uso cutâneo. Além disso, as nanocápsulas promoveram a melhora da estabilidade desse fármaco. A penetração cutânea *in vivo* em humanos dessas nanocápsulas através da técnica de *tape stripping* foi avaliada em uma dissertação de mestrado vinculado a esse Programa de Pós-Graduação (FELIPPI, 2008).

Cabe ressaltar que não há relatos na literatura associando-se nanocápsulas e isotretinoína, e que somente a associação da isotretinoína a dois nanocarreadores diferentes foi encontrada. Liu e colaboradores (2007) desenvolveram nanopartículas lipídicas sólidas de isotretinoína e aplicaram-na topicamente. O estudo de permeação *in vitro* mostrou que quantidades semelhantes de fármaco foram encontradas no estrato córneo tanto a partir aplicação das nanopartículas quanto do fármaco livre, no entanto, a inclusão da isotretinoína nesse nanocarreador é capaz

de evitar a captação sistêmica do fármaco, mostrando-se promissora nesse sentido. Além disso, Iole e colaboradores (2005) avaliaram a fotoestabilidade da isotretinoína incorporada em lipossomas e observaram melhora da estabilidade.

Visando avaliar o comportamento tópico da isotretinoína nanoencapsulada aplicada sobre a pele, este trabalho propôs a determinação da viabilidade de utilizar a microdiálise como técnica de avaliação da penetração cutânea da isotretinoína, bem como, a utilização da técnica de *tape stripping in vitro* em pele humana e pele de porco para determinação da quantidade de fármaco capaz de penetrar o estrato córneo e posterior comparação com o estudo *in vivo* em humanos desenvolvido em nosso grupo.

Sendo assim, objetivo geral deste trabalho foi avaliar a penetração cutânea da isotretinoína nanoencapsulada e livre utilizando técnicas de microdiálise e *tape stripping in vitro*.

Os objetivos específicos desta dissertação foram:

- Avaliar a estabilidade da isotretinoína livre e nanoencapsulada incorporada em gel hidrofílico;
- Determinar a viabilidade da utilização da técnica de microdiálise para avaliar a penetração cutânea da isotretinoína;
- Comparar a penetração cutânea da isotretinoína livre e nanoencapsulada pela técnica de *tape stripping in vitro* em pele de porco e humana;
- Comparar os resultados de *tape stripping in vitro*, obtidos neste trabalho, com os resultados *in vivo* obtidos em trabalho prévio do grupo de pesquisa.



**REVISÃO DE LITERATURA**

---

---



## 1. Acne

A *acne vulgaris* é uma doença cutânea crônica, muito comum em adolescentes e adultos jovens, afetando mais de 90% dos homens e 80% das mulheres em todos os grupos étnicos (YOSIPOVITCH *et al.*, 2007). Frequentemente, a acne inicia antes da puberdade, quando os andrógenos produzidos por glândulas adrenais estimulam as glândulas sebáceas e o epitélio folicular. Na adolescência, a acne passa a adquirir sua forma característica em indivíduos suscetíveis e o seu aumento neste período ocorre principalmente devido aos andrógenos produzidos pelos ovários e testículos (SHALITA, 2004; KRAKOWSKI *et al.*, 2008). A patogênese da acne é complexa e multifatorial. Muitos eventos envolvidos nessa doença ainda permanecem desconhecidos e frequentemente são objetos de discussões controversas (THIELITZ *et al.*, 2006; KRAKOWSKI *et al.*, 2008).

Inicialmente, acreditava-se que a colonização por *Propionibacterium acnes* era a causa direta da acne. No entanto, ao longo dos anos, diversas pesquisas demonstraram que esta bactéria reside normalmente na pele humana (EVANS *et al.*, 1950 *apud* FARRAR e INGHAM, 2004)<sup>1</sup> e que a introdução de *P. acnes* na pele induz respostas inflamatórias (GILCHRIST, 1903 *apud* FARRAR e INGHAM, 2004)<sup>2</sup>. Estes indícios e comprovações científicas determinaram a hipótese mais consagrada na atualidade, a de que *P. acnes* não está diretamente relacionada com a causa da acne, mas é um fator que contribui significativamente nos estágios inflamatórios da doença (FARRAR e INGHAM, 2004).

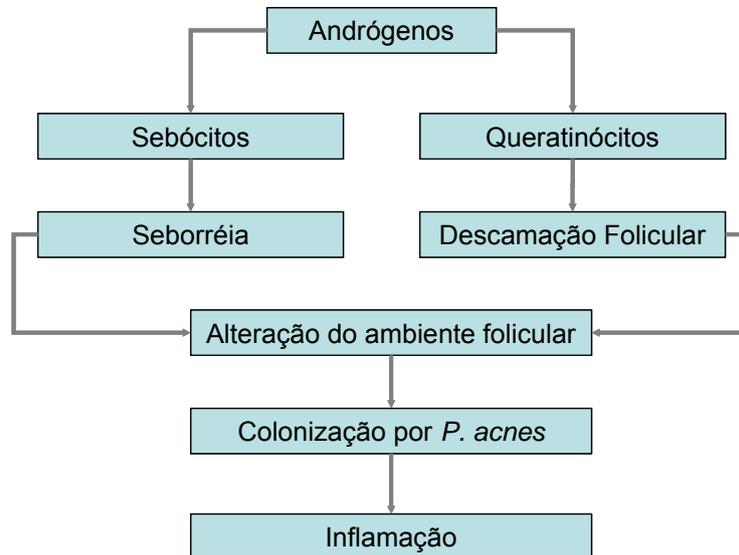
Adicionalmente sabe-se que há uma forte influência genética sobre o padrão de expressão da acne (SHALITA, 2004) e que a sua causa primária está relacionada com a obstrução dos canais pilossebáceos. Esta obstrução se deve a pelo menos quatro fatores patogénéticos distintos (Figura 1): (i) padrão anormal de queratinização com aumento da proliferação do epitélio folicular e aumento da coesão entre os queratinócitos; (ii) aumento da produção de sebo, o que parece

---

<sup>1</sup> EVANS, C.A.; SMITH, W.M.; JOHNSON, E.A., *et al.* Bacterial flora of the normal human skin. *The Journal of Investigative Dermatology*, v. 15, p. 305-324, 1950 *apud* FARRAR, M.D.; INGHAM, E. Acne: Inflammation. *Clinics in Dermatology*, v. 22, p. 380-384, 2004.

<sup>2</sup> GILCHRIST, T.C. The etiology of acne vulgaris. *J Cutan Dis Syphil*, v. 21, p. 107-120, 1903 *apud* FARRAR, M.D.; INGHAM, E. Acne: Inflammation. *Clinics in Dermatology*, v. 22, p. 380-384, 2004.

estar relacionado a um controle genético com estimulação de hormônios andrógenos; (iii) colonização do folículo por *P. acnes* e (iv) indução da resposta inflamatória (KRAUTHEIM e GOLLNICK, 2003; FARRAR e INGHAM, 2004).



**Figura 1.** Patogênese da acne (Adaptado de GOLLNICK *et al.*, 2003).

O aumento da excreção de sebo, considerado um dos principais fatores envolvidos na patofisiologia da acne (ZOUBOULIS, 2004), e os efeitos dos andrógenos sobre o epitélio folicular aumentam o número e a coesão entre as células no canal folicular, propiciando a formação dos microcomedões, os primeiros tipos de lesões sub-clínicas formadas pela acne. Além disso, os folículos também podem sofrer colonização por *P. acnes* o que leva a produção de inúmeros fatores extracelulares pró-inflamatórios. Os microcomedões, portanto, podem evoluir para comedões (lesões não-inflamatórias), ou pápulas, pústulas e nódulos (lesões inflamatórias) (GOLLNICK *et al.*, 2003; SHALITA, 2004; THIELITZ *et al.*, 2006).

Os fatores patogénéticos que induzem a formação dos microcomedões são hiperseborréia, hiperproliferação e diferenciação anormal do epitélio folicular. Os microcomedões são alvo terapêutico essencial para prevenção e controle da acne (RIGOPOULOS *et al.*, 2004; THIELITZ *et al.*, 2006).

A importância dos hormônios, especialmente os andrógenos, na patofisiologia da acne é confirmada por observações clínicas e evidências experimentais, de modo que, o aumento da excreção de sebo está diretamente relacionado com o efeito de

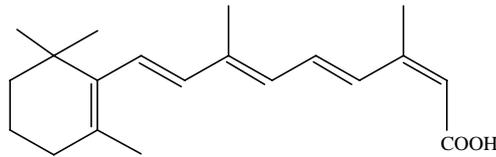
hormônios sobre as glândulas sebáceas presentes na pele (THIBOUTOT, 2004; YATES, 2005). Sugere-se também, que os hormônios exercem um importante papel na hiperqueratinização folicular observada na acne. Desse modo, a terapia hormonal, eficaz em mulheres com acne, exerce um significativo papel nessa doença. Somente a isotretinoína oral e a terapia hormonal agem nas glândulas sebáceas promovendo melhora na acne (ZOUBOULIS, 2004).

O impacto negativo no bem-estar emocional e social causado pela acne pode ser comparado com o efeito de outras doenças como epilepsia, asma e artrite, sendo considerada, portanto, uma doença de elevada relevância mundial. A acne pode causar baixa auto-estima e depressão, comprometendo a qualidade de vida do paciente (THIELITZ *et al.*, 2006; KRAKOWSKI *et al.*, 2008). Tan (2004), através de uma revisão de diversos estudos comparativos, mostrou que pacientes com acne podem apresentar níveis de depressão e ansiedade mais elevados que pacientes com câncer. Por conseguinte, um tratamento rápido e correto é muito importante na prevenção de cicatrizes físicas e psicológicas (YATES, 2005; THIELITZ *et al.*, 2006; KRAKOWSKI *et al.*, 2008).

A maioria dos fármacos utilizados no tratamento da acne age reduzindo a produção de sebo, a população de *P. acnes* e a inflamação (YATES, 2005). Entretanto, com o avanço das pesquisas sobre a etiologia da doença e as diversas barreiras existentes para o sucesso dos tratamentos, torna-se necessário o desenvolvimento de novos fármacos que atuem em alvos terapêuticos distintos (KRAKOWSKI *et al.*, 2008). Dentre esses, já é possível citar a redução de lipídios pró-inflamatórios no sebo, a regulação de sinais pró-inflamatórios nas unidades pilosebáceas e a inibição do acúmulo de mediadores nas células inflamatórias (ZOUBOULIS, 2004).

## **2. Isotretinoína**

A isotretinoína ou ácido 13-cis retinóico (Figura 2) é um membro da classe de retinóides relacionados com a vitamina A (retinol) (AYER e BURROWS, 2006).



**Figura 2.** Estrutura molecular da isotretinoína.

Devido à alta resistência desenvolvida por *P. acnes* em relação aos antibióticos, o uso de isotretinoína pela via oral tornou-se extremamente comum. Além disso, é o único fármaco que atua sobre todos os quatro principais fatores envolvidos na patogênese da acne, suprimindo a descamação anormal do epitélio e a produção de sebo, reduzindo o crescimento de *P. acnes* e exercendo ação antiinflamatória, além de ser o único tratamento que leva à diminuição permanente da acne. Ao mesmo tempo, este é o fármaco mais efetivo na redução do tamanho das glândulas sebáceas pela diminuição da proliferação basal de sebócitos, suprimindo a produção de sebo em mais de 90 % e inibindo a diferenciação das células sebáceas *in vitro* e *in vivo* (ZOUBOULIS, 2004; YATES, 2005; AYER e BURROWS, 2006; KAYMAK e ILTER, 2006; ZOUBOULIS, 2006; BRELSFORD e BEUTE, 2008).

As principais indicações da isotretinoína na terapia da *acne vulgaris* são dismorfofobia, tratamento convencional sem sucesso por mais de três meses, acne moderada a severa e em rápidas recorrências após o processo terapêutico completo (GHALAMKARPOUR e NASIRI, 2006).

Recentemente, o uso da isotretinoína no tratamento da acne de leve a moderada, não responsiva à terapia de longo prazo com antibióticos e com tendências a causar cicatrizes e efeitos psicológicos negativos, tem se tornado popular. A isotretinoína é capaz de diminuir a severidade das cicatrizes devido ao seu rápido início de ação, sendo, portanto, uma alternativa no tratamento de acne leve a moderada. Com este intuito, Kaimak e Ilter (2006) investigaram a efetividade do tratamento de acne após administração de isotretinoína intermitente pela via oral e observaram que 82,9 % dos pacientes obtiveram cura completa e 17,1 %, cura parcial. Os efeitos adversos foram classificados como leves (lábios e mãos secas, dermatite) e não levaram a interrupção do tratamento, indicando que a isotretinoína

intermitente parece ser uma opção efetiva e mais segura para pacientes que apresentam acne moderada e leve.

### **2.1. Efeitos adversos da isotretinoína**

Apesar de todas as vantagens conhecidas com o uso de isotretinoína oral, diversos efeitos adversos graves, como teratogenicidade e alterações cutâneas, são observados com o seu uso contínuo (GHALAMKARPOUR e NASIRI, 2006).

Tanto a isotretinoína sistêmica quanto tópica são capazes de afetar a estrutura e a função da epiderme, provocando aumento da perda transepidérmica de água, perda de tonofilamentos e hemidesmossomas das células da epiderme e, por consequência, aumentando a fragilidade dessa camada. Além disso, a isotretinoína pode induzir a migração de células do sistema imune para a epiderme, gerando respostas de hipersensibilidade e reações alérgicas (FALLON *et al.*, 2008). Esses efeitos adversos mucocutâneos podem ser previstos a partir do próprio efeito farmacológico do fármaco e são considerados comuns. Dentre esses, encontram-se lábios e pele secos, dermatite facial irritante, vestibulites e outros, que podem ser controlados por reduções na dose, já que são dose-dependente, ou por aplicação de emolientes (YATES, 2005; LAYTON, 2006; BRELSFORD e BEUTE, 2008).

Efeitos adversos como o aumento de triglicerídeos e colesterol são pouco comuns, assim como, mudanças de humor e depressão. Apesar disso, a discussão da possibilidade de ocorrência desses efeitos adversos com o paciente é muito importante, bem como uma monitoração cuidadosa desses efeitos durante o tratamento (YATES, 2005; AYER e BURROWS, 2006; LAYTON, 2006).

A associação entre isotretinoína e efeitos adversos psiquiátricos como depressão e suicídio tem sido reportada desde a sua introdução no mercado, no entanto, a falta de dados científicos concretos limitam conclusões a respeito dessa associação (STRAHAN E RAIMER, 2006). Recentemente, Kaymak e colaboradores (2009) investigaram a ocorrência desses sintomas psiquiátricos através de dois grupos de pacientes com acne, um grupo tratado com isotretinoína oral e outro que recebeu terapia tópica. Após quatro meses de tratamento, os autores concluíram que o grupo tratado com isotretinoína oral apresentou melhora acentuada da

qualidade de vida quando comparado ao grupo com tratamento tópico, indicando que a isotretinoína oral não é capaz de aumentar sintomas de ansiedade e depressão.

Todas as doses de isotretinoína administradas pela via oral são teratogênicas. Dessa forma, mulheres que pretendem utilizar esse fármaco devem adotar medidas contraceptivas um mês antes do início do tratamento, durante o tratamento e mantê-las por seis semanas após o final do tratamento. Além disso, devem realizar testes de gravidez constantemente (YATES, 2005; AYER e BURROWS, 2006; THIELITZ *et al.*, 2006).

A aplicação tópica de isotretinoína também pode gerar efeitos adversos como irritação e ressecamento da pele. Estes efeitos podem ser diminuídos com aplicações de contato curto (YATES, 2005; LAYTON, 2006).

Devido aos graves efeitos adversos provocados pela isotretinoína oral, novas formulações e protocolos de aplicações intermitentes ou de baixas dosagens têm sido desenvolvidos nos últimos anos (KAYMAK e ILTER, 2006). Além disso, órgãos governamentais regulamentadores de diversos países, como a Diretiva Européia e ANVISA, possuem programas de prevenção do uso da isotretinoína em mulheres durante a gravidez e divulgam protocolos de uso correto do fármaco (LAYTON, 2006). Nos Estados Unidos, o programa iPLEDGE foi desenvolvido para garantir o uso seguro da isotretinoína, evitando que mulheres grávidas façam uso do medicamento e que mulheres sob tratamento venham a engravidar. Para que a isotretinoína seja dispensada, médicos devem submeter testes negativos de gravidez das pacientes e estas devem comprovar pelo menos duas formas contraceptivas durante o tratamento.

### **3. Pele como via de administração tópica**

Apesar da natureza quase impermeável da pele, conferida especialmente pelo estrato córneo da epiderme (RHEIN *et al.*, 2000; MOSER *et al.*, 2001), algumas substâncias são capazes de penetrá-la (DEGIM, 2006). Dessa forma, a pele torna-se uma potencial via de administração de fármacos, sendo o estrato córneo crucial no

controle da absorção percutânea dos mesmos (ASBILL e MICHNIAK, 2000; HADGRAFT, 2001; DEGIM, 2006).

O estrato córneo (10-20  $\mu\text{m}$ ) funciona como uma barreira protetora, prevenindo a perda transepidermal de água (MARKS, 2004) e mantendo um nível de hidratação adequada. Os dois principais componentes que permitem que o estrato córneo desempenhe este papel são os lipídeos extracelulares e o Fator de Hidratação Natural (NMF) localizado intracelularmente (JOHNSON, 2004; RAWLINGS e HARDING, 2004). Devido às suas características lipofílicas, os lipídeos do estrato córneo mantêm o NMF dentro das células. Além disso, são os principais envolvidos na prevenção da perda transepidermal de água e na absorção de compostos hidrofílicos (BAUMANN, 2002; JOHNSON, 2004; MARKS, 2004). O estrato córneo também pode atuar como um reservatório para formulações aplicadas na pele (FOLDVARI, 2000).

A administração cutânea de fármacos é freqüentemente utilizada quando há a necessidade de se obter um efeito tópico. Contudo, uma absorção apreciável pode ocorrer, resultando em efeitos adversos sistêmicos (RANG *et al.*, 2004; NANAYAKKARA *et al.*, 2005; WILLIAMS, 2006).

Em uma administração tópica, um fármaco pode penetrar no estrato córneo tanto pela via transdérmica quanto pela via transfolicular. Em geral, partículas maiores que 10  $\mu\text{m}$  permanecem na superfície da pele, partículas entre 3 e 10  $\mu\text{m}$  concentram-se nos folículos pilosos, e, quando menores que 3  $\mu\text{m}$ , penetram nos folículos e no estrato córneo igualmente (BARRY, 2005).

Para fármacos cujo sítio de ação é restrito à superfície da pele ou às primeiras camadas, como os retinóides, objetiva-se prevenir sua passagem para as camadas mais profundas da pele, obtendo-se somente um efeito local. Desta maneira, concentrações efetivas do fármaco no tecido alvo são mantidas e o risco de induzir efeitos secundários devido à exposição sistêmica não ocorre (TOUITOU *et al.*, 1998; ASBILL e MICHNIAK, 2000; KREILGAARD, 2002; ALENCASTRE *et al.*, 2006).

### 3.1. Tratamentos tópicos da acne

Nos últimos 25 anos, diversos fármacos de ação tópica foram desenvolvidos para o tratamento da acne (THIELITZ *et al.*, 2006). A terapia tópica é considerada o tratamento de primeira-linha em casos de acne comedonal ou papulopustular de leve a moderada (LAYTON, 2006; ZAENGLEIN, 2008). Nas formas mais severas de nódulos, cistos ou cicatrizes uma terapia adicional sistêmica é necessária (KRAUTHEIM e GOLLNICK, 2004). A forma mais comum de tratamento se dá através de terapias combinadas, sendo que somente a isotretinoína oral deve ser utilizada como monoterapia (KATSAMBAS e CUNLIFFE, 2004).

Diversos agentes tópicos encontram-se disponíveis na terapêutica e agem direta ou indiretamente em ao menos um dos quatro principais fatores patogênicos responsáveis pelo desenvolvimento da acne. Os mais importantes são os retinóides, os antibióticos tópicos, o peróxido de benzoíla e o ácido azeláico. A escolha do agente se dá de acordo com o tipo de lesão acneica (KRAUTHEIM e GOLLNICK, 2003).

Os antibióticos tópicos foram largamente utilizados no passado, resultando no desenvolvimento de resistência bacteriana. Hoje em dia, portanto, estes agentes devem ser utilizados somente por curtos períodos de tempo ou em combinação com retinóides, peróxido de benzoíla ou ácido azeláico (LEYDEN *et al.*, 2001).

Os retinóides tópicos têm sido utilizados na terapia desde 1962, e a primeira substância a ser estudada foi a tretinoína que permanece sendo uma das mais estudadas e utilizadas até a atualidade (JAIN, 2004). Devido ao seu potencial irritante, novas formulações e fármacos com maior tolerabilidade têm sido desenvolvidos (KRAUTHEIM e GOLLNICK, 2004; LAYTON, 2006; ZAENGLEIN, 2008), dentre eles a isotretinoína e o adapaleno, que são os retinóides mais prescritos na Europa (THIELITZ *et al.*, 2006). O tazaroteno, a motretinida, o retinol  $\beta$ -glicuronídeo e o retinaldeído são exemplos de outros retinóides tópicos utilizados na terapia anti-acne (KRAUTHEIM e GOLLNICK, 2004).

Para a maioria das formas de *acne vulgaris*, os retinóides tópicos são utilizados como primeiro tratamento, além de serem essenciais para a manutenção

da terapia quando o tratamento oral é interrompido. Para melhores resultados, eles devem ser utilizados no início do desenvolvimento da acne, devem ser aplicados em toda a área afetada, e combinados com terapia antimicrobiana quando lesões inflamatórias estão presentes (GOLLNICK *et al.*, 2003). A monoterapia de retinóides tópicos é utilizada principalmente quando os pacientes apresentam comedões não inflamatórios (RIGOPOULOS *et al.*, 2004).

Os retinóides tópicos apresentam atividade comedolítica e anticomedogênica, além disso, inibem a formação e reduzem o número de microcomedões de forma dose-dependente, influenciam a proliferação e diferenciação de células do epitélio folicular, expulsando comedões existentes e reduzem lesões não inflamatórias e inflamatórias. Muitos ainda exercem atividade imunomodulatória direta (KRAUTHEIM e GOLLNICK, 2003; LAYTON, 2006; THIELITZ *et al.*, 2006; ZAENGLEIN, 2008). A aplicação tópica dos retinóides também altera o microclima folicular e promove aumento da penetração de outros compostos como antibióticos tópicos e peróxido de benzoíla (GOLLNICK *et al.*, 2003). Cabe ressaltar que nenhum tratamento tópico é efetivo em reduzir a produção de sebo e que a terapia tópica combinada é capaz de atuar simultaneamente em três dos quatro principais fatores patogênicos envolvidos na acne (KRAKOWSKI *et al.*, 2008).

A vantagem da utilização dos retinóides tópicos sobre os sistêmicos ocorre sob o ponto de vista toxicológico, pois os efeitos adversos são minimizados e eles ainda contribuem para uma eficácia localizada (ROLEWSKI, 2003). Em geral, os efeitos adversos associados ao retinóides tópicos são exacerbação ocasional das lesões inflamatórias no início do tratamento, irritações cutâneas como dermatites, eritema e descamação, e exacerbação da acne após o término do tratamento. Para minimizar estes efeitos, deve-se iniciar as aplicações tópicas com baixas concentrações de fármaco e aplicar hidratantes não comedogênicos diariamente (LAYTON, 2006; KRAKOWSKI *et al.*, 2008; ZAENGLEIN, 2008).

A penetração transdérmica e a biodisponibilidade sistêmica resultante da aplicação tópica de retinóides ainda não foram largamente consideradas e, sabendo-se que embriotoxicidade e teratogenicidade são os maiores obstáculos a serem avaliados no uso terapêutico dos retinóides, informações sobre a farmacocinética

sistêmica após uso tópico são importantes e devem ser ponderadas (KRAUTHEIM e GOLLNICK, 2003).

Apesar das concentrações plasmáticas de retinóides após sua aplicação tópica serem menores em relação às variações diárias dos retinóides basais, naturalmente encontradas no plasma (NAU, 2001), ainda não há consenso sobre o uso seguro dessa classe de fármacos durante a gravidez e o risco individual de embriopatia não pode ser excluído (KRAUTHEIM e GOLLNICK, 2003).

Pacientes do sexo feminino que utilizam retinóides tópicos devem ser alertadas para evitar a gravidez e interromper imediatamente o tratamento na ocorrência de concepção, uma vez que o uso deve ser evitado principalmente no primeiro trimestre (LAYTON, 2006). Na Alemanha, a administração tópica de retinóides não é permitida durante toda gravidez, no entanto, métodos contraceptivos durante o tratamento não são requeridos. Já nos Estados Unidos, uma efetiva contracepção é recomendada durante todo o tratamento tópico (KRAUTHEIM e GOLLNICK, 2003).

### **3.2. Isotretinoína tópica**

A isotretinoína aplicada topicamente é efetiva em acne de leve a moderada, porém, ao contrário da sua forma oral, não é efetiva no tratamento de acne severa e não reduz o tamanho das glândulas sebáceas, nem suprime a produção de sebo. Encontra-se disponível na forma de gel e atua similarmente à tretinoína, no entanto, causa menor irritação cutânea, provavelmente porque a isotretinoína deve ser convertida metabolicamente em tretinoína para exercer o seu efeito terapêutico (SHALITA, 2001; GOLLNICK *et al.*, 2003; KRAUTHEIM e GOLLNICK, 2003). A efetividade da isotretinoína tópica é semelhante à relatada para tretinoína e adapaleno, levando a redução de 46 % a 78 % das lesões não-inflamatórias e 24 % a 55 % das lesões inflamatórias após 12 a 14 semanas de tratamento (GOLLNICK *et al.*, 2003; THIELITZ *et al.*, 2006).

O interesse na biodisponibilidade sistêmica da isotretinoína aplicada topicamente está relacionado com a sua ação teratogênica, cujo tema é um

importante ponto de debate em relação a segurança no uso clínico dessa substância (HOOGDALEM, 1998).

Jensen e colaboradores (1991) submeteram 12 homens com pele acneica ao uso contínuo de gel isotretinoína a 0,05% por 30 dias e avaliaram a penetração cutânea do fármaco. Os pesquisadores não observaram alterações dos níveis plasmáticos da isotretinoína em relação à linha de base e afirmaram que os efeitos adversos encontrados foram apenas cutâneos. No entanto, o limite de quantificação do método analítico empregado foi considerado alto (20 ng/mL), não permitindo observar as possíveis alterações plasmáticas decorrentes do uso tópico continuado.

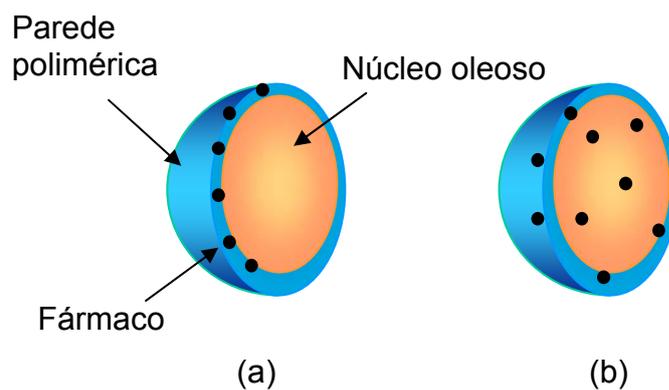
Em um estudo mais recente, Chen e colaboradores (1997) avaliaram a absorção transdérmica da isotretinoína após aplicação de 10 g de creme a 0,1% através da pele foto-lesada após uso contínuo por 42 dias e consideraram-na clinicamente insignificante. Dessa maneira, o uso tópico de isotretinoína exporia o paciente a um risco mínimo de toxicidade sistêmica. A pele foto-lesada, no entanto, comporta-se de modo diferente da pele acneica, não podendo-se extrapolar os resultados para pacientes com acne. Considerando a potencialidade de efeitos teratogênicos ocasionados pela isotretinoína sistêmica e que ainda não há consenso sobre o uso seguro da isotretinoína tópica durante a gravidez, pacientes que utilizam este fármaco topicamente devem evitar a concepção durante o tratamento (KRAUTHEIM e GOLLNICK, 2003).

Uma das maiores desvantagens da terapia tópica com os retinóides, incluindo a isotretinoína, no tratamento da acne são os problemas de tolerabilidade, pois eritema, pele seca, escamação e irritação podem levar a descontinuidade do tratamento. Nesse contexto, o desenvolvimento de estratégias que minimizem a irritação causada pelos retinóides e que preservem ou até mesmo aumentem os seus benefícios terapêuticos, estão sendo freqüentemente estudados (LEYDEN, 1998). Dentre as estratégias que podem ser empregadas citam-se os sistemas nanoestruturados.

#### 4. Sistemas nanoestruturados

Dentre os sistemas carreadores destacam-se os sistemas nanométricos coloidais ou nanopartículas poliméricas. Dentre as nanopartículas poliméricas, ressaltam-se as nanocápsulas, pois apresentam alto potencial de encapsulamento de substâncias, especialmente fármacos lipofílicos, são capazes de controlar a liberação de fármacos em sítios de ação específicos, otimizar a velocidade de cedência, gerando respostas adequadas por períodos de tempo prolongados, aumentar a estabilidade *in vivo* e de armazenamento, otimizar regimes de dosagens de substâncias, e ainda, melhorar o índice terapêutico ao aumentar a eficácia e/ou reduzir a toxicidade de fármacos, reduzindo a absorção sistêmica (MEIER, 2000; BARRATT, 2003; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; GUTERRES *et al.*, 2007).

As nanocápsulas (Figura 3) são compostas por um invólucro polimérico disposto ao redor de uma cavidade oleosa e apresentam diâmetro inferior a 1  $\mu\text{m}$ . O fármaco pode estar dissolvido na cavidade e/ou adsorvido à parede polimérica (SOPPIMATH *et al.*, 2001; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). Dentre os polímeros comumente utilizados, destaca-se a poli( $\epsilon$ -caprolactona) devido a sua biocompatibilidade, biodegradabilidade e propriedades mecânicas (GUTERRES *et al.*, 2007).



**Figura 3.** Representação de nanocápsulas: a) fármaco adsorvido na parede polimérica; b) fármaco disperso por toda a partícula (Adaptado de SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

Na literatura encontram-se diversos métodos de preparação de nanocápsulas e de uma forma geral, são classificados em métodos baseados em polimerização de monômeros dispersos *in situ* e em polímeros pré-formados (SCHAFFAZICK *et al.*,

2003). Dentre estes métodos, a preparação de nanocápsulas pela técnica de nanoprecipitação tem sido amplamente estudada, pois apresenta uma série de vantagens as quais incluem simplicidade, eficiência e reprodutibilidade em formar pequenas partículas com alta capacidade de encapsulação de fármacos (JIMÉNEZ *et al.*, 2004; GUTERRES *et al.*, 2007).

A aplicação tópica de carreadores coloidais tem como objetivo promover uma maior retenção do fármaco no sítio de administração (BARRATT, 2003). Isso ocorre, pois esses vetores são capazes de modular a difusão transdérmica ao modificar a atividade e a partição da molécula, podendo alterar a farmacocinética do fármaco e a biodistribuição pela pele (CEVC, 2004). Jennings e colaboradores (2000) demonstraram que nanopartículas lipídicas sólidas de vitamina A aumentaram a residência da vitamina na pele sem, no entanto, aumentar o transporte transdérmico.

A liberação sustentada de fármacos nanoencapsulados pode suprir a pele por um período de tempo prolongado, além de propiciar um tratamento diretamente no local da inflamação, apresentando a possibilidade de reduzir a absorção sistêmica e os efeitos colaterais em sítios não específicos, reduzindo a irritação provocada pelo fármaco sobre o local de administração e proporcionando índices terapêuticos mais adequados (YOKOYAMA e OKANO, 1996).

O uso de materiais poliméricos para encapsulação de fármacos é importante para mascarar propriedades físico-químicas intrínsecas às substâncias, facilitando a penetração cutânea. As estruturas da pele, por sua vez, formam canais que permitem que as nanopartículas alcancem camadas mais profundas de onde o fármaco é gradualmente liberado por difusão passiva (ALVAREZ-ROMÁN *et al.* 2004a).

Alvarez-Román e colaboradores (2004b), com o intuito de avaliar a influência do tamanho das partículas no transporte de substâncias pela pele, realizaram um estudo utilizando microscopia confocal. Os resultados mostraram que as nanopartículas acumulam-se preferencialmente no ducto folicular, de maneira que quanto menor a partícula (20 nm) maior o acúmulo nessa região.

O mecanismo de penetração cutânea do minoxidil nanoencapsulado e a influência do tamanho das partículas foram avaliados por Shim e colaboradores (2004). Formulações contendo partículas de 40 ou 130 nm foram aplicadas em pele de “porcos da Índia”, com e sem pêlo, utilizando células de difusão de Franz. Os pesquisadores demonstraram que as nanopartículas foram capazes de liberar eficientemente o minoxidil na pele e que o folículo piloso representa a principal via de penetração utilizada. Além disso, verificaram que quanto menor a partícula, maior a penetração do fármaco. Para as membranas com pêlo, a permeação das partículas de 40 nm foi 1,5 vezes maior na epiderme e 1,7 vezes maior na solução receptora quando comparada as partículas de 130 nm. Já para as membranas sem pêlo o tamanho das partículas não influenciou no comportamento de permeação do minoxidil.

A influência do polímero poli( $\epsilon$ -caprolactona) na liberação de fármacos de sistemas nanoestruturados através da pele foi investigada por Alves e colaboradores (2007), através de um estudo *in vitro* com nimesulida. Os autores relatam que as moléculas de fármaco nanoencapsulado com este polímero não são capazes de atravessar a pele, aumentando a sua residência no estrato córneo sem, no entanto, aumentar o transporte transdérmico, e conseqüentemente, a absorção. Os autores também verificaram que a poli( $\epsilon$ -caprolactona) apresenta alta afinidade pela camada mais superficial da pele e que o gel contendo nanocápsulas apresenta extensa penetração tanto no estrato córneo quanto nas demais camadas da epiderme e na derme. A explicação para esses achados pode estar no fato de que a maior área superficial dos nanocarreadores possibilita aumento do contato do fármaco nanoencapsulado com o estrato córneo, aumentando a sua liberação nas primeiras camadas da pele e o seu tempo de residência como relatado previamente na literatura (JENNING *et al.*, 2000; ALVAREZ-ROMÁN *et al.*, 2004b).

Nenhum estudo com nanocápsulas poliméricas de isotretinoína encontra-se relatado na literatura, entretanto, dois trabalhos foram encontrados associando a isotretinoína a nanocarreadores diferentes.

Recentemente, um grupo de pesquisadores chineses desenvolveu nanopartículas lipídicas sólidas de isotretinoína com o objetivo de aplicar a formulação topicamente (LIU *et al.*, 2007). Os autores avaliaram a penetração da

isotretinoína a partir das formulações de nanopartículas lipídicas sólidas utilizando pele de rato como membranas em células de difusão de Franz. A permeação *in vitro* mostrou que, apesar da quantidade de fármaco presente no estrato córneo após aplicação das nanopartículas lipídicas sólidas não diferir significativamente da quantidade encontrada após aplicação do fármaco livre, a isotretinoína não foi encontrada no fluido receptor indicando que as formulações conseguem evitar a captação sistêmica de isotretinoína, aumentando significativamente a quantidade de fármaco acumulado na pele, sendo um carreador de liberação tópica de isotretinoína bastante promissor.

Iole e colaboradores (2005) avaliaram a fotoestabilidade da isotretinoína e da tretinoína incorporadas em lipossomas e em solução etanólica. Os autores observaram uma rápida degradação de ambos os fármacos presentes na solução etanólica quando expostas a radiação. Quando incorporadas em lipossomas, tanto a isotretinoína quanto a tretinoína apresentaram melhora da estabilidade, porém, a tretinoína mostrou-se mais estável que a isotretinoína, apresentando um tempo de meia-vida de degradação 12 vezes maior do que a solução. A isotretinoína incorporada em lipossomas mostrou melhora da estabilidade em menor grau provavelmente devido à sua baixa inclusão nos lipossomas, o que se deve à sua estrutura molecular não-linear.

Estudos que avaliam a estabilidade dos retinóides e a sua determinação quantitativa em formulações farmacêuticas são muito importantes, pois os retinóides, incluindo a isotretinoína, apresentam características físico-químicas como fotoinstabilidade, sensibilidade ao calor e rápida oxidação. A instabilidade da isotretinoína é atribuída às duplas ligações conjugadas, ocasionando rápida oxidação e isomerização em outros produtos, especialmente na presença de oxidantes (ar inclusive), luz e calor excessivo (GATTI *et al.*, 2000).

Considerando todos estes fatores, o desenvolvimento de novas formulações tópicos contendo isotretinoína capazes de promover aumento da retenção cutânea nas primeiras camadas da pele, bem como melhorar a sua estabilidade tem sido propostas.

Nesse contexto, nanocápsulas de isotretinoína foram desenvolvidas em nosso grupo de pesquisa visando aumentar a penetração cutânea deste fármaco sem, no entanto, aumentar sua absorção sistêmica, favorecendo o tratamento tópico da acne sem os efeitos adversos comumente apresentados no uso cutâneo. A penetração cutânea *in vivo* em humanos, através da técnica de *tape stripping*, após administração em dose única, bem como a estabilidade dessas nanocápsulas à temperatura ambiente e frente à luz UVA foram avaliadas em uma dissertação de mestrado vinculado a esse Programa de Pós-graduação (FELIPPI, 2008).

De acordo com Felippi (2008), as nanocápsulas de poli( $\epsilon$ -caprolactona) ( $285 \pm 31$  nm) promoveram melhora da estabilidade frente à temperatura ambiente e frente à luz UVA, protegendo a isotretinoína e diminuindo a sua degradação em suspensões aquosas. A isotretinoína livre mostrou tempo de meia-vida aproximadamente sete vezes menor (122,3 min) quando exposta à luz UVA do que a isotretinoína nanoencapsulada (894,50 min). Além disso, Felippi (2008) observou um perfil biexponencial de degradação da isotretinoína nanoencapsulada, sugerindo que 50 % do fármaco encontra-se no núcleo oleoso da partícula e que o restante encontra-se associado à superfície da mesma.

A via percutânea tem sido amplamente utilizada para a administração de agentes anti-acne, possibilitando a manutenção de concentrações terapêuticamente efetivas no tecido alvo e, em teoria, sem o risco de induzir efeitos adversos devido à exposição sistêmica. A avaliação da penetração cutânea de fármacos em tratamentos tópicos é necessária para garantir o seu uso seguro, além de fornecer informações a respeito da sua eficácia. Nesse sentido, a microdiálise e o *tape stripping* se mostram técnicas bastante atraentes para possibilitar essa avaliação (KREILGAARD, 2002; ESCOBAR-CHÁVEZ *et al.*, 2008).

## **5. Microdiálise**

A microdiálise é uma técnica de amostragem *in vivo* adequada para mensurar e monitorar as concentrações livres de fármacos e substâncias endógenas em diversos órgãos e tecidos (DE LA PEÑA *et al.*, 2000). Através dessa técnica, muitos tecidos humanos têm sido estudados, contudo, músculo esquelético, tecido adiposo subcutâneo e a pele são mais comumente utilizados (STAHL *et al.*, 2002).

A técnica consiste em mimetizar as funções de um capilar sanguíneo, ao perfundir com um líquido fisiológico, uma sonda de diálise implantada no tecido (DE LA PEÑA *et al.*, 2000). As sondas de microdiálise humanas são equipadas com uma membrana semipermeável de poliamida e, conforme o gradiente de concentração formado pelo tecido e o dialisado (fluido coletado pela sonda), as substâncias se difundem passivamente através dessa membrana para dentro do líquido de perfusão (diálise ou ganho) ou a partir dele (retrodiálise ou perda) (STAHL *et al.*, 2002). O dialisado é analisado quimicamente e reflete a composição do fluido extracelular no tempo. Macromoléculas não são capazes de atravessar a membrana, simplificando as análises químicas (DE LA PEÑA *et al.*, 2000).

Como resultado da perfusão contínua da sonda de microdiálise, a transferência de fármaco pela membrana e conseqüentemente, o equilíbrio entre o tecido e o dialisado são incompletos, de forma que as concentrações no tecido são sempre maiores que as concentrações correspondentes no dialisado. Para obter concentrações teciduais reais, as sondas devem ser calibradas tanto *in vitro* quanto *in vivo*. A recuperação relativa varia de indivíduo para indivíduo, sendo necessária, portanto, a determinação para cada sonda (STAHL *et al.*, 2002; JOUKHADAR e MULLER, 2005).

A determinação da recuperação relativa é uma das grandes dificuldades encontradas na técnica, sendo definida como a fração da concentração da substância de interesse no dialisado e pode ser determinada por diálise e retrodiálise, entre outros métodos (ARAÚJO *et al.*, 2008).

Estudos *in vitro* ou medidas *ex vivo* de concentrações de fármaco em biópsias de pele não permitem a direta caracterização de perfis de concentração por tempo de fármacos aplicados topicamente. A microdiálise, ao contrário das técnicas tradicionais, ao inserir sondas em diferentes profundidades da pele, consegue gerar informações sobre gradientes de concentração cutânea de fármacos. Além disso, a microdiálise cutânea representa uma alternativa promissora para avaliação da penetração e/ou absorção de fármacos através da pele, pois permite amostragens contínuas de concentrações intersticiais de fármaco na derme, além de ser uma técnica minimamente invasiva, de baixo custo e fácil utilização (MULLER, 2000; KREILGAARD, 2002; STAHL *et al.*, 2002; JOUKHADAR e MULLER, 2005).

O primeiro estudo de microdiálise cutânea em humanos foi realizado por Anderson e colaboradores em 1991, que verificaram a absorção de etanol na pele (ANDERSON *et al.*, 1991 *apud* KREILGAARD, 2002)<sup>3</sup>. Desde então, diversas outras classes de fármacos têm sido estudadas em humanos por microdiálise cutânea como antiinflamatórios e analgésicos (MÜLLER *et al.*, 1997; BENFELDT *et al.*, 1999), hormônios (BENFELDT e GROTH, 1998), antivirais (BORG *et al.*, 1999), psoralenos (TEGEDER *et al.*, 2002), anestésicos (BENFELDT *et al.*, 2007), antibióticos (ORTIZ *et al.*, 2009), entre outros.

Na microdiálise cutânea a sonda é inserida superficialmente na derme, paralela à superfície da pele, com ou sem anestesia local (SCHNETZ e FARTASCH, 2000). Em geral, as sondas de microdiálise introduzidas na pele, pela homogeneidade do tecido, possuem formato linear, o que maximiza a recuperação e minimiza os possíveis danos (DAVIES *et al.*, 2000; KREILGAARD, 2002). Sondas concêntricas também podem ser utilizadas na microdiálise cutânea (SCHNETZ e FARTASCH, 2000; KREILGAARD, 2002).

Teoricamente, o trauma tecidual após a inserção da sonda de microdiálise poderia influenciar os resultados (STAHL *et al.*, 2002). Sabe-se que, embora essa técnica seja minimamente invasiva, a inserção da sonda na pele pode levar a um aumento do fluxo sanguíneo local (SCHNETZ e FARTASCH, 2000). Considerando possíveis alterações no tecido, uma vez que a sonda é inserida, ela é usualmente perfundida pela solução fisiológica por um período de uma hora, permitindo o equilíbrio do tecido lesado (STAHL *et al.*, 2002; JOUKHADAR e MULLER, 2005). Anderson e colaboradores (1994) verificaram mudanças na perfusão sanguínea cutânea através de laser Doppler após a inserção da sonda de microdiálise na pele e concluíram que o fluxo sanguíneo local atinge um equilíbrio aproximadamente 60 minutos após a implantação da sonda, indicando, portanto, que esse tempo é suficiente para a pele restaurar as suas condições.

---

<sup>3</sup> ANDERSON, C.; ANDERSSON, T.; MOLANDER, M. Ethanol absorption across human skin measured by *in vivo* microdialysis technique. *Acta dermato-venereologica*, v. 71, p. 389-393, 1991 *apud* KREILGAARD, M. Assessment of cutaneous drug delivery using microdialysis. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 54, p. S99-S121, 2002.

Groth e Serup (1998), ao avaliarem a influência da anestesia prévia à inserção da sonda, observaram que a anestesia local reduz a intensidade de efeitos vasculares e não afeta o período de equilíbrio. Outros estudos demonstraram, através de análises histológicas ao redor da sonda de diálise que, embora exista um trauma na inserção tópica da sonda, os danos no tecido devido à microdiálise são mínimos, não mostrando infiltração celular na pele nas primeiras 6-10 horas após o início do experimento (SCHNETZ e FARTASCH, 2000).

As principais limitações da microdiálise são os pequenos volumes de amostra, juntamente com baixas concentrações de fármaco, resultando na necessidade de métodos analíticos muito sensíveis. Além disso, a medida de fármacos muito lipofílicos ou altamente ligados às proteínas plasmáticas em geral acarretam problemas por se ligarem as tubulações e a membrana da sonda (SCHNETZ e FARTASCH, 2000; KREILGAARD, 2002).

A lipofilicidade do fármaco de interesse é considerada um dos maiores problemas na amostragem por microdiálise, pois essa característica físico-química influencia significativamente no processo de difusão do fármaco pela membrana da sonda e, conseqüentemente, a recuperação relativa. Para fármacos hidrofílicos, a recuperação relativa das sondas por ganho e perda são iguais, no entanto, isso não ocorre para fármacos com características lipofílicas moderadas ou extremas, de modo que quanto mais lipofílica a molécula, menor a recuperação e maior a relação entre perda e ganho, tornando bastante difícil a determinação da real recuperação *in vivo* (GROTH e JØRGENSEN, 1997; ARAÚJO *et al.*, 2008). Groth e Jorgensen (1997) foram os primeiros a observar essa diferença entre perda e ganho para compostos lipofílicos e a redução da recuperação com o aumento da lipofilicidade.

A recuperação relativa experimental encontrada para compostos lipofílicos não representa a real recuperação do fármaco do meio, ou seja, a real transferência de massa em condições *sink*, pois essa recuperação aparente é resultado da difusão do analito pela membrana da sonda, bem como da ligação à tubulação de microdiálise, restringindo o uso da microdiálise para este tipo de composto (ARAÚJO *et al.*, 2008).

Um estudo utilizando o corticóide lipofílico valerato de 17-betametasona e microdiálise cutânea em humanos foi conduzido por Benfeldt e Groth (1998). Após a aplicação do fármaco em creme 0,1 %, duas vezes ao dia por 48 h em pele normal e pele com dermatite, os pesquisadores constataram que não foi possível detectar valerato de 17-betametasona no dialisado, utilizando-se 2 sondas na derme, indicando o problema das baixas recuperações atingidas *in vivo* para fármacos muito lipofílicos.

Algumas alternativas para superar essa limitação têm sido descritas na literatura, tais como o uso de albumina ou emulsões lipídicas fisiológicas no líquido de perfusão e saturação da membrana da sonda (CARNEHEIM e STÄHLE, 1991; KUROSAKI *et al.*, 1998; TRAUNMÜLLER *et al.*, 2006) Recentemente, tem-se discutido o uso de abordagens matemáticas que permitem modelar a ligação do fármaco na tubulação da sonda, subtraindo-a do processo difusional do analito pela membrana (LINDBERGER *et al.*, 2002; ARAÚJO *et al.*, 2008).

A microdiálise cutânea é uma promissora técnica que pode ser aplicada para a otimização biofarmacêutica de formulações tópicas e para a avaliação da penetração de fármacos aplicados topicamente, nos quais se deseja somente um efeito local (KREILGAARD, 2002). Cabe ressaltar que não há relatos na literatura sobre a avaliação da penetração cutânea da isotretinoína por microdiálise, bem como de nenhum outro retinóide. A associação entre microdiálise cutânea e nanopartículas também não foi encontrada.

## **6. Tape stripping**

A técnica de *tape stripping* é amplamente usada e aceita para estudar a cinética e a penetração de fármacos na pele, permitindo determinar a localização e a distribuição de substâncias no estrato córneo. O *tape stripping*, especialmente nas últimas duas décadas, se tornou umas das principais técnicas investigativas utilizadas tanto na pesquisa quanto em estudos de biodisponibilidade tópica e bioequivalência, sendo proposta pelo FDA em 1998 para este fim (SHAH, 1998; ESCOBAR-CHÁVEZ *et al.*, 2008).

O *tape stripping* se caracteriza por ser uma técnica minimamente invasiva, na qual o estrato córneo é removido seqüencialmente após aplicações repetidas de fitas adesivas, possibilitando determinar a quantidade de fármaco presente na primeira camada da pele (PINKUS, 1951 *apud* ESCOBAR-CHÁVEZ *et al.*, 2008)<sup>4</sup>. Sabe-se que fármacos de uso tópico se distribuem primeiramente pelo estrato córneo e a partir dele, alcançam a epiderme e a derme. Por conseguinte, a concentração de fármaco presente no estrato córneo está diretamente relacionada com a concentração que se difunde para as demais camadas, de modo que a biodisponibilidade na pele pode ser estimada ao se medir a quantidade de fármaco presente no estrato córneo pela técnica de *tape stripping* (SHAH, 1998).

Experimentos de *tape stripping* são relativamente fáceis e simples de serem executados, no entanto, alguns parâmetros podem influenciar a quantidade de fármaco e estrato córneo removidos pela fita adesiva. Estes parâmetros incluem fatores intrínsecos como hidratação da pele, coesão entre as células, região anatômica e diferenças inter-individuais; e fatores extrínsecos, os quais abrangem a pressão na qual a fita é aplicada na pele, a duração da pressão e o processo de remoção da fita (ESCOBAR-CHÁVEZ *et al.*, 2008). Em geral, assume-se que é necessária a aplicação de 10 a 20 fitas adesivas para a completa remoção do estrato córneo e que as primeiras 10 fitas podem representar 90 % da concentração de fármaco presente nessa camada, de modo que as 10 fitas subseqüentes contribuem em menos de 5 % (CARON *et al.*, 1990; BENFELDT *et al.*, 2007).

Este método pode ser aplicado tanto para fármacos de uso tópico cujo sítio de ação é o próprio estrato córneo quanto para os que agem nas demais camadas da pele. Um exemplo são os fármacos antiacne, como a isotretinoína, que agem nos folículos capilares e nas glândulas sebáceas e devem difundir do estrato córneo até a derme para alcançar o seu sítio de ação, indicando que o *tape stripping* pode ser útil na avaliação da penetração cutânea de diversos produtos tópicos (SHAH, 1998).

---

<sup>4</sup> PINKUS, H. Examination of the epidermis by the strip method of removing horny layers. I. Observation on thickness of the horny layer, and on mitotic activity after stripping. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 16, p. 383-386, 1951 *apud* ESCOBAR-CHÁVEZ, J.J.; MERINO-SANJUÁN, V.; LÓPEZ-CERVANTES, M.; URBAN-MORLAN, Z.; PIÑÓN-SEGUNDO, E.; QUINTANAR-GUERRERO, D.; GANEM-QUINTANAR, A. The tape stripping technique as a method for drug quantification in skin. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Science*, v. 11, p. 104-130, 2008.

Basicamente, o *tape stripping* como método de avaliação da penetração cutânea pode ser realizado de duas formas, *in vivo* ou *in vitro*. O método *in vitro* apresenta uma série de vantagens sobre o *in vivo*, pois podem ser utilizadas tanto pele humana quanto pele de outras espécies, diversas replicatas podem ser executadas no mesmo ou em diferentes indivíduos, animais vivos não são utilizados, diversas formas farmacêuticas podem ser estudadas, como sólidos e granulados, e o impacto dos danos na pele podem ser avaliados evitando aspectos éticos. A única limitação associada à abordagem *in vitro* é que as condições *sink* ocasionadas pelo fluxo sanguíneo periférico na derme podem não ser totalmente reproduzidas. Entretanto, considerando que a permeação de substâncias através da pele é primariamente um processo passivo e que diversos estudos utilizando essa abordagem *in vitro* foram realizados, propõe-se que esse método é bastante útil e difundido para o estudo de produtos de aplicação tópica (DIEMBECK *et al.*, 1999; OECD, 2004).

Nesse contexto, diversas tentativas foram realizadas para encontrar métodos de *tape stripping in vitro* apropriados para o estudo do efeito e da concentração local ou sistêmica de fármacos através da pele. Um destes métodos é o de células de difusão de Franz que é amplamente utilizado e apresenta resultados confiáveis e de baixo custo (SARTORELLI *et al.*, 2000; WAGNER *et al.*, 2001).

Geralmente, em experimentos *in vitro*, utilizando-se células de difusão de Franz para a realização de *tape stripping*, são utilizados um compartimento doador, uma membrana natural, que pode ser de pele humana retirada de cirurgia plástica (ALVES *et al.*, 2007), pele humana de cadáveres (GOOSEN *et al.*, 2002), pele de rato (LIU *et al.*, 2007) ou pele de porco (ALVAREZ-ROMÁN *et al.*, 2004a; ALVAREZ-ROMÁN *et al.*, 2004b; WEISS-ANGELI, 2007) e um compartimento receptor. As membranas naturais podem ser utilizadas, pois as propriedades de permeabilidade da pele são mantidas após a excisão do corpo, visto que a principal barreira de difusão é o estrato córneo não-viável (DIEMBECK *et al.*, 1999).

O compartimento doador influencia amplamente a penetração de fármacos através da pele, pois o fluxo de uma determinada molécula do fármaco é resultado da sua atividade termodinâmica e da alteração das propriedades de barreira da pele provocadas pelo veículo (SARTORELLI *et al.*, 2000). Veículos tópicos convencionais

como cremes ou géis, agem predominantemente exercendo o seu efeito ao liberar o fármaco na superfície da pele e as moléculas, então, se difundem para as demais camadas. A extensão e a duração da difusão dependem das características físico-químicas do próprio fármaco (FOLDVARI, 2000).

Com relação à escolha do tipo de membrana a ser utilizada em experimentos de *tape stripping* com célula de Franz, a pele humana é a mais indicada para melhor prever a penetração cutânea. Com o intuito de minimizar a variabilidade dos resultados devido às diferenças de permeabilidade (causada pela espessura do estrato córneo e pela densidade de folículos) entre regiões anatômicas distintas, deve-se padronizar o local de remoção da pele. Em geral, a pele do abdômen de mulheres é freqüentemente utilizada e, devido a grande variabilidade entre os indivíduos, o teste deve ser realizado com peles provenientes de diferentes doadores. A pele humana pode ser obtida através de cirurgias plásticas ou de cadáveres, contudo, muitas vezes, a disponibilidade é limitada e os aspectos éticos devem ser levados em consideração (SARTORELLI *et al.*, 2000).

A pele animal difere da pele humana em vários sentidos, sendo mais permeável, de modo que os resultados obtidos não podem ser correlacionados diretamente com a pele humana (SHAH *et al.*, 1998). Comumente, os animais apresentam maior densidade de folículos pilosos e espessura mais fina do estrato córneo. No entanto, a pele animal é mais fácil de ser adquirida e padronizada. A pele de porco é a mais recomendada por se assemelhar morfológicamente à pele humana e pela facilidade de aquisição (DIEMBECK *et al.*, 1999; FERNANDEZ *et al.*, 2002; BARBERO e FRASCH, 2009). A pele animal pode ser utilizada tanto para avaliar a permeabilidade relativa de fármacos quanto para comparações *in vitro* e *in vivo* (SARTORELLI *et al.*, 2000).

A diferença de permeabilidade encontrada para diferentes espécies e regiões anatômicas pode ser explicada por duas grandes teorias. Os apêndices cutâneos, como os folículos pilosos, agem como rota de penetração de substâncias, podendo modificar a absorção na derme. Além disso, o próprio estrato córneo que apresenta grande variabilidade na composição dependendo da espécie, representa um desafio para a absorção (POET e MCDUGAL, 2002).

A escolha do fluido receptor também influencia a penetração cutânea de fármacos e tem como objetivo, mimetizar a circulação sanguínea *in vivo*. Como principal exigência, o fármaco deve ser suficientemente solúvel na solução receptora para garantir condições *sink*, sem permitir que a solubilidade limite a difusão. Isto é particularmente importante para a difusão de compostos lipofílicos, cuja solubilidade em soluções aquosas tende a ser baixa (SARTORELLI *et al.*, 2000; OECD, 2004).

Diversos estudos que utilizam a técnica de *tape stripping* para avaliação da penetração cutânea de fármacos *in vitro*, utilizando pele humana e pele de porco, bem como a comparação da penetração entre modelos *in vivo* e *in vitro*, têm sido relatados na literatura.

Barbero e Frasch (2009) realizaram uma revisão quantitativa comparando a permeabilidade da pele humana com a da pele de porco para diferentes fármacos, avaliando a variabilidade inter e intra-espécies. O coeficiente de correlação de Pearson foi calculado para comparar a permeabilidade *in vitro* da pele de porco com a humana, ficando em 0,88. A média do coeficiente de variação intra-espécie foi de 21 % para a pele de porco e 35 % para a pele humana e a média do coeficiente de variação inter-espécie ficou em 37 %, considerando um tamanho amostral de 41 estudos avaliados. Considerando os resultados obtidos, os autores concluem que a pele de porco é um bom modelo para avaliar a permeabilidade, sendo uma excelente alternativa para a pele humana em experimentos de permeabilidade *in vitro*. Além disso, a pele de porco apresenta menor variabilidade, de modo que a escolha do tipo de pele a ser utilizada depende da proposta do estudo e do composto de investigação.

Herkenne e colaboradores (2006) investigaram a possibilidade de substituir a pele humana na avaliação da biodisponibilidade de produtos tópicos em estudos de bioequivalência por pele de orelha de porco, de modo que experimentos *in vitro* utilizando a pele de porco foram comparados com estudos *in vivo* em voluntários humanos. Para o estudo, foram utilizadas quatro formulações de ibuprofeno, sendo possível concluir que os parâmetros que caracterizam difusão e partição do fármaco no estrato córneo no modelo *in vitro* foram compatíveis com os parâmetros *in vivo* após um período de aplicação de 30 minutos. Ainda, o resultado *in vitro* em concentrações de não *steady-state* pode ser usado para predizer perfis de

concentração *in vivo* do fármaco através do estrato córneo, após a administração de uma formulação por 3 horas. Os autores concluíram, portanto, que a pele de orelha de porco utilizada *in vitro* é uma ferramenta promissora para avaliação e otimização de formulações de uso tópico.

Wagner e colaboradores (2000), utilizando pele humana obtida de cirurgia plástica, avaliaram a penetração do ácido flufenâmico no estrato córneo *in vitro* e correlacionaram estes resultados com a penetração *in vivo* do mesmo fármaco. Os pesquisadores obtiveram uma boa correlação entre a quantidade de fármaco presente no estrato córneo das peles *in vitro* e a quantidade presente na pele humana *in vivo* indicando que há a possibilidade de prever a concentração de ácido flufenâmico *in vivo* a partir de estudos *in vitro*.

A avaliação da penetração cutânea pela técnica de *tape stripping* e células de difusão de Franz, após a inclusão de fármacos de uso tópico em sistemas nanoparticulados também vem sendo amplamente estudada por diversos grupos de pesquisa.

Lboutonne e colaboradores (2002) avaliaram a penetração cutânea de nanocápsulas de poli( $\epsilon$ -caprolactona) de clorexidina em pele de porco utilizando *tape stripping* em célula de difusão de Franz. Foi observada uma liberação controlada do fármaco a partir das nanocápsulas, ocasionando aumento da liberação de clorexidina, provocando um contato direto do carreador com a superfície da pele e os folículos pilosos.

A penetração cutânea do metoxicinamato de octila nanoencapsulado [poli( $\epsilon$ -caprolactona)] e livre no estrato córneo de pele de porco através de *tape stripping in vitro* em célula de difusão de Franz foi avaliada por Alvarez-Román e colaboradores (2004a). Os autores verificaram que a quantidade de fármaco retido no estrato córneo foi 3,4 vezes maior quando associado à nanocápsulas do que na forma livre. Além disso, após 6 horas de experimento, o filtro solar não foi encontrado na solução receptora, sugerindo que as nanocápsulas não são capazes de aumentar a permeação do fármaco através da pele. O aumento da atividade termodinâmica e a maior área superficial das nanocápsulas podem justificar os resultados obtidos.

Lipossomas contendo ácido retinóico foram desenvolvidos por Fresno-Contreras e colaboradores (2005) com o intuito de alterar os parâmetros de difusão do fármaco na pele e reduzir a absorção sistêmica. Para tanto, a penetração do fármaco em pele de abdômen de rato foi avaliada pela técnica de *tape stripping in vitro* em células de difusão de Franz. Os resultados mostraram que a encapsulação do ácido retinóico prolonga a liberação do fármaco e aumenta a retenção na pele.

O efeito da inclusão de ácido flufenâmico em nanopartículas de ácido poli(lático-co-glicólico) no transporte do fármaco através da pele humana *in vitro* foi investigado por Luengo e colaboradores (2006). A penetração cutânea foi analisada por *tape stripping* e pelo método de Saarbrücken, no qual a própria pele age como um meio receptor, e a permeação foi realizada através de células de difusão de Franz. Os autores não observaram diferenças na quantidade de fármaco presente no estrato córneo quando comparadas as formulações de fármaco livre e nanoencapsulado. No experimento de permeação, após um curto período de incubação (< 12 horas), a acumulação de fármaco nas camadas profundas da pele bem como o transporte através da pele mostrou-se menor para o fármaco nanoencapsulado, no entanto, essa diferença não foi significativa. Após um longo período de incubação (> 12 horas), o ácido flufenâmico nanoencapsulado apresentou aumento significativo do transporte e acumulação em comparação ao fármaco livre.

O estudo realizado por Felippi (2008) em nosso grupo de pesquisa demonstrou que, através da técnica de *tape stripping* em humanos *in vivo*, a penetração no estrato córneo 15 min após a aplicação cutânea de hidrogel de hidroxietilcelulose contendo 0,05 % de isotretinoína nanoencapsulada foi, em média, 31 % maior do que a penetração da isotretinoína livre aplicada no mesmo veículo na mesma concentração. Após esse tempo, a penetração do fármaco não mostrou diferença significativa na forma livre ou nanoencapsulada até 6 horas de experimento.

## 7. Referências

ALENCASTRE, J.B.; BENTLEY, M.V.L.B.; GARCIA, F.S.; MORAGAS, M.; VILADOT, J.L.; MARCHETTI, J.M. A study of the characteristics and *in vitro* permeation

---

properties of CMC/chitosan microparticles as a skin delivery system for vitamin E. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 42, p. 69-76, 2006.

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

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

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

ANDERSON, C.; ANDERSON, T.; WARDELL, K. Changes in skin circulation after insertion of a microdialysis probe visualized by laser-doppler perfusion imaging. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 102, p. 807-811, 1994.

ARAÚJO, B.V.; SILVA, C.F.; HAAS, S.E.; DALLA COSTA, T. Microdialysis as a tool to determine free kidney levels of voriconazole in rodents: A model to study the technique feasibility for a moderately lipophilic drug. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 47, p. 876-881, 2008.

ASBILL, C.S.; MICHNIAK, B.B. Percutaneous penetration enhancers: local versus transdermal activity. *Pharmaceutical Science & Technology Today*, v. 3, n. 1, p. 36-41, 2000.

AYER, J.; BURROWS, N. Acne: more than skin deep. *Postgraduate Medical Journal*, v. 82, p. 500-506, 2006

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

BARRY, B. Liberação Transdérmica de Fármacos. In: AULTON, M.E. *Delineamento de Formas Farmacêuticas*. 2.ed. Porto Alegre: Artmed, p. 504-536, 2005.

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

BAUMANN, L. *Cosmetic Dermatology: principles and practice*. New York: McGraw-Hill, 2002.

BENFELDT, E.; GROTH, L. Feasibility of measuring lipophilic or protein-bound drugs in the dermis by *in vivo* microdialysis after topical or systemic drug administration. *Acta dermato-venereologica*, v. 78, p. 274-278, 1998.

BENFELDT, E.; SERUP, J.; MENNÉ, T. Effect of barrier perturbation on cutaneous salicylic acid penetration in human skin: *in vivo* pharmacokinetics using microdialysis and non-invasive quantification of barrier function. *British Journal of Dermatology*, v. 140, p. 739-748, 1999.

BENFELDT, E.; HANSEN, S. H.; VØLUND, A.; MENNÉ, T.; SHAH, V. P. Bioequivalence of topical formulations in humans: evaluation by dermal microdialysis sampling and the dermatopharmacokinetic method. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 127, p. 170-178, 2007.

BORG, N.; THARSON, E.G.; BENFELDT, E.; GROTH, L.; STÅHLE, L. Distribution to the skin of penciclovir after oral famciclovir administration in healthy volunteers: comparison of the suction blister technique and cutaneous microdialysis. *Acta dermato-venereologica*, v. 79, p. 274-277, 1999.

BRELSFORD, M.; BEUTE, T.C. Preventing and managing the side effects of isotretinoin. *Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery*, v. 27, p. 197-206, 2008.

CARNEHEIM, C.; STÅHLE, L. Microdialysis of lipophilic compounds: a methodological study. *Pharmacology & Toxicology*, v. 69, p. 378-380, 1991.

CARON, J. C.; QUEILLE-ROUSSEL, C.; SHAH, V. P.; SCHAEFER, H. The correlation between the drug penetration and vasoconstriction of hydrocortisone creams in human. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 23, p. 458-462, 1990.

CEVC, G. Lipid vesicles and other colloids as drug carriers on the skin. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 56, p. 675-671, 2004.

CHEN, C.; JENSEN, B.K.; MISTRY, G.; WYSS, R.; ZULTAK, M.; PATEL, I.H.; RAKHIT, A.K. Negligible systemic absorption of topical isotretinoin cream: implications for teratogenicity. *Journal of Clinical Pharmacology*, v. 37, p. 279-284, 1997.

DAVIES, M.I.; COOPER, J.D.; DESMOND, S.S.; LUNTE, C.E.; LUNTE, S.M. Analytical considerations for microdialysis sampling. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 45, p. 169-188, 2000.

DEGIM, I.T. New tools and approaches for predicting skin permeability. *Drug Discovery Today*, v. 11, n. 11/12, 2006.

DE LA PEÑA, A.; LIU, P.; DERENDORF, H. Microdialysis in peripheral tissue. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 45, p. 189-216, 2000.

DIEMBECK, W.; BECK, H.; BENECH-KIEFFER, F.; COURTELLEMONT, P.; DUPUIS, J.; LOVELL, W.; PAYE, M.; SPENGLER, J.; STEILING, W. Test guidelines for *in vitro* assessment of dermal absorption and percutaneous penetration of cosmetic ingredients, *Food and Chemical Toxicology*, v. 37, p. 191-205, 1999.

ESCOBAR-CHÁVEZ, J.J.; MERINO-SANJUÁN, V.; LÓPEZ-CERVANTES, M.; URBAN-MORLAN, Z.; PIÑÓN-SEGUNDO, E.; QUINTANAR-GUERRERO, D.; GANEM-QUINTANAR, A. The tape stripping technique as a method for drug quantification in skin. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Science*, v. 11, p. 104-130, 2008.

FALLON, J.C.; BUCKLEY, A.; MURPHY, G. Allergic contact dermatitis after isotretinoin treatment for acne. *European Academy of Dermatology and Venereology*, v. 22, p. 1377, 2008.

FARRAR, M.D.; INGHAM, E. Acne: Inflammation. *Clinics in Dermatology*, v. 22, p. 380-384, 2004.

FELIPPI, C. *Nanopartículas contendo isotretinoína: preparação, caracterização físico-química, estudo de estabilidade e avaliação da penetração cutânea*. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, 2008.

FERNANDEZ, C.; NIELLOUD, F.; FORTUNÉ, R.; VIAN, L.; MARTI-MESTRES, G. Benzophenone-3: rapid prediction and evaluation using non-invasive methods of *in vivo* human penetration. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 28, p. 57-63, 2002.

FOLDVARI, M. Non-invasive administration of drugs through the skin: challenges in delivery system design. *Pharmaceutical Science & Technology Today*, v. 3, p. 417-425, 2000.

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

GATTI, R.; GIOIA, M. G.; CAVRINI, V. Analysis and stability study of retinoids in pharmaceuticals by LC with fluorescence detection. *Journal of Pharmaceutics and Biomedical Analysis*, v. 23, p. 147-159, 2000.

GHALAMKARPOUR, F.; NASIRI, S. Isotretinoin in treatment of acne: Its efficacy, side effects, and recurrence rate of disease. *Archives of Iranian medicine*, v. 9, p. 228-230, 2006.

GOLLNICK, H.; CUNLIFFE, W.; BERSON, D.; DRENO, B.; FINLAY, A.; LEYDEN, J.J.; SHALITA, A.R.; THIBOUTOT, D. Management of acne: a report from a global alliance to improve outcomes in acne. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 49, p. S1-S37, 2003.

GOOSEN, C.; LAING, T.J.; DU PLESSIS, J.; GOOSEN, T.C.; LU, G-W.; FLYNN, G.L. Percutaneous delivery of thalidomide and its *N*-alkyl analogs. *Pharmaceutical Research*, v. 19, p. 434-439, 2002.

---

GROTH, L.; JØRGENSEN, A. *In vitro* microdialysis of hydrophilic and lipophilic compounds. *Analytica Chimica Acta*, v. 355, p. 75-83, 1997.

GROTH, L.; SERUP, J. Cutaneous microdialysis in man: effects of needle insertion trauma and anaesthesia on skin perfusion, erythema and skin thickness. *Acta dermato-venereologica*, v. 78, p. 5-9, 1998.

GUTERRES, S.S.; ALVES, M.P.; POHLMANN, A.R. Polymeric nanoparticles, nanospheres and nanocapsules for cutaneous applications. *Drug Target Insights*, v. 2, p. 147-157, 2007.

HADGRAFT, J. Skin, the final frontier. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 224, p. 1-18, 2001.

HERKENNE, C.; NAIK, A.; KALIA, Y.N.; HADGRAFT, J.; GUY, R.H. Pig ear skin *ex vivo* as a model for *in vivo* dermatopharmacokinetic studies in man. *Pharmaceutical Research*, v. 23, p. 1850-1856, 2006.

HOOGDALÉM, E.J.V. Transdermal absorption of topical anti-acne agents in man; review of clinical pharmacokinetic data. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, v. 11, p. S13-S19, 1998.

IOLE, G.; CIONE, E.; RISOLI, A.; GENCHI, G.; RAGNO, G. Accelerated photostability study of tretinoin and isotretinoin in liposome formulations. *International Journal of Pharmaceutis*, v. 293, p. 251-260, 2005.

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

JENNING, V.; GYSLER, A.; SCHÄFER-KORTING, M.; GOHLA, S. Vitamin A loaded solid lipid nanoparticles for topical use: occlusive properties and drug targeting to the upper skin. *European Journal of Pharmaceutics Sciences*, v. 49, p. 211-218, 2000.

JENSEN, B.J.; MCGANN, L.A.; KACHEVSKY, V.; FRANZ, T.J. The negligible systemic availability of retinoids with multiple and excessive topical application of isotretinoin 0.05% gel (Isotrex) in patients with acne vulgaris. *Journal of American Academy of Dermatology*, v. 24, p. 425-428, 1991.

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

JOHNSON, A.W. Overview: fundamental skin care – protecting the barrier. *Dermatologic therapy*, v. 17, p. 1-5, 2004.

JOUKHADAR C.; MULLER, M. Microdialysis: Current applications in clinical pharmacokinetic studies and its potential role in the future. *Clinical pharmacokinetics*, v. 44, p. 895-913, 2005.

---

KATSAMBAS, A.D.; CUNLIFFE, W.J. Commentary: acne and its treatment. *Clinics in Dermatology*, v. 22, p. 359, 2004.

KAYMAK, Y.; ILTER, N. The effectiveness of intermittent isotretinoin treatment in mild or moderate acne. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, v. 20, p. 1256-1260, 2006.

KAYMAK, Y.; TANER, E.; TANER, Y. Comparison of depression, anxiety and life quality in *acne vulgaris* patients who were treated with either isotretinoína or topical agents. *International Journal of Dermatology*, v. 48, p. 41-46, 2009.

KRAKOWSKI, A.C.; STENDARDO, S.; EICHENFIELD, L.F. Practical considerations in acne treatment and the clinical impact of topical combination therapy. *Pediatric Dermatology*, v. 25, suppl. 1, p. 1-14, 2008.

KRAUTHEIM, A.; GOLLNICK, H.P.M. Transdermal penetration of topical drugs used in the treatment of acne. *Clinical pharmacokinetics*, v. 42, p. 1287-1304, 2003.

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

KREILGAARD, M. Assessment of cutaneous drug delivery using microdialysis. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 54, p. S99-S121, 2002.

KUROSAKI, Y.; NAKAMURA, S.; SHIOJIRI, Y.; KAWASAKI, H. Lipo-microdialysis: A new microdialysis method for studying the pharmacokinetics of lipophilic substances. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, v. 21, p. 194-196, 1998.

LAYTON, A.M. A review on the treatment of acne vulgaris. *International Journal of Clinical Practice*, v. 60, p. 64-72, 2006.

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

LEYDEN, J.J. Topical treatment of acne vulgaris: Retinoids and cutaneous irritation. *Journal of American Academy of Dermatology*, v. 38, p. S1-4, 1998.

LEYDEN, J.J.; HICKMAN, J.G.; JARRATT, M.T.; STEWART, D.M.; LEVY, S.F. The efficacy and safety of a combination benzoyl peroxide/clindamycin topical gel compared with benzoyl peroxide alone and a benzoyl peroxide/erythromycin combination product. *Journal of Cutaneous Medicine and Surgery*, v. 5, p. 37-42, 2001.

LINDBERGER, M.; TOMSON, T.; STÄHLE, L. Microdialysis sampling of carbamazepine, phenytoin and phenobarbital in subcutaneous extracellular fluid and subdural cerebrospinal fluid in humans: an *in vitro* and *in vivo* study of adsorption to the sampling device. *Pharmacology & Toxicology*, v. 91, p. 158-165, 2002.

---

LIU, J.; HU, W.; CHEN, H.; NI, Q.; XU, H.; YANG, X. Isotretinoin-loaded solid lipid nanoparticles with skin targeting for topical delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 328, p. 191-195, 2007.

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

MARKS, R. The stratum corneum barrier: the final frontier. *The Journal of Nutrition*, v. 134, p. 2017S-2021S, 2004.

MEIER, W. Polymer nanocapsules. *Chemical Society Reviews*, v. 29, p. 295-303, 2000.

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

MÜLLER, M.; MASCHER, H.; KIKUTA, S.; SCHAFER, S.; BRUNNER, M.; DORNER, G.; EICHLER, H.G. Diclofenac concentrations in defined tissue layers after topical administration. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, v. 62, p. 293-299, 1997.

MÜLLER, M. Microdialysis in clinical drug delivery studies. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 45, p. 255-269, 2000.

NANAYAKKARA, G.R.; BARTLETT, A.; FORBES, B.; MARRIOTT, C.; WHITFIELD, P.J.; BROWN, M.C. The effect of unsaturated fatty acids in benzyl alcohol on the percutaneous permeation of three model penetrants. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 301, p. 129-139, 2005.

NAU, H. Teratogenicity of isotretinoin revisited: Species variation and the role of all-trans-retinoic acid. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 45, p. S183-S187, 2001.

ORTIZ, P.G.; HANSEN, S.H.; SHAH, V.P.; MENNÉ, T.; BENFELDT, E. Impact of adult atopic dermatitis on topical drug penetration: assessment by cutaneous microdialysis and tape stripping. *Acta dermato-venereologica*, v. 89, p. 33-38, 2009.

Organization for Economic Cooperation and Development (OECD): Skin absorption: *in vitro* method, test guideline No 428. *Guidelines for the Testing of Chemicals*. Paris, OECD, v. 1, n. 4, p. 1-8, 2004.

POET, T.S.; MCDUGAL, J.N. Skin absorption and human risk assessment. *Chemico-Biological Interactions*, v. 140, p. 19-34, 2002.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; MOORE, P.K. *Farmacologia*. 5.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.

---

RAWLINGS, A.V.; HARDING, C.R. Moisturization and skin barrier function. *Dermatology Therapy*, v. 17, p. 43-48, 2004.

RHEIN, L.D.; PEOPLES, C.; WOLF, B. Skin, hair and nail structure and function. In: SCHLOSSMAN, M.L. *The Chemistry and Manufacture of Cosmetics*. 3.ed. Carol Stream: Allured Publishing Corporation, v. I, p. 87-136, 2000.

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

ROLEWSKI, S.L. Clinical review: topical retinoids. *Dermatology Nursing*, v. 15, p. 447-464, 2003.

SARTORELLI, P.; ANDERSEN, H.R.; ANGERER, J.; CORISH, J.; DREXLER, H.; GOEN, T.; GRIFFIN, P.; HOTCHKISS, S.A.M.; LARESE, F.; MONTOMOLI, L.; PERKINS, J.; SCHMELZ, M.; VAN DE SANDT, J.; WILLIAMS, F. Percutaneous penetration studies for risk assessment. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 8, p. 133-152, 2000.

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

SCHNETZ, E.; FARTASCH, M. Microdialysis for the evaluation of penetration through the human skin barrier - a promising tool for the future research? *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 12, p. 165-174, 2001.

SHAH, V.P. Topical dermatological drug product NDAs and ANDAs - *in vivo* bioavailability, bioequivalence, *in vitro* release and associated studies. US Department of Health and Human Services, Rockville, p. 1-19, 1998.

SHAH, V.P.; FLYNN, G.L.; YACOBI, A.; MAIBACH, H.I.; BON, C.; FLEISCHER, N.M.; FRANZ, T.J.; KAPLAN, S.A.; KAWAMOTO, J.; LESKO, L.J.; MARTY, J.; PERSHING, L.K.; SCHAEFER, H.; SEQUEIRA, J.A.; SHRIVASTAVA, S.P.; WILKIN, J.; WILLIAMS, R.L. Bioequivalence of topical dermatological dosage forms – Methods of evaluation of bioequivalence. *Pharmaceutical Research*, v. 15, n. 2, 1998.

SHALITA, A.R. The integral role of topical and oral retinoids in the early treatment of acne. *European Academy of Dermatology and Venereology*, v. 15, p. 43-49, 2001.

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

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

- SOPPIMATH, K. S.; AMINABHAVI, T. M.; KULKARNI, A. R.; RUDZINSKI, W. E. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *Journal of Controlled Release*, v. 70, p. 1-20, 2001.
- STAHL, M.; BOUW R.; JACKSON A.; PAY, V. Human Microdialysis. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, v. 3, p. 165-178, 2002.
- STRAHAN, J.E.; RAIMER, S. Isotretinoin and the controversy of psychiatric adverse effects. *International Journal of Dermatology*, v. 45, p. 789-799, 2006.
- TAN, J.K. Psychosocial impact of *acne vulgaris*: evaluating the evidence. *Skin Therapy Letter*, v. 9, p. 1-3, 2004.
- TEGEDER, I.; BRAUTIGAM, L.; PODDA, M.; MEIER, S.; KAUFMANN, R.; GEISLINGER, G.; GRUNDMANN-KOLLMANN, M. Time course of 8-methoxypsoralen concentrations in skin and plasma after topical (bath and cream) and oral administration of 8-methoxypsoralen. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, v. 71, p. 153-161, 2002.
- THIELITZ, A.; KRAUTHEIM, A.; GOLLNICK, H. Update in retinoid therapy of acne. *Dermatologic Therapy*, v. 19, p. 272-279, 2006.
- THIBOUTOT, D. Acne: Hormonal concepts and therapy. *Clinics in Dermatology*, v. 22, p. 419-428, 2004.
- TOUITOU, E.; MEIDAN, V.M.; HORWITZ, E. Methods for quantitative determination of drug localized in the skin. *Journal of Controlled Release*, v. 56, p. 7-21, 1998.
- TRAUNMÜLLER, F.; STEINER, I.; ZEITLINGER, M.; JOUKHADAR, C. Development of a high-performance liquid chromatography method for the determination of caspofungin with amperometric detection and its application to *in vitro* microdialysis experiments. *Journal of Chromatography B*, v. 843, p. 142-146, 2006.
- WAGNER, H.; KOSTKA, K-H.; LEHR, C-M.; SCHAEFER, U.F. Drug distribution in human skin using two different *in vitro* test systems: comparison with *in vivo* data. *Pharmaceutical Research*, v. 17, p. 1475-1481, 2000.
- WAGNER, H.; KOSTKA, K-H.; LEHR, C-M.; SCHAEFER, U.F. Interrelation of permeation and penetration parameters obtained from *in vitro* experiments with human skin and skin equivalents. *Journal of Controlled Release*, v. 75, p. 283-295, 2001.
- WEISS-ANGELI, V. *Desenvolvimento e caracterização de formulações fotoprotetoras contendo nanocápsulas*. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, 2007.
- WILLIAMS, F.M. *In vitro* studies – how good are they at replacing *in vivo* studies for measurement of skin absorption. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 21, p.199-203, 2006.

YATES, V. Acne: current treatment. *Clinical Medicine*, v. 5, p. 569-572, 2005.

YOKOYAMA, M.; OKANO, T. Targetable drug carriers: present status and a future perspective. *Advanced Drug Delivery Reviews*. v. 21, p. 77-80, 1996.

YOSIPOVITCH, G.; TANG, M.; DAWN A.G.; CHEN, M.; GOH C.L.; CHAN, Y.H.; SENG, L.F. Study of psychological stress, sebum production and *acne vulgaris* in adolescents. *Acta dermato-venereologica*, v. 87, p. 135-139, 2007.

ZAENGLEIN, A.L. Topical retinoids in the treatment of *acne vulgaris*. *Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery*, v. 27, p. 177-182, 2008.

ZOUBOULIS, C.C. Acne and sebaceous gland function. *Clinics in Dermatology*, v. 22, p. 360-366, 2004.

ZOUBOULIS, C.C. The truth behind this undeniable efficacy-recurrence rates and relapse risk factors of acne treatment with oral isotretinoin. *Dermatology*, v. 212, p. 99-100, 2006.



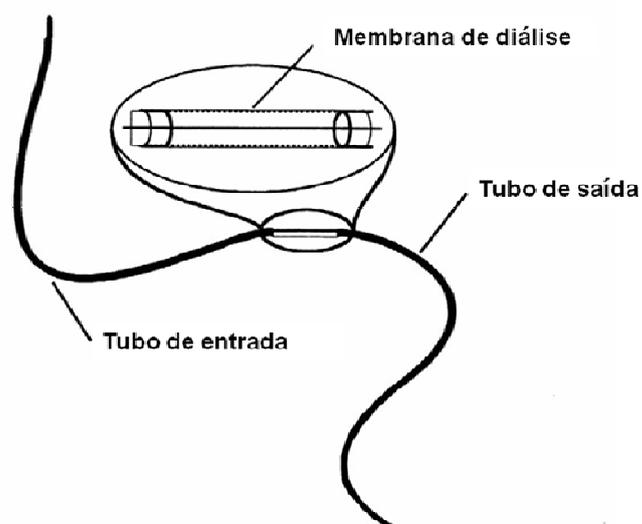




## 1. Introdução

A microdiálise é uma técnica de amostragem contínua bem estabelecida e semi-invasiva que ganhou importante papel tanto em experimentos *in vitro* quanto na investigação de concentrações livres de substâncias endógenas ou exógenas no fluido intersticial ou na biofase (PLOCK e KLOFT, 2005; TASSO *et al.*, 2008).

Basicamente, a microdiálise se baseia na difusão passiva de substâncias através de uma membrana semipermeável, constituinte de uma sonda, que pode estar implantada em tecidos ou em fluidos de interesse (Figura 1). Essa sonda é continuamente perfundida por uma solução fisiológica com fluxo constante (comumente 0,5 – 5  $\mu\text{L}/\text{min}$ ). Em geral, o líquido de perfusão consiste em uma solução aquosa que mimetiza a composição do fluido extracelular com o intuito de prevenir mudanças na composição tanto do dialisado quanto do fluido ao redor da sonda, impedindo a migração de moléculas devido a diferenças osmóticas. O processo de difusão de substâncias pela membrana é dependente do gradiente de concentração, de maneira que moléculas com determinadas massas molares podem se difundir para dentro do líquido de perfusão (diálise ou ganho) ou se difundir a partir dele (retrodiálise ou perda) (DE LANGE *et al.*, 2000; PLOCK e KLOFT, 2005; SCHMIDT *et al.*, 2008).



**Figura 1.** Representação gráfica de uma sonda de microdiálise linear (Adaptado de DAVIES *et al.*, 2000).

Como a sonda é constantemente perfundida por uma solução, condições de equilíbrio nunca são atingidas e, portanto, a concentração encontrada no dialisado representa somente uma fração da concentração real do analito, sendo geralmente menor que os níveis presentes no tecido. Conseqüentemente, há a necessidade de se determinar a recuperação relativa (RR) da sonda, expressa pela razão entre a concentração no dialisado e a real concentração presente no meio investigado (PLOCK e KLOFT, 2005; CHAURASIA *et al.*, 2007). A recuperação relativa, a qual deve ser verificada tanto *in vitro* quanto *in vivo*, devido a diferenças de difusão do fármaco em solução ou no fluido intersticial, pode ser determinada por diálise e retrodiálise, entre outros métodos, e representa um passo crítico para aplicação da microdiálise (ARAÚJO *et al.*, 2008; TASSO *et al.*, 2008).

Diversos fatores experimentais afetam a recuperação relativa da sonda, incluindo temperatura, área e composição da membrana, gradiente de concentração, fluxo de perfusão, propriedades físico-químicas do fármaco, tortuosidade da matriz (*in vivo*). Em geral, quanto maior o fluxo de perfusão, menor a recuperação relativa e quanto maior a temperatura e área da membrana, maior a recuperação relativa (DE LANGE *et al.*, 2000; PLOCK e KLOFT, 2005; CHAURASIA *et al.*, 2007; ARAÚJO *et al.*, 2008).

As características físico-químicas do fármaco sob investigação, especialmente o coeficiente de partição, influenciam enormemente o processo de difusão pela membrana da sonda, uma vez que essa é regida pela lei de Fick, e, por conseguinte, a recuperação relativa. Fármacos hidrofílicos apresentam valores de diálise e retrodiálise semelhantes, pois se difundem livremente pela membrana, enquanto que fármacos lipofílicos apresentam baixas recuperações relativas e valores de diálise e retrodiálise distintos. Isso ocorre provavelmente devido à baixa solubilidade do fármaco no meio de perfusão, devido a ligação do mesmo à tubulação da sonda e pela alta ligação às proteínas plasmáticas, tornando a microdiálise difícil de ser realizada *in vivo*. O fato de a microdiálise ter dificuldade de aplicação para substâncias moderada ou altamente lipofílicas limita a utilização desta técnica para uma série de classes terapêuticas, visto que muitos fármacos utilizados na terapêutica apresentam essa característica (SCHUCK *et al.*, 2004; ARAÚJO *et al.*, 2008).

A investigação da viabilidade da utilização da microdiálise para avaliar o perfil farmacocinético da isotretinoína após aplicação tópica faz parte dessa etapa do trabalho. Para tanto, objetivou-se determinar a recuperação relativa *in vitro* da isotretinoína, fármaco lipofílico que apresenta log P estimado de 6,76 (NANKERVIS *et al.*, 1996). Confirmada a viabilidade da utilização dessa técnica de amostragem, ela poderá ser utilizada para avaliar a biodisponibilidade dérmica da isotretinoína a partir da formulação de nanocápsulas investigada nesse trabalho.

## **2. Metodologia**

### **2.1. Padrão, solventes e reagentes**

O fármaco isotretinoína foi adquirido da Pharma Nostra<sup>®</sup> (Brasil, pureza: 99,5 %). Os solventes acetonitrila e ácido trifluoroacético, grau CLAE, foram obtidos da Merck<sup>®</sup> (Alemanha). A água utilizada no sistema cromatográfico foi obtida de destilador/deionizador Milli Q<sup>®</sup> – Millipore<sup>®</sup>.

### **2.2. Metodologia analítica para quantificação da isotretinoína em microdialisado por CLAE**

A concentração da isotretinoína nas amostras de microdialisado foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por UV (CLAE/UV). A metodologia analítica utilizada para a quantificação da isotretinoína foi adaptada da metodologia descrita por Tashtoush e colaboradores (2007). Todos os procedimentos foram realizados com ausência de luz devido à foto-instabilidade do fármaco. Além disso, utilizou-se vidraria âmbar em todos os experimentos descritos nesse capítulo. A metodologia analítica utilizada foi capaz de diferenciar a isotretinoína do seu principal isômero e produto de degradação, a tretinoína.

#### **2.2.1. Condições cromatográficas**

As condições cromatográficas utilizadas para quantificação da isotretinoína em microdialisado estão descritas na Tabela 1.

**Tabela 1.** Condições cromatográficas utilizadas para a quantificação da isotretinoína em microdialisado.

Característica	Descrição
Coluna	Nova-Pak C <sub>18</sub> , (150 mm, 3,9 mm, 4 µm) (Waters®)
Pré-coluna	SecurityGuard C <sub>18</sub> (Phenomenex®)
Fluxo	1,0 mL/min
Volume de injeção	50 µL
Deteção	Ultravioleta, 342 nm
Fase móvel	Acetonitrila e ácido trifluoroacético 0,01 % (85:15, v/v)
Equipamento	CLAE (Waters®) 746 composto de: Integrador data Module Waters® 746, bomba e controlador de fluxo Waters® 600, injetor automático Waters® 717, detector ultra-violeta Waters® 2487, software Millenium.

Após o preparo, a fase móvel foi filtrada em filtro de membrana de polivinilideno (poro 0,45 µm, diâmetro 47 mm, hidrofílica, Millipore®) e desgaseificada por 10 min com o auxílio de banho de ultra-som (Ultrasonic Cleaner, Unique®).

### 2.2.2. Preparo da curva de calibração e controles de qualidade

Foram pesados, analiticamente, 10,0 mg de isotretinoína em balão volumétrico âmbar de 20 mL. O volume do balão foi completado com acetonitrila e a solução foi mantida em banho de ultra-som por 10 min, obtendo-se concentração final de 500 µg/mL de isotretinoína. A partir desta solução, foi realizada uma diluição obtendo-se a solução de concentração de 10 µg/mL em acetonitrila. Dessa, obtiveram-se as concentrações finais da curva de calibração em tampão fosfato 0,05 M (pH 7,4): 0,06; 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0 µg/mL. As amostras de controle de qualidade nas concentrações de 0,18; 0,5 e 0,9 µg/mL foram preparadas de modo similar, a partir de nova solução-mãe.

As amostras da curva de calibração e de controle de qualidade foram injetadas diretamente no cromatógrafo.

### 2.2.3. Validação da metodologia analítica por CLAE para microdialisado

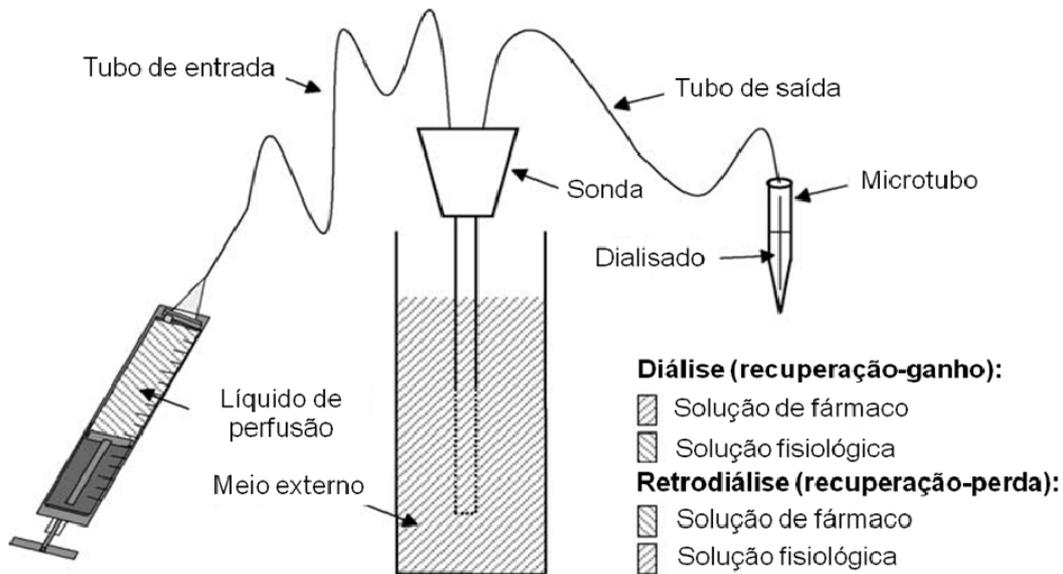
A metodologia analítica por CLAE para amostras de microdialisado foi validada através da linearidade, precisão, exatidão e limite de quantificação do método. Os parâmetros de performance analítica foram avaliados através de curvas de calibração e controles de qualidade de amostras contendo concentrações conhecidas de isotretinoína, de acordo com o preconizado pelo *Food and Drug Administration* (FDA, 2001).

A precisão e exatidão do método foram determinadas pela análise em triplicata em dois dias consecutivos de três concentrações de isotretinoína em tampão fosfato 0,05 M (pH 7,4) (0,18; 0,5 e 0,9 µg/mL) (controles de qualidade (CQ)). A linearidade foi avaliada pela análise em triplicata das sete concentrações da curva de calibração por dois dias consecutivos. As curvas de calibração foram obtidas pela análise de regressão dos mínimos quadrados considerando a área do pico da isotretinoína em função da concentração teórica. A regressão linear e o desvio da linearidade das curvas de calibração foram analisados estatisticamente através da análise de variância (ANOVA).

### 2.3. Microdiálise

As sondas de microdiálise CMA/30 linear (*cutoff* 6000 D, diâmetro externo 0,38 mm, comprimento da membrana 10 mm, CMA/Microdialysis AB<sup>®</sup>, Suécia) foram conectadas a seringas do tipo *gastight* de 0,5 mL com o auxílio de um conector de cateter. Para manter o fluxo constante pela sonda, uma bomba de microinfusão foi utilizada (PHD22/2000 Harvard<sup>®</sup>).

O estudo da viabilidade de utilização das sondas de microdiálise para quantificação da isotretinoína foi concebido visando investigar a influência do fluxo de perfusão e da concentração do fármaco na taxa de recuperação relativa (RR) *in vitro*. A RR *in vitro* foi determinada por dois métodos diferentes: diálise e retrodiálise, descritos a seguir. Um esquema destes processos pode ser visualizado na Figura 2.



**Figura 2.** Esquema para determinação das taxas de recuperação *in vitro* por diálise e retrodiálise (Adaptado de PLOCK e KLOFT, 2005).

### 2.3.1. Recuperação *in vitro* das sondas de microdiálise por diálise

Para a determinação da recuperação relativa por diálise (ganho de fármaco pela sonda,  $RR_D$ ), as sondas CMA 30 foram colocadas em placas de Petry contendo solução de isotretinoína a 1,0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  em tampão fosfato 0,05 M (pH 7,4) sob temperatura constante ( $37\text{ }^\circ\text{C} \pm 1\text{ }^\circ\text{C}$ ). As sondas ( $n = 3$ ) foram conectadas à seringa alimentadora e perfundidas com tampão fosfato 0,05 M (pH 7,4) destituído de fármaco, em diferentes fluxos. Com o intuito de se avaliar a influência do fluxo na RR da isotretinoína, foram testados quatro fluxos de perfusão diferentes - 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0  $\mu\text{L}/\text{min}$  - mantendo-se a concentração de isotretinoína constante no meio. Após a estabilização do sistema por uma hora, três amostras sucessivas de 60  $\mu\text{L}$  foram coletadas.

Para a determinação da influência da concentração na RR, o fluxo foi fixado em 2  $\mu\text{L}/\text{min}$ , por apresentar valor de recuperação compatível com o método analítico e tempo e volume adequados de coleta, e quatro concentrações diferentes de isotretinoína foram testadas no meio: 0,2; 0,4; 0,8 e 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Após o período de equilíbrio de uma hora, três coletas sucessivas de 60  $\mu\text{L}$  foram realizadas ( $n = 3$  sondas).

As amostras de dialisado e das soluções de isotretinoína do meio de imersão das sondas antes e depois dos experimentos foram analisadas imediatamente por CLAE/UV, conforme método descrito anteriormente, sem processamento prévio.

A recuperação relativa por diálise ( $RR_D$ ) foi calculada de acordo com a Equação 1 (WEISS e LUNTE, 2000; ARAÚJO *et al.*, 2008):

$$RR_D (\%) = \left( \frac{C_{dial}}{C_{ext}} \times 100 \right) \quad (1)$$

onde  $C_{dial}$  é a concentração de fármaco presente no dialisado e  $C_{ext}$  é a concentração de fármaco no meio externo ao redor da sonda de microdiálise.

### 2.3.2. Recuperação *in vitro* das sondas de microdiálise por retrodiálise

Para a determinação da recuperação relativa por retrodiálise (perda de fármaco pela sonda,  $RR_{RD}$ ), técnica similar à de diálise foi utilizada. No entanto, as sondas foram continuamente perfundidas com tampão fosfato 0,05 M (pH 7,4) contendo isotretinoína e a solução do meio da placa de Petry, onde a sonda foi colocada, constitui-se de tampão fosfato destituído de fármaco, a  $37 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Os experimentos de recuperação *in vitro* por perda foram realizados da mesma maneira que os experimentos por ganho, avaliando-se a influência da concentração de isotretinoína (0,2-1,0  $\mu\text{g/mL}$ ) e do fluxo de perfusão (1,0-4,0  $\mu\text{L/min}$ ) através das sondas de microdiálise ( $n = 3$ ). As três coletas de 60  $\mu\text{L}$  de dialisado também foram realizadas após ambientação de uma hora. Da mesma forma, as amostras de dialisado e das soluções perfundidas antes e depois dos experimentos foram analisadas imediatamente por CLAE/UV, conforme método descrito anteriormente, sem processamento prévio.

A recuperação relativa *in vitro* por retrodiálise ( $RR_{RD}$ ) foi determinada pela Equação 2 (WEISS e LUNTE, 2000; ARAÚJO *et al.*, 2008):

$$RR_{RD} (\%) = \left( \frac{C_{perf} - C_{dial}}{C_{perf}} \times 100 \right) \quad (2)$$

onde  $C_{\text{perf}}$  é a concentração de fármaco presente na seringa (solução perfundida pela sonda).

### **2.3.3. Experimentos de ligação da isotretinoína na tubulação da sonda de microdiálise**

Com o intuito de investigar a porcentagem de fármaco capaz de se ligar na tubulação da sonda de microdiálise, três tubos de entrada e de saída, compostos de poliimida (250 mm de comprimento), foram separados das membranas de diálise das sondas e perfundidos com solução de isotretinoína 1,0 µg/mL nos fluxos de 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 µL/min. Amostras de 60 µL foram coletadas em triplicata e analisadas em CLAE/UV conforme metodologia descrita, imediatamente após a coleta, sem processamento prévio.

### **2.4. Descarte de resíduos químicos**

O descarte de resíduos químicos foi realizado em recipientes apropriados, datados, identificados com o nome do responsável e o tipo de solvente ou constituição da mistura orgânica. Posteriormente, os resíduos foram recolhidos pela Comissão de Saúde e Ambiente de Trabalho (COSAT), assegurando destino e tratamento adequados.

## **3. Resultados e Discussão**

### **3.1. Validação de metodologia analítica por CLAE para microdialisado**

A validação de método analítico é realizada para garantir que o método seja exato, específico e reprodutível, assegurando credibilidade durante seu uso rotineiro (FDA, 2001).

A precisão do método analítico representa o grau de repetibilidade entre os resultados de análise individuais, quando o procedimento é aplicado diversas vezes numa mesma amostra homogênea. A precisão pode ser avaliada pela repetibilidade, reprodutibilidade e precisão intermediária. A repetibilidade é a medida em função dos valores encontrados através de várias reproduções do método, nas mesmas condições, em curto intervalo de tempo. A precisão intermediária expressa o efeito de variações do método em diferentes dias, analistas e equipamentos. A

reprodutibilidade se refere aos resultados dos estudos de colaboração entre laboratórios. A precisão deve ser investigada usando um mínimo de cinco determinações de, no mínimo, três concentrações diferentes (FDA, 2001). Para avaliação dos resultados foram adotados os critérios de validação de método analítico para amostras biológicas, uma vez que os futuros experimentos *in vivo* serão realizados em humanos.

A precisão do método para amostras de microdialisado foi avaliada através dos coeficientes de variação intra-dia (repetibilidade) e inter-dia (precisão intermediária). Os resultados da precisão podem ser visualizados na Tabela 2.

**Tabela 2.** Repetibilidade e precisão intermediária do método analítico para quantificação da isotretinoína em microdialisado por CLAE/UV.

	Concentração nominal (µg/mL)	Dia	Concentração experimental <sup>a</sup>		
			Média (µg/mL)	D.P.	D.P.R. (%)
<b>Varição intra-dia</b>					
<b>LQ</b>	0,06	1	0,0698	0,0014	2,0
		2	0,0671	0,0051	7,6
<b>CQ</b>	0,9	1	0,8995	0,0221	2,5
		2	0,9237	0,0263	2,8
	0,5	1	0,5023	0,0335	6,7
		2	0,5034	0,0146	2,9
0,18	1	0,1756	0,0144	8,2	
	2	0,1781	0,0059	3,3	
<b>Varição inter-dia</b>					
<b>LQ</b>	0,06		0,0685	0,0019	2,8
<b>CQ</b>	0,9		0,9116	0,0171	1,9
	0,5		0,5029	0,0007	0,1
	0,18		0,1769	0,0017	1,0

D.P. = desvio padrão; D.P.R. = desvio padrão relativo; LQ = limite de quantificação; CQ = controles de qualidade; <sup>a</sup>valores de média e D.P. representam n = 3 observações.

Os coeficientes de variação intra-dia e inter-dias devem apresentar valores inferiores a 15 % para cada concentração, exceto para o menor limite de quantificação, que deve ser inferior a 20 % (FDA, 2001). Os valores de precisão intra-dia e inter-dia para as amostras de CQ foram menores ou iguais a 8,2 % e 1,9 %, respectivamente, estando de acordo com a especificação do FDA. O método,

portanto, possui repetibilidade quando executado mais de uma vez no mesmo dia e sua análise é precisa quando feita em diferentes dias.

A exatidão representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados e um valor aceito como referência (FDA, 2001). Através dos resultados apresentados na Tabela 3, pode-se concluir que o método é exato, indicando que as concentrações determinadas estão próximas aos valores teóricos esperados.

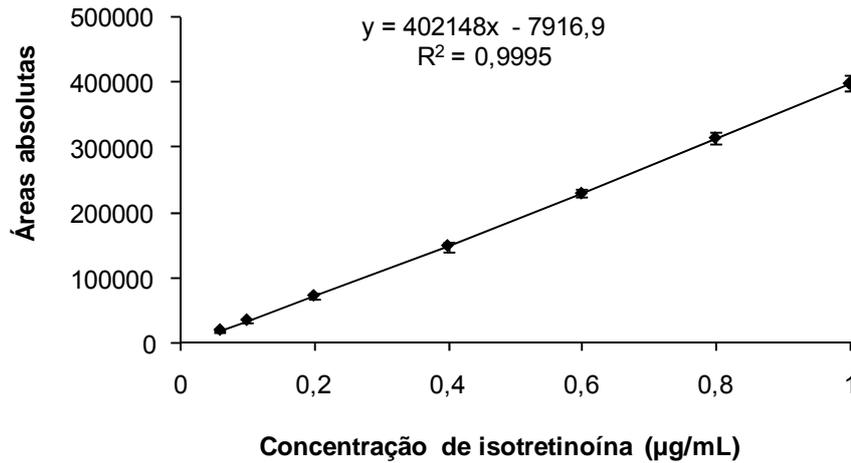
**Tabela 3.** Exatidão do método analítico para quantificação da isotretinoína em microdialisado por CLAE/UV.

	Concentração nominal (µg/mL)	Faixa de concentração (µg/mL)	Faixa de exatidão (%) <sup>a</sup>
<b>LQ</b>	0,06	0,0621 - 0,0723	103,4 - 119,3
<b>CQ</b>	0,9	0,8759 - 0,9461	95,6 - 105,1
	0,5	0,4666 - 0,5331	92,4 - 104,5
	0,18	0,1591 - 0,1855	87,5 - 102,0

D.P. = desvio padrão; D.P.R. = desvio padrão relativo; LQ = limite de quantificação; CQ = controles de qualidade;<sup>a</sup> n = 6 observações.

A linearidade corresponde à capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (FDA, 2001).

A linearidade do método analítico foi avaliada através de seis curvas de calibração com faixa de concentração entre 0,06 e 1,0 µg/mL avaliadas em dois dias consecutivos. A partir das curvas foram determinados a inclinação, a intersecção e o coeficiente de correlação. A curva de calibração média obtida na validação está representada na Figura 2, com a equação da reta de regressão linear e o valor do coeficiente de correlação correspondente.



**Figura 3.** Representação gráfica da curva de calibração média da isotretinoína em microdialisado obtida por CLAE/UV na faixa de 0,06 a 1,0 µg/mL (média ± D.P.).

Os coeficientes de correlação, intercepto e inclinação de cada uma das seis curvas utilizadas para a validação podem ser observados na Tabela 4.

**Tabela 4.** Parâmetros das curvas de calibração utilizadas na validação de metodologia analítica para quantificação da isotretinoína em microdialisado por CLAE/UV.

Curva	Inclinação	Intercepto Y	Coefficiente de correlação
<b>Dia 1</b>			
1	383816	-10431,0	0,9986
2	400305	-7051,6	0,9989
3	397217	-7222,4	0,9991
<b>Dia 2</b>			
1	405476	-8955,2	0,9986
2	392694	-5651,3	0,9997
3	397633	-8189,5	0,9994
<b>Média (n = 6)</b>	396190,2	-7916,8	
<b>D.P.<sup>a</sup></b>	7370,7	1663,6	
<b>D.P.R. (%)<sup>b</sup></b>	1,9		

<sup>a</sup>D.P., desvio padrão; <sup>b</sup>D.P.R., desvio padrão relativo.

Todas as curvas analíticas (área do pico em função da concentração nominal de isotretinoína) foram lineares e apresentaram coeficiente de correlação superior ou igual a 0,9986. Portanto, considerando 0,995 como sendo o menor valor aceitável de correlação para amostras biológicas (FDA, 2001), observou-se linearidade funcional entre a concentração de isotretinoína e as áreas dos picos do fármaco obtidos. A

análise de variância (ANOVA), utilizando os valores experimentais das áreas, demonstrou que os resultados calculados apresentaram regressão linear significativa ( $p < 0,05$ ), sem desvio de linearidade ( $p > 0,05$ ).

O limite de quantificação representa a concentração mais baixa da substância em análise que pode ser quantificada através das condições experimentais do método analítico, apresentando exatidão e precisão satisfatória. Para o limite de quantificação, a variação máxima aceita é de 20 % (FDA, 2001). O limite de quantificação do método desenvolvido foi de 60 ng/mL obtendo-se precisão e exatidão satisfatórias (Tabelas 2 e 3).

### **3.2. Recuperação das sondas de microdiálise *in vitro* e ligação da isotretinoína aos dispositivos de microdiálise**

Sabe-se que na microdiálise a quantidade de fármaco recuperado é somente uma fração da quantidade presente no tecido ou no meio sob investigação. Considerando que a RR é dependente de uma série de fatores como fluxo de perfusão, natureza da membrana, temperatura, propriedades físico-químicas da substância a ser estudada, entre outros (JOUKHADAR e MÜLLER, 2005), experimentos *in vitro* devem ser executados previamente aos experimentos *in vivo*, pois possibilitam a determinação das condições experimentais apropriadas para os estudos *in vivo*, além de mostrar possíveis problemas relacionados com a utilização da técnica.

A recuperação das sondas de microdiálise *in vitro* foi determinada pelas técnicas de diálise e retrodiálise. Considerando a relevância da temperatura, isotonicidade e pH do meio no transporte de substâncias através de membranas poliméricas (PLOCK e KLOFT, 2005), todos experimentos de recuperação *in vitro* foram conduzidos com tampão fosfato 0,05 M (pH 7,4) a  $37,0 \pm 1,0$  °C, mimetizando o espaço intersticial *in vivo*.

A RR pelo método de diálise *in vitro* mimetiza a situação *in vivo* quando a microdiálise é utilizada para amostrar fármacos em uma biofase específica. Nesse caso, o fármaco está presente no tecido e se difunde pela membrana da sonda. Como a concentração de fármaco no tecido varia ao longo do tempo é importante verificar que a RR da sonda permanece constante apesar das variações de

concentração. Nesse contexto, a influência da concentração de isotretinoína na RR *in vitro* foi investigada por ambos os métodos. A RR<sub>D</sub> se mostrou similar para todas as concentrações investigadas (0,2 - 1,0 µg/mL – fluxo 2,0 µL/min), sendo de 25,2 ± 4,8 %. A recuperação obtida por retrodiálise também foi semelhante para todas as concentrações investigadas, mas se mostrou superior à RR<sub>D</sub>, tendo-se obtido um valor médio de 67,8 ± 10,3 % (p < 0,05). Desse modo, pode-se concluir que a RR por diálise ou retrodiálise não é influenciada pela concentração de isotretinoína.

A influência do fluxo de perfusão (1,0 - 4,0 µL/min) na RR *in vitro* da isotretinoína foi investigada pelos métodos de diálise e retrodiálise, mantendo-se a concentração constante de 1,0 µg/mL. Os resultados podem ser observados na Tabela 5.

**Tabela 5.** Recuperação relativa *in vitro* da isotretinoína (1,0 µg/mL) pelos métodos de diálise (RR<sub>D</sub>) e retrodiálise (RR<sub>RD</sub>) para diferentes fluxos de perfusão.

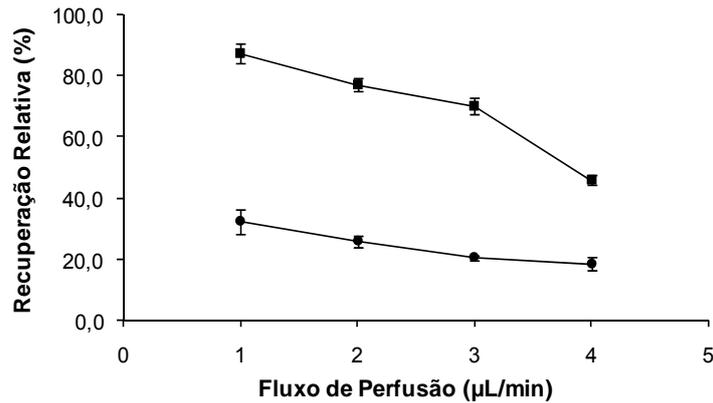
Sonda Utilizada	Recuperação Relativa (%)							
	RR <sub>D</sub> (%)				RR <sub>RD</sub> (%)			
	Fluxo Perfusão (µL/min)				Fluxo Perfusão (µL/min)			
	1,0	2,0	3,0	4,0	1,0	2,0	3,0	4,0
Sonda A <sup>a</sup>	41,3 ± 6,3	33,6 ± 1,3	25,4 ± 0,4	22,7 ± 2,9	85,6 ± 2,8	77,4 ± 0,5	67,0 ± 1,6	42,8 ± 2,0
Sonda B <sup>a</sup>	36,0 ± 0,8	24,5 ± 0,6	18,9 ± 0,3	20,3 ± 2,5	86,0 ± 1,9	73,3 ± 5,0	67,0 ± 4,1	42,6 ± 1,8
Sonda C <sup>a</sup>	19,5 ± 4,8	19,4 ± 3,2	17,3 ± 1,7	12,6 ± 0,8	90,1 ± 4,5	80,3 ± 1,2	76,3 ± 2,8	52,4 ± 1,2
Média ± D.P. <sup>b</sup>	32,3 ± 4,0*	25,9 ± 1,7*	20,5 ± 0,8*	18,5 ± 2,1*	87,2 ± 3,1	77,0 ± 2,2	70,1 ± 2,8	45,9 ± 1,7

<sup>a</sup> Média ± DP (n = 3)

<sup>b</sup> Média ± DP (n = 9)

\* p < 0,05

Primeiramente, pode-se observar que para a mesma técnica investigada, a RR diminuiu com o aumento do fluxo de perfusão, como pode ser melhor visualizado na Figura 3. A cada aumento de fluxo a RR diminui em torno de 1,2 vezes para ambas as técnicas de recuperação. A RR<sub>D</sub> para o fluxo 1,0 µL/min, por exemplo, foi de 32,3 ± 4,0 %, aproximadamente 1,2 vezes superior a obtida com fluxo 2,0 µL/min (25,9 ± 1,7%). Essa relação inversa entre o fluxo de perfusão e a recuperação era esperada uma vez que, com aumento de fluxo, o analito no meio externo é drenado mais rapidamente para o interior da sonda, sendo diluído no líquido de perfusão reduzindo, conseqüentemente, a recuperação relativa das sondas. A recuperação absoluta, no entanto, é aumentada (DE LANGE *et al.*, 2000; KREILGAARD, 2002).

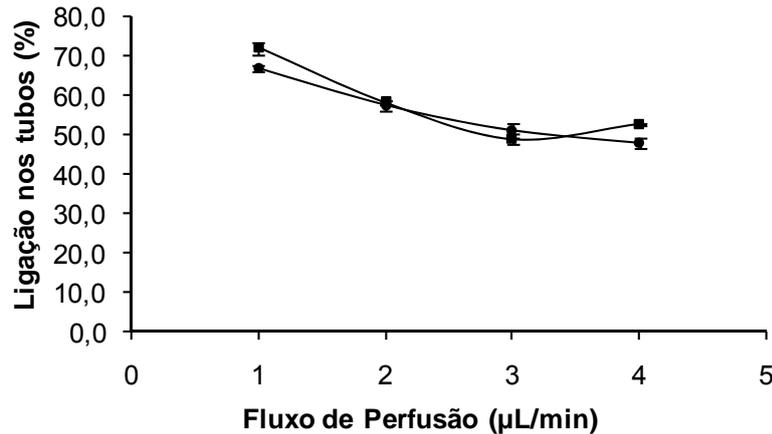


**Figura 4.** Recuperação da isotretinoína pelos métodos de retrodiálise (■) e diálise (●) para diferentes fluxos de perfusão.

Foram encontradas diferenças significativas entre as RR por diálise e retrodiálise determinadas *in vitro* para o mesmo fluxo. A RR por retrodiálise mostrou-se 2,7 a 3,5 vezes superior a RR determinada por diálise para os fluxos investigados (Tabela 5 e Figura 3). Esses resultados indicam que a utilização da técnica de retrodiálise, geralmente empregada para avaliar RR *in vivo*, não é adequada para a isotretinoína.

Pode-se observar na Tabela 5 que a sonda C mostrou recuperações por diálise inferiores as outras duas sondas investigadas. Esse achado não é relevante uma vez que as sondas de microdiálise podem apresentar variabilidade na recuperação em função da sua manufatura, que pode ser minimizada com o uso continuado. Essa observação pode ser confirmada observando-se os resultados da mesma sonda C nos estudos de retrodiálise, que foram conduzidos posteriormente ao estudo de diálise. Essa variabilidade de recuperação das sondas é um dos motivos que leva a necessidade de avaliação de mais de uma sonda em cada experimento.

Visando investigar o motivo das diferenças observadas na RR pelos métodos de diálise e retrodiálise, realizou-se um experimento para avaliar a ligação da isotretinoína à tubulação de entrada e saída das sondas, utilizando diferentes fluxos de perfusão (1,0 - 4,0 µL/min). Os resultados estão mostrados na Figura 4.



**Figura 5.** Porcentagem de ligação da isotretinoína nos tubos de entrada (●) e saída (■) da sonda de microdiálise CMA 30 para diferentes fluxos de perfusão.

Pode-se observar uma ligação importante da isotretinoína às tubulações, que tendeu à diminuição com o aumento do fluxo de perfusão. Para o fluxo de 2,0 µL/min, por exemplo, a ligação foi de  $57,3 \pm 1,3$  % e  $57,9 \pm 0,6$  % para a tubulação de entrada e saída, respectivamente.

As diferenças significativas observadas para as recuperações determinadas por ganho e perda se devem, portanto, a ligação do fármaco ao material das tubulações das sondas de microdiálise. Isso ocorre provavelmente devido a lipofilicidade da isotretinoína, visto que esta característica físico-química é um importante fator capaz de promover a adsorção de fármacos ao material plástico das tubulações. A afinidade de ligação depende da partição da substância entre o solvente perfundido e o material plástico, explicando porque a  $RR_{RD}$  é maior que a  $RR_D$ . No método de retrodiálise o fármaco deve passar pelo tubo de entrada, pela membrana e pelo tubo de saída, ocasionando maior contato com a tubulação plástica, enquanto que para o método de diálise, o fármaco entra em contato apenas com a membrana e o tubo de saída da sonda. Os resultados não descartam a possibilidade da isotretinoína também se ligar à membrana da sonda de microdiálise.

Como consequência do fenômeno de ligação, a RR determinada experimentalmente não expressa o valor real da recuperação do fármaco do meio devido à transferência de massa em condições *sink*, mas a recuperação relativa aparente, a qual expressa, simultaneamente, a ligação do fármaco à tubulação da sonda e a transferência de fármaco pela membrana.

A ligação de fármacos à tubulação de sondas de microdiálise, devido à sua natureza lipofílica, foi relatada em diversos estudos utilizando substâncias como dipropionato de betametasona, calcipotriol (GROTH e JØRGENSEN, 1997), fenitoína, carbamazepina, fenobarbital (LINDBERGER *et al.*, 2002) e voriconazol (ARAÚJO *et al.*, 2008).

Algumas alternativas para superar essa limitação têm sido descritas na literatura, tais como o uso de albumina, solventes ou emulsões lipídicas fisiológicas no líquido de perfusão e a saturação da tubulação da sonda (CARNEHEIM e STÄHLE, 1991; MÜLLER *et al.*, 1995; KUROSAKI *et al.*, 1998; TRAUNMÜLLER *et al.*, 2006). Carneheim e Stahle (1991) aumentaram a recuperação *in vitro* de uma substância extremamente lipofílica, o C<sup>14</sup> oleato, ao adicionar albumina ou emulsão lipídica fisiológica ao líquido de perfusão. Kurosaki e colaboradores (1998), ao adicionarem lipídios ao líquido perfundido através das sondas, observaram um aumento significativo das recuperações *in vitro* (2 a 390 vezes de aumento) para substâncias do grupo 4-alkilparabenos, utilizadas como modelos de substâncias de alta lipofilicidade. Traunmüller e colaboradores (2006) adicionaram albumina e saturaram os sítios de ligação da membrana e da tubulação com altas concentrações do fármaco sob investigação, a caspofungina. Os autores verificaram que o conteúdo de albumina do líquido de perfusão não preveniu a adsorção do fármaco ao material do sistema de microdiálise. No entanto, após o procedimento de saturação, as RR apresentaram valores estáveis, confirmando a hipótese de adsorção da caspofungina às superfícies internas da tubulação das sondas de microdiálise, demonstrando que a saturação dos sítios de ligação da tubulação podem ser uma alternativa viável para solucionar o problema.

A utilização de albumina no líquido de perfusão visando impedir a ligação do fármaco à tubulação traz como consequência a necessidade de processar a amostra de dialisado previamente à análise, eliminando uma das vantagens da técnica que é a injeção direta das amostras de microdialisado nos equipamentos analíticos. Além disso, como o volume das amostras é pequeno, na ordem de poucos microlitros (~50 – 60 µL), o processamento introduz um erro experimental importante.

A saturação das sondas com fármaco previamente aos experimentos, por outro lado, implica em estudos adicionais para certificar que as sondas permanecem

saturadas durante a duração completa do experimento que será conduzido *in vivo*. Sem essa garantia, os resultados *in vivo* podem não corresponder às concentrações livres no tecido sob investigação.

Além de líquidos de perfusão alternativos, alguns trabalhos sugerem a utilização de sondas de microdiálise compostas por membranas com *cutoff* elevado ou diferentes materiais de tubulação e membrana (MARY *et al.*, 1998).

Recentemente, o uso de uma abordagem matemática foi proposta por Lindberger e colaboradores (2002) e Araújo e colaboradores (2008), a qual permite considerar a ligação de fármacos à tubulação ou à membrana de diálise. Após a determinação da ligação do fármaco ao dispositivo, a mesma pode ser subtraída das RR determinadas experimentalmente, permitindo a aplicabilidade da microdiálise a fármacos para os quais a ligação era uma limitação. Essa abordagem, no entanto, só foi aplicada para as situações nas quais a ligação ocorreu de modo relevante apenas à tubulação de entrada, sendo negligenciável na tubulação de saída, o que não ocorreu para a isotretinoína.

#### **4. Conclusões**

Um método analítico simples e rápido para a determinação de isotretinoína em microdialisado foi adaptado e validado de acordo com as especificações do FDA. O método apresentou excelente linearidade com uma faixa de concentração de 0,06 a 1,0 µg/mL e, portanto, mostrou-se apropriado para a investigação deste fármaco nesta matriz.

Devido à lipofilicidade da isotretinoína, o fármaco é capaz de aderir às tubulações da sonda de microdiálise utilizada dificultando a determinação da recuperação relativa tanto por diálise quanto por retrodiálise, tornando a calibração *in vivo* um desafio.

#### **5. Perspectivas**

Na continuidade deste trabalho, duas frentes de investigação se apresentam:

1. Embora as desvantagens da utilização de albumina no líquido de perfusão sejam evidentes, esta seria uma alternativa promissora para prevenir a ligação do

fármaco ao dispositivo de microdiálise. Além disso, a saturação das sondas previamente aos experimentos também se apresenta como alternativa para a determinação da real recuperação relativa da isotretinoína, permitindo a aplicação da microdiálise *in vivo*. A viabilidade de utilização dessas duas alternativas deve ser investigada.

2. Considerando que essa pesquisa visa investigar a diferença de penetração cutânea de isotretinoína aplicada sob a pele na forma livre e nanoencapsulada, dois grupos de indivíduos serão investigados. Considerando que a recuperação *in vivo* determinada pela técnica de diálise e retrodiálise será a mesma em ambos os grupos testados, a determinação da real recuperação relativa não seria obrigatória, pois os níveis de concentração encontrados na derme para os dois grupos seriam avaliados por comparação e não através de valores absolutos. Desse modo, mesmo que os resultados da avaliação da recuperação não sejam promissores, a microdiálise pode ser empregada para avaliação comparativa dos dois grupos sem o conhecimento das concentrações teciduais reais, como tem sido relatado na literatura em diversos estudos utilizando microdiálise cutânea (BENFELDT e GROTH, 1998; BORG *et al.*, 1999).

## 6. Referências

ARAÚJO, B.V.; SILVA, C.F.; HAAS, S.E.; DALLA COSTA, T. Microdialysis as a tool to determine free kidney levels of voriconazole in rodents: a model to study the technique feasibility for a moderately lipophilic drug. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 47, p. 876-881, 2008.

BENFELDT, E.; GROTH, L. Feasibility of measuring lipophilic or protein-bound drugs in the dermis by *in vivo* microdialysis after topical or systemic drug administration. *Acta dermato-venereologica*, v. 78, p. 274-278, 1998.

BORG, N.; GÖTHARSON, E.; BENFELDT, E.; GROTH, L.; STÅHLE, L. Distribution to the skin of penciclovir after oral famciclovir administration in healthy volunteers: comparison of the suction blister technique and cutaneous microdialysis. *Acta dermato-venereologica*, v. 79, p. 274-277, 1999.

CARNEHEIM, C.; STÅHLE, L. Microdialysis of lipophilic compounds: a methodological study. *Pharmacology & Toxicology*, v. 69, p. 378-380, 1991.

CHAURASIA, C.S.; MÜLLER, M.; BASHAW, E.D.; BENFELDT, E.; BOLINDER, J.; BULLOCK, R.; BUNGAY, P.M.; DELANGE, E.C.; DERENDORF, H.; ELMQUIST, W.F.; HAMMARLUND-UDENAES, M.; JOUKHADAR, C.; KELLOGG JR., D.; LUNTE, C.E.; NORDSTROM, C.H.; ROLLEMA, H.; SAWCHUK, R.J.; CHEUNG,

B.W.Y.; SHAH, V.P.; STAHL, L.; UNGERSTEDT, U.; WELTY, D.F.; YEO, H. AAPS-FDA workshop white paper: microdialysis principles, application and regulatory perspectives. *Pharmaceutical Research*, v. 24, p. 1014-1025, 2007.

DAVIES, M.I.; COOPER, J.D.; DESMOND, S.S.; LUNTE, C.E.; LUNTE, S.M. Analytical considerations for microdialysis sampling. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 45, p. 169-188, 2000.

DE LANGE, E.C.M.; DE BOER, A.G.; BREIMER, D.D. Methodological issues in microdialysis sampling for pharmacokinetic studies. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 45, p. 125-148, 2000.

FDA - Guidance for Industry. Bioanalytical Method Validation, maio 2001. Disponível em [www.fda.gov/cder/guidance/4252f1.pdf](http://www.fda.gov/cder/guidance/4252f1.pdf)

GROTH, L.; JØRGENSEN, A. *In vitro* microdialysis of hydrophilic and lipophilic compounds. *Analytica Chimica Acta*, v. 355, p. 75-83, 1997.

KREILGAARD, M. Assessment of cutaneous drug delivery using microdialysis. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 54, p. S99-S121, 2002.

KUROSAKI, Y.; NAKAMURA, S.; SHIOJIRI, Y.; KAWASAKI, H. Lipo-microdialysis: A new microdialysis method for studying the pharmacokinetics of lipophilic substances. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, v. 21, p. 194-196, 1998.

LINDBERGER, M.; TOMSON, T.; STÅHLE, L. Microdialysis sampling of carbamazepine, phenytoin and phenobarbital in subcutaneous extracellular fluid and subdural cerebrospinal fluid in humans: an *in vitro* and *in vivo* study of adsorption to the sampling device. *Pharmacology & Toxicology*, v. 91, p. 158-165, 2002.

MÜLLER, M.; SCHMID, R.; WAGNER, O.; OSTEN, B.V.; SHAYGANFAR, H.; HEICHLER, H.G. *In vivo* characterization of transdermal drug transport by microdialysis. *Journal of Controlled Release*, v. 37, p. 49-57, 1995.

MARY, S.; MURET, P.; MAKKI, S.; JOURDANT, M.; BELON, J.P.; KANTELIP, J.P.; HENRY, J.C.; HUMBERT, P. Assessment of the recovery of three lipophilic psoralens by microdialysis: an *in vitro* study. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 161, p. 7-13, 1998.

NANKERVIS, R.; DAVIS, S.S.; DAY, N.H.; SHAW, P.N. Intestinal lymphatic transport of three retinoids in the rat after oral administration: effect of lipophilicity and lipid vehicle. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 130, n. 1, p. 57-64, 1996.

PLOCK, N.; KLOFT, C. Microdialysis - theoretical background and recent implementation in applied life-sciences. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 25, p. 1-24, 2005.

SCHMIDT, S.; BANKS, R.; KUMAR, V.; RAND, K.H.; DERENDORF, H. Clinical microdialysis in skin and soft tissues: an update. *Journal of Clinical Pharmacology*, v. 48, p. 351-364, 2008.

SCHUCK, V.J.A.; RINAS, I.; DERENDORF, H. *In vitro* microdialysis sampling of docetaxel. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 36, p. 807-813, 2004.

TASHTOUSH, B.M.; JACOBSON, E.L.; JACOBSON, M.K. A rapid HPLC method for simultaneous determination of tretinoin and isotretinoin in dermatological formulations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 43, p. 859-864, 2007.

TASSO, L.; BETTONI, C.C.; OLIVEIRA, L.K.; DALLA COSTA, T. Evaluation of gatifloxacin penetration into skeletal muscle and lung by microdialysis in rats. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 358, p. 96-101, 2008.

TRAUNMÜLLER, F.; STEINER, I.; ZEITLINGER, M.; JOUKHADAR, C. Development of a high-performance liquid chromatography method for the determination of caspofungin with amperometric detection and its application to *in vitro* microdialysis experiments. *Journal of Chromatography B*, v. 843, p. 142-146, 2006.

WEISS, D.F.; LUNTE, C.E. *In vivo* microdialysis as a tool for monitoring pharmacokinetics. *Trends and Analytical Chemistry*, v. 19, n. 10, p. 606-616, 2000.

**CAPÍTULO 2: Comparison of cutaneous penetration of isotretinoin-loaded nanocapsules by tape stripping *in vitro* in human and pig skin**

---

**Artigo a ser submetido para publicação**



Nessa etapa do trabalho avaliou-se a penetração cutânea de nanocápsulas de poli( $\epsilon$ -caprolactona) contendo isotretinoína incorporada em gel hidrofílico (GEL-NCISO) e isotretinoína livre (GEL-FREE) incorporada no mesmo gel, utilizando-se a técnica de *tape stripping in vitro* em pele humana e pele de porco. A estabilidade físico-química dos hidrogéis foi avaliada usando Turbiscan LAb<sup>®</sup> em temperaturas de 25 e 40 °C por 24 horas, bem como a partir de estudo conduzido a 4 °C por 60 dias, avaliando-se quantidade de fármaco encapsulado, tamanho de partículas, índice de polidispersão, potencial zeta e pH. Esses estudos foram conduzidos visando avaliar a integridade das formulações desenvolvidas para garantir os estudos de penetração cutânea. O GEL-FREE e GEL-NCISO foram aplicados sobre a pele humana ou de porco e a penetração foi determinada utilizando *tape stripping* em célula de Franz.

Os hidrogéis mostraram estabilidade físico-química adequada para formulação de uso tópico e boa estabilidade durante os dois meses investigados. As nanopartículas mostraram uma distribuição de diâmetro estreita e potencial zeta negativo. Os estudos de *tape stripping in vitro* mostraram que, independente do tipo de pele utilizada, o fármaco não chega ao compartimento receptor até 8 h após aplicação cutânea. A nanoencapsulação aumentou a penetração cutânea da isotretinoína no estrato córneo de ambas as peles e prolongou a liberação de fármaco. A pele de porco foi mais permeável que a pele humana, uma vez que maiores concentrações de fármaco foram determinadas na camada mais externa da pele para ambas as formulações. Penetração cutânea similar foi observada na pele humana e de porco, embora diferentes quantidades de fármaco tenham sido detectadas no estrato córneo de ambas as espécies *in vitro*. Uma correlação de Pearson positiva (0,79) foi obtida entre a penetração de isotretinoína observada na pele humana e de porco *in vitro*, levando a conclusão que a pele de porco pode ser adequada para prever a penetração cutânea do fármaco livre e nanoencapsulado na pele humana *in vitro*.

Os resultados obtidos nessa etapa do trabalho foram submetidos à publicação sob o título “Comparison of cutaneous penetration of isotretinoin-loaded nanocapsules by tape stripping in vitro in human and pig skin” tendo como autores Clarissa C. Bettoni, Cristiane de Andrade, Cândice Felippi, Silvia S. Guterres e Teresa Dalla Costa.



**DISCUSSÃO E CONCLUSÕES GERAIS**

---

---



Nos últimos anos, a pele se tornou uma atrativa e acessível via para a administração de fármacos. Por sua vez, o desenvolvimento de novas formulações e sistemas de liberação de fármacos capazes de proporcionar índices terapêuticos mais adequados além de suprirem a pele por um período de tempo prolongado tem sido de grande interesse tanto para a academia quanto para a indústria farmacêutica. A microdiálise e o *tape stripping* se mostram técnicas promissoras para avaliação da penetração cutânea desses novos carreadores, uma vez que auxiliam no desenvolvimento de produtos tópicos seguros e eficazes.

A presente pesquisa foi desenhada com o intuito de avaliar o comportamento tópico *in vitro* da isotretinoína nanoencapsulada e livre incorporada em hidrogéis após aplicação sobre a pele. Para atingir esse objetivo, primeiramente foi determinada a viabilidade de utilizar a microdiálise como técnica de avaliação da penetração cutânea da isotretinoína. A seguir, a quantidade de fármaco capaz de penetrar o estrato córneo foi determinada pela técnica de *tape stripping in vitro* em pele humana e pele de porco. Por último, realizou-se a comparação dos resultados obtidos *in vitro* neste trabalho com os resultados obtidos por *tape stripping in vivo* em humanos em estudo prévio desenvolvido por nosso grupo. Para garantir a integridade das formulações utilizadas nos experimentos, a estabilidade físico-química dos hidrogéis contendo isotretinoína livre e nanoencapsulada foi avaliada.

Visando investigar a viabilidade de utilização da microdiálise para avaliar o perfil farmacocinético da isotretinoína após aplicação tópica objetivou-se a validação de método analítico das amostras de microdialisado em cromatografia líquida de alta eficiência e a determinação da recuperação relativa *in vitro* da isotretinoína pelas sondas de microdiálise. Durante a validação foram avaliados os parâmetros de desempenho analítico como precisão intermediária e repetibilidade, exatidão, linearidade e limite de quantificação de acordo com o preconizado pelo FDA. Observou-se que o método analítico possui repetibilidade quando executado mais de uma vez no mesmo dia (precisão intra-dia < 8,2 %) e que sua análise é precisa quando feita em diferentes dias (precisão inter-dia < 1,9 %). O método se mostrou exato, indicando que as concentrações determinadas estão próximas aos valores teóricos esperados e que todas as curvas analíticas foram lineares e apresentaram coeficiente de correlação superior ou igual a 0,9986. Além disso, o limite de quantificação do método (60 ng/mL) mostrou precisão e exatidão satisfatórias.

Em seguida, a influência da concentração do fármaco e do fluxo de perfusão na taxa de recuperação relativa *in vitro* das sondas de microdiálise foi investigada por dois métodos diferentes: diálise ( $RR_D$ ) e retrodiálise ( $RR_{RD}$ ). Os resultados evidenciaram que a recuperação relativa é concentração independente para ambos os métodos, sendo a média das quatro concentrações investigadas de  $25,2 \pm 4,8 \%$  para a  $RR_D$  e  $67,8 \pm 10,3 \%$  para a  $RR_{RD}$ . Verificou-se a existência de uma relação inversa entre o fluxo de perfusão e a recuperação relativa e que há diferenças significativas entre as recuperações relativas avaliadas pelos dois métodos para o mesmo fluxo, de modo que a  $RR_{RD}$  mostrou-se 2,7 a 3,5 vezes superior à  $RR_D$  para os fluxos investigados. Estes resultados indicaram que a utilização da técnica de retrodiálise, geralmente empregada para avaliar recuperação relativa *in vivo*, não pode ser usada para a isotretinoína. Visando investigar o motivo das diferenças observadas nas recuperações relativas pelos métodos de diálise e retrodiálise, investigou-se a porcentagem de fármaco capaz de se ligar à tubulação da sonda de microdiálise. Os resultados mostraram que a isotretinoína se liga fortemente ao dispositivo de microdiálise e que essa ligação tende a diminuir com o aumento do fluxo. Isso ocorre provavelmente devido a lipofilicidade da isotretinoína, uma vez que fármacos lipofílicos tendem a se adsorver aos materiais plásticos das tubulações, dificultando a determinação da real recuperação do fármaco do meio e tornando a calibração *in vivo* e, portanto, a microdiálise, um desafio. Como perspectivas para a investigação da microdiálise como técnica de amostragem para investigação da penetração cutânea da isotretinoína livre e nanoencapsulada, duas abordagens são possíveis: 1. utilização de albumina no líquido de perfusão visando prevenir a ligação do fármaco ao dispositivo de microdiálise ou saturação das sondas com o fármaco previamente aos experimentos; 2. comparação da penetração cutânea relativa do fármaco livre e nanoencapsulado sem conhecimento da taxa de recuperação, uma vez que o objetivo do estudo é avaliar a influência das nanopartículas na penetração cutânea da isotretinoína. A viabilidade de utilização dessas alternativas deve ser investigada em estudos futuros.

Experimentos de penetração cutânea *in vitro* são ferramentas bastante atrativas para a avaliação da segurança e eficácia de produtos tópicos e para a otimização dos processos de desenvolvimento de fármacos e formulações aplicados topicamente por serem mais baratos e causarem menores implicações éticas que

experimentos *in vivo*. Além disso, a possibilidade de prever e correlacionar dados obtidos tanto a partir de experimentos *in vitro* quanto de experimentos *in vivo* é uma das finalidades desse tipo de ensaio. Nesse contexto, o presente estudo propôs determinar e comparar a penetração cutânea da isotretinoína livre (GEL-LIVRE) e nanoencapsulada (GEL-NCISO) incorporada em hidrogéis através da técnica de *tape stripping in vitro* em células de difusão de Franz utilizando pele humana e pele de porco.

Primeiramente, para garantir a integridade das formulações utilizadas no estudo, a estabilidade física e química das formulações contendo isotretinoína livre e nanoencapsulada foi avaliada através da determinação do conteúdo de fármaco, do tamanho de partícula; do índice de polidispersão, do potencial zeta e do pH por 60 dias. O aparelho Turbiscan LAb<sup>®</sup> também foi utilizado com o intuito de prever o comportamento das formulações ao longo prazo. Os resultados mostraram que as nanocápsulas de isotretinoína e o fármaco livre podem ser incorporados em hidrogéis apresentando características físico-químicas satisfatórias para a aplicação tópica. As nanocápsulas apresentaram tamanho de partícula em torno de 250 nm, distribuição homogênea e altos valores negativos de potencial zeta ao longo de todo o período de análise. O pH mostrou-se estável e adequado para aplicação tópica. Após 60 dias de estocagem, o doseamento de isotretinoína mostrou valores próximos aos teóricos, não apresentando decaimento do conteúdo de isotretinoína. As análises em Turbiscan mostraram tendências a desestabilização que não foram confirmadas com o estudo de estabilidade em tempo real, indicando que os hidrogéis são estáveis durante o período de 60 dias de armazenagem.

Os experimentos de penetração cutânea *in vitro* em pele humana e pele de porco mostraram que a isotretinoína não foi encontrada no compartimento receptor após 8 h para ambas as formulações, indicando que os hidrogéis são capazes de evitar a captação sistêmica de isotretinoína, evitando, portanto, possíveis efeitos adversos sistêmicos. Além disso, a nanoencapsulação da isotretinoína não somente aumentou a penetração do fármaco no estrato córneo de ambas as peles como também prolongou a liberação da isotretinoína nas camadas superficiais. As quantidades de isotretinoína encontradas nas camadas superficiais da pele humana foram maiores que as quantidades encontradas na pele de porco, indicando que a pele de porco é mais permeável que a pele humana e, conseqüentemente, maiores

quantidades de fármaco poderiam ser detectadas nas camadas mais profundas da pele de porco. A penetração cutânea na pele humana e na pele de porco mostrou proporções similares para as duas formulações embora diferentes quantidades de fármaco foram detectadas no estrato córneo de ambas as peles. Um coeficiente de correlação de Pearson positivo de 0,79 foi encontrado após comparar a pele humana com a pele de porco *in vitro*, indicando que a pele de porco pode ser usada como substituto para a pele humana em experimentos *in vitro*, sendo apropriada para prever a penetração cutânea da isotretinoína no estrato córneo humano *in vitro*.

Finalmente, os resultados de penetração cutânea obtidos por *tape stripping in vivo* em humanos em estudo prévio desenvolvido em nosso grupo de pesquisa foram comparados com os resultados obtidos no presente trabalho. Observou-se que os experimentos *in vitro* tanto em pele humana quanto em pele de porco não são capazes de refletir a penetração cutânea da isotretinoína *in vivo*, de modo que nenhuma correlação foi encontrada comparando-se a porcentagem de fármaco liberado no estrato córneo a partir das duas formulações investigadas *in vitro* e *in vivo*. No entanto, é importante ressaltar que a densidade de folículos do antebraço é significativamente menor, sendo diferente da densidade de folículos encontrada na pele de abdômen de ambas as espécies. Concluiu-se, portanto, que o método *in vitro* não foi capaz de prever a penetração percutânea da isotretinoína *in vivo*, tanto livre quanto nanoencapsulada, e que modelos mais representativos devem ser desenvolvidos.

De modo geral, os resultados desse trabalho mostraram que estudos de microdiálise cutânea com fármacos extremamente lipofílicos como a isotretinoína ainda representam um desafio, uma vez que apresentam uma série de limitações. Novas estratégias devem ser desenvolvidas para que a avaliação da penetração cutânea desse tipo de fármaco usando a técnica de microdiálise possa ser realizada. O *tape stripping* se mostrou uma técnica promissora para avaliação da penetração cutânea da isotretinoína *in vitro* nas duas peles testadas, no entanto, esses resultados não puderam ser correlacionados com os resultados *in vivo*, demonstrando a grande variabilidade dos resultados obtidos a partir dessa técnica uma vez que eles dependem principalmente de diferenças inter e intra-espécies.