

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

DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO E CONTROLE DE QUALIDADE DE
NANOPARTÍCULAS CONTENDO ADAPALENO E DAPSONA PARA APLICAÇÃO
CUTÂNEA.

RÚBIA LAZZARETTI PEREIRA TOIGO

PORTO ALEGRE, 2015

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

DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO E CONTROLE DE QUALIDADE DE
NANOPARTÍCULAS CONTENDO ADAPALENO E DAPSONA PARA APLICAÇÃO
CUTÂNEA.

Tese apresentada por **Rúbia Lazzaretti Pereira
Toigo** para obtenção do TÍTULO DE DOUTOR
em Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Profa. Dr. Elfrides E. S. Schapoval

Coorientadora: Profa. Dr. Sílvia Stanisçuaski Guterres

Porto Alegre, 2015

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Doutorado da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 08/07/2015, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof. Dr. Clésio Soldateli Paim
Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA)

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

Prof. Dr. Maximiliano Silva Sangoi
Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)

CIP - Catalogação na Publicação

Toigo, Rúbia Lazzaretti Pereira
Desenvolvimento tecnológico e controle de
qualidade de nanopartículas contendo adapaleno e
dapsona para aplicação cutânea. / Rúbia Lazzaretti
Pereira Toigo. -- 2015.
132 f.

Orientadora: Elfrides Eva Scherman Schapoval.
Coorientadora: Silvia Stanisçuaski Guterres.

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

1. adapaleno. 2. dapsona. 3. cromatografia líquida
de alta eficiência. 4. nanopartículas. 5. acne. I.
Schapoval, Elfrides Eva Scherman, orient. II.
Guterres, Silvia Stanisçuaski, coorient. III. Título.

Este trabalho foi desenvolvido nos Laboratórios 402 e 405 do Departamento de Produção e Controle de Medicamentos, da Faculdade de Farmácia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, com bolsa de estudos CAPES.

APRESENTAÇÃO

De acordo com as normas vigentes no Regimento do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, a presente Tese foi redigida na forma de capítulos, com encarte de publicações, para uma melhor compreensão e discussão dos resultados obtidos. Assim, este exemplar encontra-se dividido da seguinte forma:

- ✓ Introdução: contendo a apresentação do tema;
- ✓ Objetivo geral e objetivos específicos;
- ✓ Revisão Bibliográfica;
- ✓ Capítulo I: Desenvolvimento e validação de metodologia analítica indicativa de estabilidade para formulação de nanocápsulas contendo adapaleno e dapsona;
- ✓ Capítulo II: Desenvolvimento e caracterização de hidrogel contendo nanopartículas de adapaleno e dapsona para aplicação cutânea;
- ✓ Discussão geral: proporcionar uma compreensão geral dos resultados obtidos;
- ✓ Conclusões;
- ✓ Referências.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. OBJETIVOS	21
2.1 Objetivo geral	21
2.2 Objetivos específicos	21
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
3.1 Acne	25
3.2 Pele como via de administração tópica	27
3.3 Tratamentos tópicos da acne	31
3.3.1 Adapaleno	33
3.3.2 Dapsona	35
3.3 Sistemas nanoestruturados	37
4. CAPÍTULO I – Desenvolvimento e validação de metodologia analítica indicativa de estabilidade para formulação de nanocápsulas contendo dapsona e adapaleno.	45
4.1 Introdução	45
Publicação 1: LC stability-indicating method for determination of adapalene and dapsona in novel nanoparticle suspension.	49
5. CAPÍTULO II – Desenvolvimento e caracterização de hidrogel contendo nanopartículas de adapaleno e dapsona para aplicação cutânea.	67
5.1 Introdução	67
Publicação 2: Hydrogel containing adapalene and dapsona loaded lipid-core nanocapsules for cutaneous application: development, characterization, <i>in vitro</i> irritation and permeation studies.	71
6. DISCUSSÃO GERAL	101
7. CONCLUSÕES	111
8. REFERÊNCIAS	115

RESUMO

A *acne vulgaris* é uma patologia cutânea crônica que acomete a unidade pilosebácea resultando em hiperqueratinização, aumento da produção de sebo, inflamação e proliferação bacteriana nos folículos pilosos. Diversos fármacos estão disponíveis para o tratamento da acne, entretanto a combinação de tratamentos tópicos, com diferentes mecanismos de ação, apresentam uma melhor eficácia. Desse modo, o presente trabalho visa o desenvolvimento de um sistema nanocarreador contendo adapaleno e dapsona no intuito de promover melhor seletividade, aumentando a eficiência do tratamento e minimizando efeitos adversos. Neste contexto, desenvolveu-se e caracterizou-se físico-quimicamente uma formulação de nanocápsulas de núcleo lipídico contendo adapaleno e dapsona. A suspensão contendo 0,025 % de adapaleno e 0,07 % de dapsona apresentou diâmetro médio de $194,9 \pm 0,42$ nm, índice de polidispersão de $0,12 \pm 0,02$, potencial zeta $-15 \pm 1,2$ mV, pH $5,1 \pm 0,1$ e eficiência de encapsulação próximos a 100 %. A avaliação da morfologia por microscopia eletrônica de transmissão demonstrou partículas esféricas, homogêneas de dimensões nanométricas. Através da análise de retroespalhamento de luz dinâmico (Turbiscan[®]) não se detectou fenômenos de instabilidade na formulação. Uma nanoemulsão, similarmente preparada, mas sem o uso do polímero, foi desenvolvida para comparação a fim de estabelecer o mecanismo de encapsulação dos fármacos. As suspensões foram incorporadas em veículos semissólidos, hidrogéis de Carpolol[®] 940, e os seguintes estudos foram realizados: comportamento reológico, pH, perfil de liberação, potencial de irritação (HET-CAM) e permeação cutânea *in vitro*. A determinação quantitativa dos ativos foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), e os métodos analíticos foram desenvolvidos e validados de acordo com os códigos oficiais vigentes. As formulações apresentaram perfil não-Newtoniano pseudoplástico. No estudo de liberação *in vitro*, não houve diferença significativa entre as formulações contendo dapsona ($p > 0,05$). Já para o adapaleno, não foi possível estabelecer o perfil de liberação *in vitro* por membrana de diálise. As formulações foram avaliadas como não irritantes pela técnica de HET-CAM. Através dos estudos de permeação cutânea foi possível quantificar os fármacos na epiderme e na derme, e

quantidade não-significativa foi detectada no fluido receptor ($p>0,05$). Comparando as formulações de nanocápsula de núcleo lipídico e nanoemulsão, as quantidades de adapaleno e dapsona em cada camada da pele foi significativamente diferente ($p<0,05$). Em conclusão, os resultados obtidos até o presente momento demonstram que as nanocápsulas de núcleo lipídico são um sistema promissor para aplicação cutânea de adapaleno e dapsona. Contudo, estudos clínicos fazem-se necessários a fim de avaliar a efetividade da formulação no tratamento da acne.

Palavras-chaves: adapaleno, dapsona, cromatografia líquida de alta eficiência, nanopartículas, nanocápsulas, nanoemulsão, acne.

ABSTRACT

Development and Quality Control of nanoparticles containing adapalene and dapsona for cutaneous application.

Acne vulgaris is a chronic skin condition that affects the pilosebaceous unit resulting in hyperkeratinization, increased sebum production, inflammation and bacterial proliferation in hair follicles. Several drugs are available for treating acne, however the combination of topical treatments with different mechanisms of action presents greater effectiveness. Therefore, this study aims to develop a nanocarrier system containing adapalene and dapsona in order to promote better selectivity, increasing efficiency of treatment and minimizing adverse side effects. In this study, a suspension of lipid-core nanocapsules containing adapalene and dapsona was prepared by interfacial deposition of preformed polymer and characterized physicochemically. The suspension containing 0.025 % of adapalene and 0.07 % of dapsona showed an average diameter of 194.9 ± 0.42 nm, a polydispersity index of 0.12 ± 0.02 , zeta potential $-15 \text{ mV} \pm 1.2$, pH 5.1 ± 0.1 and encapsulation efficiency approaching 100 %. The assessment of morphology by transmission electron microscopy showed spherical particles of homogeneous nanometric dimensions. No detectable instability phenomena in the formulation was observed by dynamic light scattering analysis (Turbiscan[®]). A nanoemulsion, similarly prepared but omitting the polymer, was developed to establish the mechanism of drug encapsulation. The suspensions were incorporated into semisolid vehicles, hydrogels of Carbopol[®] 940, and the following studies were performed: rheological behavior, pH, release profile, irritation potential (HET-CAM) and skin permeation *in vitro*. Drug quantification was carried out by high-performance liquid chromatography (HPLC) and analytical methods were developed and validated according to current official guidelines. The formulations exhibited non-Newtonian pseudoplastic profile. In the *in vitro* release study, no significant difference was found between the formulations containing dapsona ($p > 0.05$). However, for adapalene, it was not possible to establish the *in vitro* release profile by dialysis membrane. The formulations were evaluated as non-irritant by HET-CAM technique. Through the skin permeation studies, it was possible to

quantify the drug in epidermis and dermis, and non-significant quantity was detected in the receptor fluid ($p>0.05$). Comparing the lipid-core nanocapsules and nanoemulsion formulations, the amount of adapalene and dapsona in each skin layer was significantly different ($p<0.05$). In conclusion, the results obtained show that the lipid-core nanocapsules are a promising system for cutaneous application of adapalene and dapsona. However, clinical studies are required in order to evaluate the effectiveness of the formulation in the treatment of acne.

Keywords: adapalene, dapsona, high efficiency liquid chromatography, nanoparticles, nanocapsules, nanoemulsion, acne.

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A *acne vulgaris* é uma patologia cutânea crônica comum entre adolescentes e adultos jovens, afetando mais de 80 % das mulheres e 90 % dos homens em todos os grupos étnicos (YOSIPOVITCH *et al.*, 2007). Manifesta-se principalmente na face e no tronco, áreas do corpo ricas em glândulas sebáceas. É uma doença de duração prolongada e algumas vezes desfigurante. Os sintomas variam em cada pessoa, sendo, na maioria das vezes, de pequena e média intensidade. A acne deve ser tratada a fim de evitar sequelas, que podem ser cicatrizes na pele ou distúrbios emocionais, devido à importante alteração na auto-estima de jovens acometidos por esta patologia.

Diversos sistemas carreadores vêm sendo estudados a fim de controlar a liberação de fármacos em sítios de ação específicos, otimizar regimes posológicos, reduzir a toxicidade e/ou proteger substâncias lábeis (BARRATT, 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 específico, de maneira que a liberação sustentada desses fármacos nanoencapsulados possa 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 (YOKOYAMA e OKANO, 1996; BARRATT, 2003). A adesão do paciente ao tratamento pode ser aumentada utilizando-se combinações de ativos para aplicação única diária, proporcionando maior praticidade e comodidade (WILLIAMS *et al.*, 2012).

Em 2008, o uso tópico de dapsona, um agente antibacteriano, foi aprovado pelo Food and Drug Administration para o tratamento de acne moderada a severa (FDA, 2008). Estudos com dapsona 5 % em gel mostraram redução significativa nas lesões acneicas após 2 a 4 semanas de tratamento (DEL ROSSO, 2007; DRAELOS *et al.*, 2007). O adapaleno, retinóide de terceira geração, é um agente comedolítico e anti-inflamatório que vem sendo utilizado amplamente devido aos seus efeitos colaterais mais brandos quando comparado a outras substâncias da mesma classe (SHALITA, 2001).

Cabe ressaltar que não há relatos na literatura associando-se nanopartículas, adapaleno e dapsona. Draelos e colaboradores (2007) destacam que seria interessante

um estudo empregando dapsona gel combinado com retinóides como tazaroteno e/ou adapaleno para o tratamento da acne.

Nesse contexto, o presente trabalho visa o desenvolvimento tecnológico e controle de qualidade de um sistema nanoestruturado contendo adapaleno e dapsona, incorporado a um veículo semissólido, com o intuito de aumentar a penetração cutânea destes fármacos, promovendo um aumento da eficácia terapêutica e redução dos efeitos adversos apresentados durante aplicação tópica.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver e caracterizar um sistema nanoestruturado contendo adapaleno e dapsona, incorporado em forma farmacêutica semissólida, e avaliar a retenção/permeação cutânea dos fármacos a partir desse sistema carreador.

2.2 Objetivos específicos

- Desenvolver nanocápsulas contendo adapaleno e dapsona;
- Caracterizar físico-quimicamente o sistema carreador;
- Desenvolver e validar metodologia analítica para determinação dos fármacos na formulação;
- Incorporar as suspensões de nanopartículas em hidrogel;
- Avaliar as características reológicas da formulação;
- Analisar o potencial de irritação *in vitro*;
- Caracterizar o perfil de liberação *in vitro*;
- Avaliar a retenção dos fármacos na epiderme e na derme;
- Avaliar a permeação cutânea *in vitro*.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Acne

A acne vulgaris é um distúrbio inflamatório crônico que acomete a unidade pilossebácea resultando em hiperqueratinização, aumento da produção de sebo, inflamação e proliferação bacteriana dos folículos pilosos pelo *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*), uma bactéria comensal presente na flora cutânea (THIBOUTOT *et al.*, 2007; WILLIAMS *et al.*, 2012).

Praticamente todos os adolescentes entre 15 e 17 anos possuem algum grau de acne, sendo considerada moderada a severa entre 15 a 20 % destes indivíduos (GHODSI *et al.*, 2009). Em homens e mulheres acima de 25 anos, 40 a 54 % possuem acne facial a qual persiste ao longo da vida em 12 % das mulheres e em 3 % dos homens (CORDAIN *et al.*, 2002).

Considerada uma patologia cutânea universal, a acne é caracterizada pela formação de comedões (lesões não inflamatórias), pápulas e pústulas (lesões inflamatórias) e, menos frequentemente, de nódulos e cistos. Os comedões abertos, comumente conhecidos por cravos, consistem em um tampão hiperkeratótico de coloração escura. Esta coloração é devida à oxidação da melanina dentro da abertura folicular. Os comedões fechados, ou espinhas, possuem coloração branca e não apresentam poro central atenuado (KNUSTEN-LARSON *et al.*, 2012).

Em alguns casos, o quadro pode tornar-se muito intenso, como a acne conglobata, a qual produz grandes lesões císticas, inflamatórias, que se intercomunicam por sob a pele, e a acne queiloideano em que ocorre a formação de cicatrizes queiloideanas após o desaparecimento da inflamação. Além disso, estudos demonstram alterações psicossociais em indivíduos afetados pela doença, como baixa autoestima, depressão e ansiedade (THIELITZ *et al.*, 2006; KRAKOWSKI *et al.*, 2008; TAN, 2009). Uma revisão de diversos estudos comparativos demonstrou que pacientes com acne podem apresentar níveis de ansiedade e depressão maiores que pacientes com doenças sistêmicas como câncer, diabetes e epilepsia (TAN, 2004; KNUSTEN-LARSON *et al.*, 2012). Portanto, um tratamento rápido e eficaz é fundamental para estes pacientes.

As manifestações da doença ocorrem devido a quatro fatores principais: liberação de mediadores inflamatórios, colonização do folículo piloso, alteração do processo de

queratinização e da produção de sebo (WILLIAMS *et al.*, 2012). O aumento da secreção sebácea associada ao estreitamento e obstrução da abertura do folículo pilossebáceo promove o aparecimento de comedões. Estas condições favorecem a proliferação de micro-organismos que promovem um processo inflamatório local (WEBSTER, 2005).

O *P. acnes* é o agente infeccioso mais comumente envolvido e habita a unidade pilossebácea, pois utiliza o sebo como fonte nutricional, o qual é rico em lipídios. Devido à elevada produção de sebo, esta bactéria prolifera-se, levando a um processo inflamatório via ativação do complemento e liberação de subprodutos metabólicos, proteases e fatores quimiotáticos os quais são responsáveis pela atração de neutrófilos (KNUSTEN-LARSON *et al.*, 2012). Face, pescoço, área peitoral, ombros e costas são os locais mais comumente afetados devido a maior quantidade de unidades pilossebáceas (WILLIAMS *et al.*, 2012).

Além disso, a acne pode estar associada à síndrome do ovário policístico ou ainda ser causada ou agravada por alguns fármacos (VALEYRIE-ALLANORE *et al.*, 2007; WILLIAMS *et al.*, 2012). Hormônios exógenos como testosterona, progesterona e danazol podem induzir a formação desta desordem cutânea, visto que, a acne é uma patologia da unidade pilossebácea, a qual é regulada por hormônios. Outros fármacos administrados por via sistêmica como fenitoína, glicocorticóides, inibidores do fator de crescimento, isoniazida, lítio e vitaminas do complexo B (B₂, B₆ e B₁₂) podem proporcionar erupções acneiformes. Ao contrário da *acne vulgaris*, a acne medicamentosa é caracterizada por uma erupção monomórfica de pápulas e pústulas, e classicamente afeta a região do tronco ao invés da face. Comedões estão tipicamente ausentes (LOLIS *et al.*, 2009).

Adicionalmente, sabe-se que fatores genéticos e etnia estão associados a uma predisposição à acne (BATAILLE *et al.*, 2002; SHALITA, 2004; KNUSTEN-LARSON *et al.*, 2012). Indivíduos hispânicos e afrodescendentes apresentam uma maior propensão ao desenvolvimento de cicatrizes e hiperpigmentação, respectivamente (TAYLOR *et al.*, 2002; DRENO e POLI, 2003; KNUSTEN-LARSON *et al.*, 2012).

Estudos demonstraram que outros fatores como estresse, obstrução da pele por produtos oleosos ou vestimentas e tabagismo também influenciam no desenvolvimento

da acne (SCHAFER *et al.*, 2001; KLAZ *et al.*, 2006). Até o presente momento, não há um consenso nos estudos que comprovem a relação desta patologia com dieta, exposição ao sol e higiene da pele. Segundo Magin e colaboradores (2004), agentes de limpeza podem apresentar algum benefício no tratamento da acne moderada, entretanto, limpezas excessivas da superfície cutânea podem remover a camada oleosa da pele e estimular uma maior produção de óleo. Portanto, a acne é uma patologia complexa influenciada tanto por fatores genéticos quanto por fatores ambientais.

3.2 Pele como via de administração tópica

A pele é o órgão mais extenso do corpo humano, de constituição heterogênea e quase impermeável, capaz de impedir a entrada de agentes exógenos e a perda de água transepidérmica. Entretanto, a pele pode também ser utilizada como uma porta de entrada para substâncias terapêuticas. Essas substâncias capazes de penetrá-la, em geral, promovem baixas concentrações sistêmicas, minimizando, assim, possíveis efeitos adversos (VOLPATO *et al.*, 2009; PROW *et al.*, 2011). Além disso, a via cutânea possibilita a vetorização do ativo na área afetada (GUTERRES *et al.* 2007).

As três camadas que compõem a pele são: epiderme, derme e hipoderme. A epiderme é avascular, composta por diversas camadas de queratinócitos em diferentes estágios de diferenciação celular. Os queratinócitos passam por um processo de queratinização, em que as células diferenciam-se, movem-se da camada basal até o estrato córneo, tornando-se anucleadas e achatadas e são eliminadas periodicamente. Em geral, esse processo de descamação da camada mais externa do estrato córneo, conhecida como estrato *disjunctum*, ocorre a cada 14 dias. Células com funções de percepção sensorial (células de Merkel), imunológicas (Langerhans) e produtoras de melanina (melanócitos) encontram-se intercaladas entre os queratinócitos na epiderme viável. As camadas que formam a epiderme são conhecidas como basal, espinhosa, granulosa e córnea (ASBILL e MICHNIAK, 2000; FOLDAVARI, 2000; RIBEIRO, 2006; VOLPATO *et al.*, 2009; PROW *et al.*, 2011).

Na camada basal encontra-se o maior número de células em divisão e através de complexos juncionais especializados, denominados hemidesmossomas, realiza a

ligação com a derme. Acima da camada basal, encontra-se a camada espinhosa formada por várias fileiras de células, coesas entre si pelos desmossomas. A camada granulosa, responsável pela formação da bicamada lipídica, previne a desidratação das camadas adjacentes da epiderme e oferece resistência à absorção percutânea (FOLDAVARI, 2000; RIBEIRO, 2006).

A camada mais externa da epiderme é o estrato córneo (10-20 μm), o qual é formado por células densas, funcionalmente mortas, queratinizadas, denominadas de corneócitos. Estas células são envoltas por uma bicamada lipídica, multilamelar (VOLPATO *et al.*, 2009). Atua como a principal barreira de substâncias aplicadas topicamente, mas, também, como um reservatório para formulações aplicadas por esta via, devido as suas características de hidrofobicidade e sua elevada organização estrutural. O transporte de substâncias através da camada córnea ocorre principalmente por difusão passiva (FERNANDEZ *et al.*, 2000; FOLDVARI, 2000; PROW *et al.*, 2011).

A derme possui, aproximadamente, 2 mm de espessura, proporciona resistência física frente a agressões e fornece nutrientes à epiderme. A derme é composta por colágeno, fibras elásticas, vasos sanguíneos, terminações nervosas, assim como folículos pilosos, glândulas sebáceas e sudoríparas (apócrinas e écrinas) (RIBEIRO, 2006; VOLPATO *et al.*, 2009). A hipoderme, formada por tecido adiposo, atua como isolador térmico, absorvedor de choque e região de armazenamento de energia (VOLPATO *et al.*, 2009).

As formulações tópicas apresentam três potenciais vias de absorção através da pele: glândulas sudoríparas, estrato córneo e folículos pilosos. Moléculas de fármacos podem penetrar o estrato córneo tanto pela matriz intercelular (entre os corneócitos), através dos corneócitos (via transcelular) e dos apêndices cutâneos, conforme ilustrado na Figura 1. Estes apêndices ocupam 0,1 % da área de superfície total da pele, portanto, a contribuição no transporte total pela pele, para a maioria das formulações convencionais tópicas é considerada negligenciável (ALVAREZ-ROMÁN *et al.*, 2004). Contudo, a principal via de penetração de fármacos são os canais intercelulares, envolvendo a difusão de moléculas pela matriz lipídica entre os corneócitos (BOUWSTRA *et al.*, 2000; VOLPATO *et al.*, 2009).

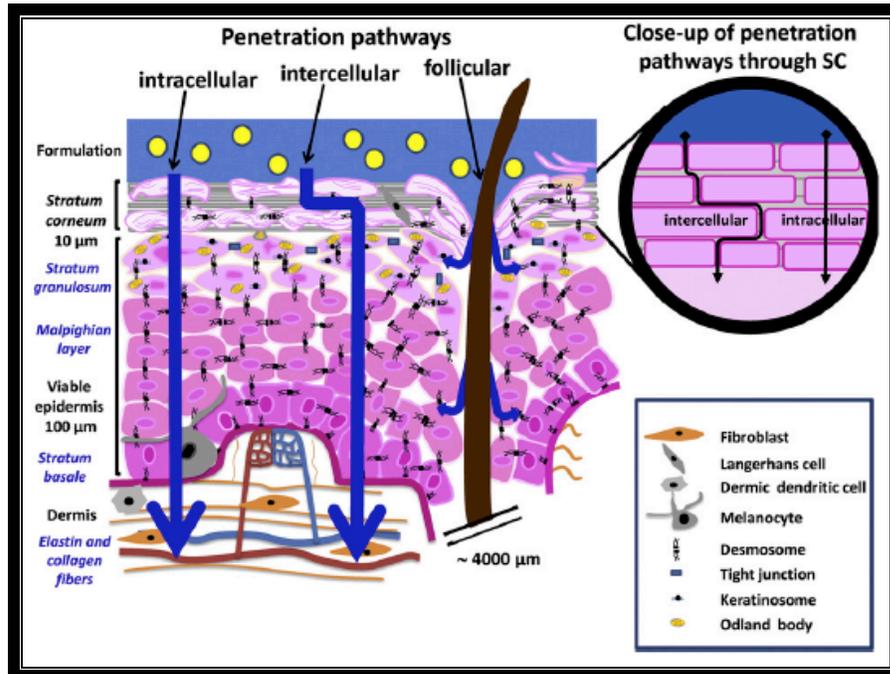


Figura 1: Ilustração dos três principais caminhos de penetração cutânea: intracelular, intercelular e folicular.

Fonte: BOLZINGER *et al.*, 2012.

As partículas depositam-se em diferentes regiões da pele de acordo com o tamanho, em geral, partículas maiores que 10 µm permanecem na superfície da pele, partículas entre 3–10 µm concentram-se nos folículos pilosos, e partículas menores que 3 µm penetram igualmente nos folículos pilosos e no estrato córneo (SCHAEFER, 1990; BARRY, 2005). Portanto, no caso de formulações particuladas, a rota via apêndices pode apresentar grande importância (ALVAREZ-ROMÁN *et al.*, 2004; LADEMANN *et al.*, 2007). Du Plessis *et al.* (1994) relataram a contribuição da via folicular na liberação de ativos lipossomais em camadas mais profundas da pele. Rolland *et al.* (1993) descreveram que microesferas de poli(L-ácido láctico-co-ácido glicólico) fluorescentes (5 µm), dispersadas em gel aquoso foram claramente visualizadas em estruturas pilosebáceas em pele humana e de ratos, após 35 minutos de permeação passiva, enquanto, a penetração pelo estrato córneo não foi observada. Alvarez-Román *et al.* (2004) demonstraram que nanopartículas (20 nm) menores possuíam maior afinidade pelos espaços foliculares, provavelmente, pela sua maior área superficial. Além disso, através de microscopia confocal, pode-se observar que as nanocápsulas poliméricas se

acumulam nas aberturas foliculares de modo tempo-dependente.

Recentemente, os folículos pilosos têm sido considerados como um caminho alternativo para absorção dérmica, pois facilitam a permeação (RABER *et al.*, 2014). Contribuem significativamente na absorção de pequenas moléculas, especialmente aquelas com coeficientes de partição octanol-água baixos ou intermediários. Devido à baixa taxa de *clearance* do fluxo seboso e crescimento folicular, os sistemas nanoestruturados formam um depósito dentro dos folículos, onde ficam protegidos do contato com a roupa e não são facilmente removidos. Além disso, o estrato córneo está ausente no terço inferior dos folículos pilosos, facilitando a absorção destas substâncias. Os folículos pilosos estão diretamente relacionados em patologias como a acne, portanto devem ser considerados um sítio alvo de ação (THIBOUTOT, 2004; RABER *et al.*, 2014).

Para fármacos, cujo sítio de ação é restrito à superfície da pele ou às primeiras camadas, objetiva-se prevenir sua passagem para as camadas mais profundas da pele, a fim de não induzir efeitos secundários devido à exposição sistêmica. Obtendo-se, portanto, somente um efeito local, mantendo concentrações efetivas do fármaco no tecido alvo (ASBILL e MICHNIAK, 2000; KREILGAARD, 2002; ALENCASTRE *et al.*, 2006; BETTONI, 2009).

A encapsulação utilizando sistemas nanoestruturados tem sido uma estratégia proposta para administração tópica de fármacos a fim de aumentar o transporte percutâneo. Estudos demonstraram que a encapsulação de moléculas altamente lipofílicas, como o octil-metoxicinamato, em nanopartículas contendo poli- ϵ -caprolactona, aumentaram significativamente a taxa e o transporte através da pele suína. Embora esses sistemas são indiscutivelmente capazes de aumentar a penetração e distribuição cutânea, o mecanismo pelo qual este aumento é obtido ainda não está esclarecido (ALVAREZ-ROMÁN *et al.*, 2004).

3.3 Tratamentos tópicos da acne

Atualmente, existem diversos fármacos de ação tópica disponíveis comercialmente para o tratamento da acne. A terapia tópica é considerada o tratamento de primeira escolha em casos de acne papulopustular de leve a moderada ou comedonal. Nas formas mais severas, como na presença de nódulos, cistos ou cicatrizes, uma terapia adicional sistêmica é necessária (LAYTON, 2006; ZAENGLEIN, 2008).

As terapias tópicas reduzem novas lesões, portanto requerem a aplicação em toda área afetada, ao invés de locais específicos. Entretanto, a maioria dos ativos causam irritação inicial da pele, e assim diminuem a adesão do paciente ao tratamento. A irritação pode ser minimizada, começando com formulações de baixa dosagem e aumentando gradativamente a frequência ou dose (WILLIAMS *et al.*, 2012).

Fármacos recomendados para o tratamento da acne incluem retinóides, peróxido de benzoíla, antimicrobianos e alfa-hidroxiácidos. Outros ativos, como ácido salicílico, ácido azelaico e, recentemente, a dapsona também são utilizados. A combinação desses agentes é comum, visto que a maioria dos medicamentos não age em todos os fatores patogênicos (THIBOUTOT *et al.*, 2007). Somente a isotretinoína oral deve ser utilizada como monoterapia (KATSAMBAS e CUNLIFFE, 2004). Existem diversas evidências científicas comprovando que a combinação de tratamentos tópicos, com diferentes mecanismos de ação, agem com melhor eficácia do que um único agente (WILLIAMS *et al.*, 2012).

O mecanismo de ação de antibióticos tópicos no tratamento da acne ainda não foi claramente definido, mas parece agirem diretamente no *P. acnes*, reduzindo o processo inflamatório. Antibióticos tópicos possuem menor atividade do que outros agentes contra lesões não-inflamatórias. Em casos de acne mais severa, antibióticos tópicos são usualmente combinados com outros produtos, como retinóides tópicos ou peróxido de benzoíla. Dentre os antibióticos tópicos utilizados podem-se citar: a eritromicina e a clindamicina. Entretanto, a eritromicina possui eficácia reduzida devido ao desenvolvimento de resistência bacteriana (WILLIAMS *et al.*, 2012).

Derivados sintéticos do retinol (vitamina A), os retinóides tópicos têm sido utilizados na terapia anti-acne desde 1962, sendo a tretinoína (ácido trans-retinóico) a primeira substância a ser estudada (JAIN, 2004). Da classe dos retinóides empregados

no tratamento da acne, encontram-se também a isotretinoína (ácido 13-cis-retinóico), motretinida, retinol, β - glicuronídeo, retinaldeído, tazaroteno (retinóide acetilênico) e o adapaleno (derivado do ácido naftóico), sendo a isotretinoína e o adapaleno, os mais prescritos na Europa (KRAUTHEIM e GOLLNICK, 2004; THIELITZ *et al.*, 2006). Estruturalmente, o adapaleno e tazaroteno são distantes da vitamina A, entretanto possuem capacidade de se ligarem aos receptores do ácido retinóico, expandindo a definição do termo “retinóides” para incluir tais agentes (AKYOL e OZÇELIK, 2005).

Os retinóides reduzem e inibem a formação microcomedões de forma dose-dependente, influenciam na proliferação e diferenciação de células do epitélio folicular, ademais, podem exercer atividade imunomodulatória direta (KRAUTHEIM e GOLLNICK, 2003; LAYTON, 2006; THIELITZ *et al.*, 2006; ZAENGLEIN, 2008). Atuando principalmente como comedolíticos, os retinóides tópicos são fármacos de primeira escolha para a maioria das formas de acne, além de serem essenciais para a manutenção da terapia quando o tratamento oral é interrompido.

A aplicação tópica dos retinóides também altera o microclima folicular e promove aumento da penetração de outros compostos como antibióticos tópicos e peróxido de benzoila. Portanto, para melhores resultados, devem ser utilizados no início do desenvolvimento da acne e combinados com terapia antimicrobiana quando lesões inflamatórias estão presentes (GOLLNICK *et al.*, 2003).

Devido ao seu potencial irritante, novas formulações e fármacos com maior tolerabilidade têm sido desenvolvidos (LAYTON, 2006; ZAENGLEIN, 2008). Estudos demonstraram que formulações com dosagens mais altas possuem melhor atividade que doses mais baixas, mas proporcionam maior irritação. Todos os retinóides tópicos induzem a reações locais e o tratamento deve ser descontinuado se forem severas, além disso, aumentam a sensibilidade da pele à luz ultravioleta (WILLIAMS *et al.*, 2012). Cabe ressaltar, que os retinóides também podem atuar no tratamento de outras patologias dermatológicas, como psoríase, câncer de pele, rosácea, lúpus eritematoso, terapia antienvhecimento entre outras (ZOUBOULIS, 2001).

3.3.1 Adapaleno

O adapaleno (Figura 2) apresenta as seguintes características:

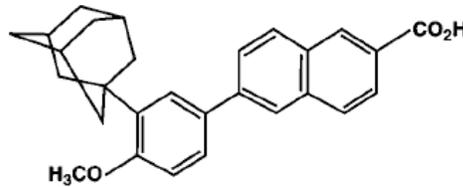


Figura 2: Fórmula estrutural do adapaleno.

- Nomes químicos: 6-[3-(1-adamantil)-4-methoxyphenil]-2-ácido naftóico; 6-[3-(1-adamantil)-4-methoxyphenil]-2-ácido naftalenocarboxílico; ácido 2-naftalenocarboxílico
- Fórmula molecular: $C_{28}H_{28}O_3$
- Classe química: retinóides
- Registro no Chemical Abstracts (CAS): 106685-40-9
- Massa molar: 412,52 g/mol
- pka: $4,23 \pm 0,30$
- logP: $8,21 \pm 0,768$
- Faixa de fusão: $606,3 \pm 55$ °C
- Solubilidade: solúvel em tetraidrofurano, ligeiramente solúvel em etanol e praticamente insolúvel em água.
- Apresentações comerciais: Differin[®] gel (0,1 % e 0,3 %) e Adacne[®] gel 0,1 %).

(THE MERCK, 2000; SCIFINDER, 2015).

Classificado como retinóide de terceira geração, derivado do ácido naftóico, apresenta menos efeitos adversos e melhor tolerabilidade quando comparado a outros fármacos da mesma classe. Dentre os efeitos adversos mais frequentemente encontrados, pode-se citar: prurido, vermelhidão, descamação, dermatite de contato, queimação e aumento da fotossensibilidade. Possui propriedades anti-inflamatórias, anticomedogênica e comedolítica, com boa tolerabilidade. Atua na prevenção de novas lesões, bem como nas lesões já existentes. Além disso, aumenta a penetração de outros agentes, como, por exemplo, antimicrobianos, apresentando um efeito de sinergismo (IRBY *et al.*, 2008). Estudos investigando a eficácia e segurança do

adapaleno usado em combinação com antibióticos orais e tópicos, mostraram que a associação dos medicamentos é mais efetiva que a monoterapia com antibiótico no tratamento da acne (THIBOUTOT *et al.*, 2007).

A maior tolerabilidade do adapaleno, comparada a outros retinóides, pode estar relacionada a uma maior afinidade por alguns receptores. Ao contrário da tretinoína, o adapaleno não se liga ao ácido retinóico citosólico de proteínas de ligação, mas seletivamente ao receptor do ácido retinóico nuclear (RAR) e os subtipos β e γ . Esta afinidade de ligação seletiva do adapaleno é responsável pelo efeito comedolítico, pois proporciona uma maior inibição da diferenciação de queratinócitos quando comparado à tretinoína (SHROOT e MICHEL, 1997; CZERNIELEWSKI *et al.*, 2001; IRBY, 2008;).

O mecanismo de ação do adapaleno parece estar relacionado com a normalização da diferenciação das células do epitélio folicular, resultando na diminuição da formação de microcomedões. Atuando, então, nos seguintes mecanismos presentes na patogênese da acne vulgar: nos processos de queratinização e diferenciação anormal da epiderme, e no processo inflamatório que ocorre após a formação microcomedão (GALDERMA, 2003).

O adapaleno inibe a resposta inflamatória, a formação do microcomedão e de antígenos bacterianos. Suas propriedades anti-inflamatórias estão relacionadas à inibição das respostas quimiotáticas e quimiocinéticas dos leucócitos polimorfonucleares humanos e também no metabolismo por lipoxidação do ácido araquidônico para mediadores pró-inflamatórios (IRBY *et al.*, 2008). Portanto, é um fármaco eficaz na redução de pápulas e pústulas, as quais são componentes inflamatórios da acne.

3.3.2 Dapsona

A dapsona, derivada da anilina (Figura 3), pertencente ao grupo das sulfonas, com ação principalmente bacteriostática.

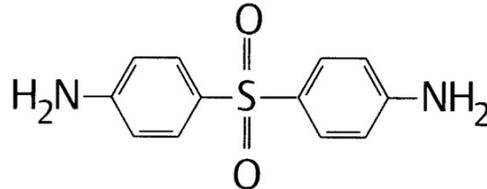


Figura 3: Fórmula estrutural da dapsona.

- Nomes químicos: 4,4'-diaminodifenilssulfona, 4,4'-sulfonildianilina;
- Fórmula molecular: C₁₂H₁₂N₂O₂S
- Classe química: sulfonas
- Registro no Chemical Abstracts (CAS): 80-08-0
- Massa molar: 248,30 g/mol
- pka: 1,24 ± 0,10
- logP: 0,991 ± 0,34
- Faixa de fusão: 175-176 °C
- Solubilidade: água 0,2 mg/mL e metanol 52 mg/mL.
- Apresentações comerciais: Aczone gel 5 %.

(THE MERCK, 2000; SCIFINDER, 2015).

Empregada, desde 1943, no tratamento da hanseníase, a dapsona é também utilizada em outras afecções, como na profilaxia da malária, na dermatite herpetiforme, na policondrite, no lupus eritematoso, na artrite reumatoide, na policondrite relapsa, na pseudopoliartrite rizomélica, na pneumonia causada pelo *Pneumocystis carinii*, no sarcoma de Kaposi, erupções auto-imunes e em medicina veterinária (MANDELL e PETRI, 1996; ZANINI e OGA, 1997; MARTINDALE, 1999).

Antigamente, as sulfonas eram usadas preferencialmente como agentes antimicrobianos e quimioterápicos para tratar infecções causadas por *Streptococcus*, *micobacteria* etc. A dapsona é a única sulfona congênera utilizada na terapêutica humana devido ao seu mecanismo duplo de ação, antimicrobiano e anti-inflamatório, além de disso, também apresenta efeitos imunomodulatórios (WOZEL, 2010).

Em 2008, a dapsona foi aprovada pelo Food and Drug Administration (FDA) para uso tópico no tratamento da acne, entretanto, até o presente momento, é comercializada apenas nos Estados Unidos como Aczone[®] (Allergan, CA, EUA) (FDA, 2008). Resultados de estudos clínicos com dapsona (n=1506) mostraram uma redução de 8 % das lesões não inflamatórias e 6 % das lesões inflamatórias, em comparação com placebo, após um período de tratamento de 12 semanas (DRAELOS *et al.*, 2007). Outros estudos demonstraram também a eficácia da dapsona por via tópica para outras patologias dermatológicas além do tratamento da *acne vulgaris*, como psoríase, urticária, rosácea, alopecia areata, entre outras. Schumacher (1996 *apud* WOZEL, 2010)¹ observou uma diminuição de eritema induzido por radiação UVB após aplicação tópica de dapsona nas concentrações de 0,1 %, 0,5 %, 1 %, 5 % e 10 % em voluntários saudáveis com pele sol-reativa Tipo II e III. A explicação teórica para a supressão do eritema pode ser devida a uma ação inibitória sobre as prostaglandinas. Outros estudos reportaram efeitos de metabólitos da dapsona quando aplicados topicamente, os quais apresentaram propriedades anti-inflamatórias semelhantes à dapsona (WOZEL *et al.*, 1999; ASCHOFF *et al.*, 2000).

Diversas teorias têm sido relatadas a fim de explicar o mecanismo de ação da dapsona em doenças inflamatórias crônicas. Entretanto, pouco se sabe sobre o efeito molecular específico da dapsona ou de seus metabólitos que levam à eficácia clínica. Autores destacam que um potencial mecanismo de ação da dapsona no tratamento da acne pode ser a direta inibição do deslocamento de leucócitos polimorfonucleares (PMN). Embora, estudos anteriores indicaram que a dapsona parece exercer mínimo efeito inibitório sobre PMN. Em voluntários humanos, um metabólito da dapsona, dapsona hidroxilamina (DDS-NOH), demonstra uma forte atividade inibitória de leucotrienos B4 (LTB4) induzindo a acumulação de leucócitos polimorfonucleares na pele (WOZEL *et al.*, 1997; WOZEL *et al.*, 2010).

¹ SCHUMACHER K. Humane in-vivo-Untersuchungen zur antientzündlichen Wirksamkeit von Diaminodiphenylsulfon (Dapson) [thesis]. Dresden, Germany: Department of Dermatology, University Hospital Carl Gustav Carus Dresden, 1996 *apud* WOZEL, V.E.G. Innovative use of dapsone. **Dermatologic Clinics**, v. 28, p. 599-610, 2010.

Portanto, uma explicação da eficácia da dapsona por via tópica no tratamento da acne pode ser a geração de DDS-NOH através de PMN ativados na pele. Contudo, uma investigação do mecanismo de ação da dapsona em dermatoses sulfonossensíveis ainda é necessária (PFEIFFER e WOZEL, 2003).

Devido a potenciais efeitos adversos hematológicos associados à administração sistêmica da dapsona, diversos estudos tem demonstrado um crescente interesse no desenvolvimento de formulações tópicas de dapsona (WOZEL, 2010). Entretanto, uma das maiores desvantagens da terapia tópica no tratamento da acne são os problemas de tolerabilidade, pois eritema, pele seca, escamação e irritação cutânea podem levar à descontinuidade do tratamento (LEYDEN, 1998).

3.4 Sistemas nanoestruturados

As nanopartículas poliméricas são sistemas carreadores que apresentam diâmetros inferiores a 1 μm e diferem entre si, de acordo com a composição e organização estrutural. As nanopartículas podem consistir de uma matriz polimérica biodegradável, onde o fármaco pode ficar retido ou adsorvido, não apresentando óleo na sua composição (nanoesfera), ou de um invólucro polimérico, contendo um sistema reservatório oleoso (nanocápsula), podendo o fármaco estar dissolvido neste núcleo e/ou adsorvido à parede polimérica (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; ÁLVARES-ROMÁN *et al.*, 2004) (Figura 4).

O núcleo das nanocápsulas age como um reservatório para o fármaco ou ativo. Uma única substância química ou uma mistura de várias podem ser utilizadas como componente estrutural do núcleo. Esses componentes podem dissolver ou dispersar a substância ativa. Em geral, nanocápsulas apresentam alta capacidade de encapsulamento comparada a nanoesferas poliméricas, como uma consequência da solubilidade do fármaco ou ativo no núcleo oleoso. Entretanto, a capacidade de encapsulamento neste caso, é limitada a concentração de saturação do fármaco na fase orgânica das nanocápsulas quando o óleo é o único componente estrutural do núcleo (COUVREUR *et al.*, 2002).

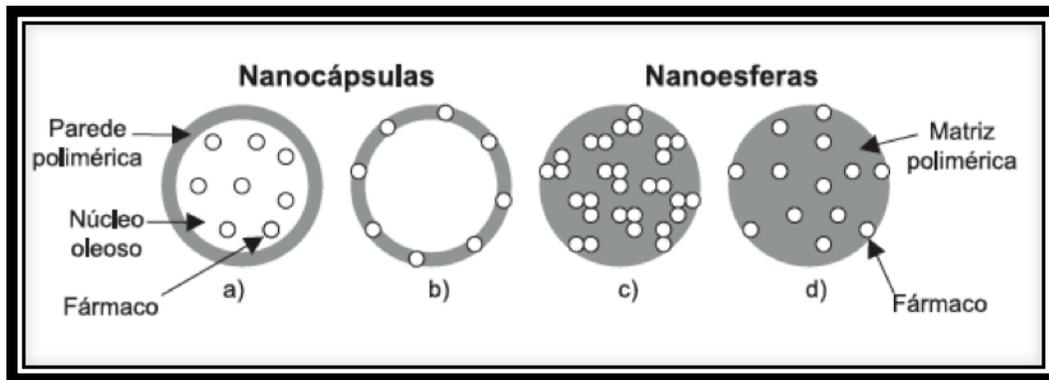


Figura 4: Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas: a) fármaco dissolvido no núcleo oleoso das nanocápsulas; b) fármaco adsorvido à parede polimérica das nanocápsulas; c) fármaco retido na matriz polimérica das nanoesferas; d) fármaco adsorvido ou disperso molecularmente na matriz polimérica das nanoesferas.

Fonte: SCHAFFAZICK *et al.*, 2003.

Em estudos prévios no laboratório, desenvolveu-se um novo modelo de nanocápsula, denominado nanocápsulas de núcleo lipídico, composto de uma parede polimérica de poly(ϵ -caprolactona) (PCL) em torno de uma dispersão de monoestearato de sorbitano em triglicerídeos de cadeia média (VENTURINI *et al.*, 2011). Esta estrutura supramolecular de núcleo lipídico é um híbrido de um carreador sólido lipídico e polimérico (Figura 5). As nanocápsulas de núcleo lipídico são uma solução aquosa coloidal de coloração branca leitosa em que os ativos podem estar dissolvidos ou dispersos no núcleo do colóide e/ou adsorvidos na parede polimérica (BRUM *et al.*, 2014). Em geral, para as nanocápsulas poliméricas, a barreira mais importante para liberação do fármaco é a parede polimérica, enquanto, para as nanocápsulas de núcleo lipídico, além da barreira da parede, a viscosidade do núcleo também é um fator considerável. Além disso, as nanocápsulas de núcleo lipídico apresentaram-se mais rígidas do que formulações similares sem monoestearato de sorbitano (FIEL *et al.*, 2011). Em relação ao polímero utilizado, PCL é o mais empregado devido a sua biocompatibilidade, propriedades mecânicas e por ser biodegradável. Devido ao fato de ser um polímero semicristalino, sua degradação é mais lenta comparada com poliésteres amorfos como poli-ácido láctico e seus copolímeros com ácido glicólico (GUTERRES *et al.*, 2007).

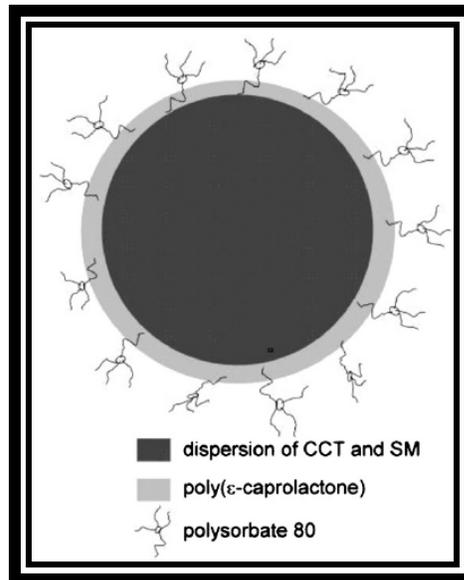


Figura 5: Modelo ilustrativo de uma nanocápsula de núcleo lipídico.

Fonte: VENTURINI *et al.*, 2011.

Devido ao tamanho reduzido, os nanocarreadores possibilitam um aumento do contato de moléculas ativas com o estrato córneo, além de facilitar sua formulação em produtos dermatológicos e propiciar confortável aplicação (ALVES *et al.*, 2007; GUTERRES *et al.*, 2007). Os três principais locais para direcionamento de sistemas nanoestruturados por via tópica são: superfície do estrato córneo, linhas de expressão (dermatoglifos) e nos folículos pilosos (infundíbulo), conforme ilustrado na Figura 6.

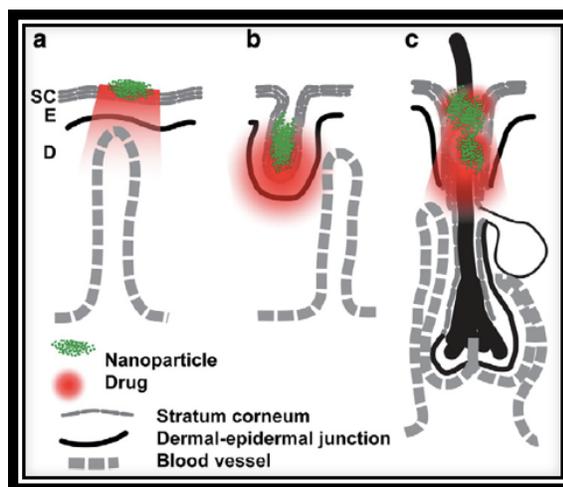


Figura 6: Potenciais sítios de ação na pele para nanopartículas: superfície do estrato córneo (a); rugosidade (b) e folículos pilosos (c). Outros sítios de ação como epiderme viável (E) e derme (D).

Fonte: PROW *et al.*, 2011.

Um estudo publicado por Shim e colaboradores (2004), utilizando pele de porcos da Índia com e sem pêlos em célula de difusão de Franz, avaliaram o mecanismo de permeação de nanopartículas poliméricas preparadas com poli(ϵ -caprolactona)-*b*-poli(etilenoglicol) contendo minoxidil e o efeito do tamanho das nanopartículas sobre a taxa de permeação do ativo. Os resultados demonstraram que as partículas com menor tamanho facilitaram a permeação do minoxidil, aumentando 1,5 vezes a quantidade permeada até a epiderme e 1,7 vezes a quantidade no fluido receptor, em pele com pêlos. Entretanto, utilizando pele sem pêlos, a permeação do minoxidil não foi dependente do tamanho de partícula, sugerindo que a liberação ocorreu principalmente nos folículos pilosos.

Estes sistemas coloidais apresentam vantagens como baixa toxicidade, aumento da estabilidade de fármacos, devido à proteção que oferecem às substâncias neles associadas, e à capacidade de provocarem uma liberação controlada das mesmas em sítios específicos. Estas características estão condicionadas à natureza do polímero utilizado, ao tipo de partícula e ao campo de aplicação a que se destinam (QUINTANAR-GUERRERO *et al.*, 1998; COUVREUR *et al.*, 2002). Entre os fatores que afetam a absorção cutânea estão as propriedades físico-químicas do próprio ativo e do polímero utilizado para formular as nanopartículas poliméricas, as especificações do veículo, e o estado fisiológico da pele. Além disso, estes sistemas também podem ser utilizados com a finalidade de restringir a penetração de substâncias, como filtros UV (VETTOR *et al.*, 2010) ou para aumentar a adesividade do ativo na pele (GUTERRES *et al.*, 2007).

Nas últimas décadas, nanocápsulas poliméricas tem sido estudadas e propostas tanto para uso sistêmico quanto para uso tópico. Carreadores nanoestruturados para aplicação tópica tem sido amplamente utilizados devido a diversas vantagens sobre as formulações convencionais (GUTERRES *et al.*, 2007). Estudo publicado por Alves e colaboradores (2007), demonstrou que as nanocápsulas poliméricas contendo poli(ϵ -caprolactona), incorporadas em hidrogel, propiciam elevada penetração da nimesulida, um anti-inflamatório não esteroide, em camadas mais profundas da pele quando comparadas com outros carreadores (nanoesferas e nanoemulsão).

Existem vários métodos relatados na literatura para a preparação de

nanopartículas poliméricas, os quais podem ser, de uma forma geral, classificados em métodos baseados na polimerização *in situ* de monômeros dispersos (cianoacrilato de alquila), categorizados como métodos químicos, (SAKUMA *et al.*, 1997; LAMBERT *et al.*, 2000) ou na precipitação de polímeros pré-formados, denominados de métodos físico-químicos, tais como poli(ácido láctico) (PLA), poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA), poli(ϵ -caprolactona) (PCL) e, ainda, os copolímeros do ácido metacrílico e de um éster acrílico ou metacrílico (ESPUELAS *et al.*, 1997; MARCHAIS *et al.*, 1998; QUINTANAR-GUERRERO *et al.*, 1998; SANTOS-MAGALHÃES *et al.*, 2000).

Nos métodos químicos, nanocápsulas podem ser preparadas através da polimerização de monômeros em nanoemulsões. A etapa de polimerização é realizada sob agitação constante na presença de um iniciador usando condições específicas (pH, temperatura, etc.). O monômero pode ser adicionado tanto na fase orgânica antes da mistura com a fase aquosa ou na fase externa após a preparação da nanoemulsão. A taxa de polimerização deve ser alta a fim de permitir a formação da parede polimérica ao redor da gotícula de óleo (AL KHOURY-FALLOUH *et al.*, 1986; COUVREUR *et al.*, 2002).

Métodos físico-químicos envolvem precipitação interfacial de polímeros pré-formados, o qual está baseado no método de deslocamento do solvente que foi proposto em Fessi e colaboradores, em 1989. Este método utiliza uma estratégia denominada em nanotecnologia de “bottom-up”, em que a fase orgânica contendo óleo, polímero, um solvente solúvel em água e um ativo hidrofóbico, é introduzida na fase aquosa contendo água e tensoativo sob agitação moderada. As gotículas de óleo são geradas por emulsificação espontânea simultaneamente à precipitação do polímero na interface óleo-água. Para a formação de nanocápsulas, a principal condição requerida é a insolubilidade do polímero na fase interna que contém o óleo, e na fase externa composta pela água (FESSI *et al.*, 1989). Além disso, a alta miscibilidade do solvente orgânico em água é essencial para o processo de emulsificação espontânea, a fim de causar supersaturação do óleo na mistura, levando a sua nucleação em pequenas gotículas. O polímero precipita no núcleo oleoso devido a sua reduzida solubilidade em ambas as fases (VITALE e KATZ, 2003; GANACHAUD e KATZ, 2005; POLETTO *et al.*, 2011).

Outros métodos físico-químicos existentes para preparação de nanopartículas por deposição interfacial de polímeros pré-formados consistem em processos mecânicos que utilizam altas taxas de cisalhamento. Dentre eles, podem-se citar: emulsificação-
evaporação do solvente, deslocamento do solvente, salting-out e por emulsificação-
difusão do solvente (SOUTO *et al.*, 2012).

4. CAPÍTULO I – Desenvolvimento e validação de metodologia analítica indicativa de estabilidade para formulação de nanocápsulas contendo adapaleno e dapsona.

4.1 INTRODUÇÃO

A análise de fármacos é imprescindível nas diversas fases de desenvolvimento farmacêutico, tais como: estudo de formulação e estabilidade, controle de qualidade e em ensaios farmacológicos e toxicológicos *in vivo*. Portanto, o controle de qualidade é uma ferramenta fundamental, o qual visa garantir a segurança e eficácia de um medicamento (SWARTZ e KRULL, 1998; SETHI, 1999; GIL, 2010).

A escolha de uma metodologia analítica adequada é de fundamental importância para o procedimento de controle de qualidade. Os métodos analíticos utilizados nas determinações qualitativas e quantitativas, devem ser devidamente validados, desde a matéria-prima até as especialidades farmacêuticas, incluindo todas as fases do desenvolvimento do fármaco, desde a pesquisa até o controle de qualidade (RIBANI *et al.*, 2004; GIL, 2010). O objetivo da validação de um método é demonstrar, por meio de estudos experimentais, que o mesmo é apropriado para as aplicações analíticas pretendidas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Para tanto, deve apresentar as seguintes características de desempenho: especificidade, linearidade, limite de detecção e quantificação, precisão, exatidão, e robustez (BRASIL, 2003, ICH, 2005; USP, 2014).

Dentre os diversos métodos analíticos existentes, os métodos cromatográficos são normalmente os mais utilizados para avaliação qualitativa e quantitativa de fármacos em matérias-primas, produtos acabados e amostras biológicas (RIBANI *et al.*, 2004). A técnica por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é um método de larga utilização em razão da sua versatilidade, possibilitando a separação e quantificação de diferentes componentes de uma formulação, bem como produtos de degradação ou impurezas de síntese, através da escolha das condições ideais de análise, como: coluna, fase móvel e método de detecção (MALVIYA *et al.*, 2010).

Os estudos de degradação forçada demonstram a especificidade quando o método é desenvolvido como indicativo de estabilidade. O ICH recomenda a realização de teste de degradação para elucidar a característica de estabilidade dos fármacos (ICH, 2003). Estudos de degradação forçada fornecem informações sobre mecanismos de degradação e potenciais produtos de degradação. Estas informações podem ser utilizadas para os processos de fabricação ou para selecionar embalagens adequadas

(KLICK *et al.*, 2005). Além disso, o teste de estabilidade fornece informações sobre como a qualidade do produto varia frente a diversos fatores, como, por exemplo, temperatura, umidade, luz, reações de hidrólise e oxidação (BAKSHI e SINGH, 2002). Cabe ressaltar que a estabilidade depende das propriedades físicas, químicas e físico-químicas dos fármacos, excipientes, materiais de acondicionamento utilizados e fatores ambientais como temperatura, umidade e luz (BRASIL, 2005).

Assim, o presente capítulo trata do desenvolvimento de métodos analíticos indicativos de estabilidade, por CLAE, para detecção e quantificação do adapaleno e de dapsona na formulação de nanocápsulas. Estes métodos foram devidamente validados a fim de garantir confiabilidade e rastreabilidade dos resultados.

**4.2 LC STABILITY-INDICATING METHOD FOR DETERMINATION OF ADAPALENE
AND DAPSONE IN NOVEL NANOPARTICLE SUSPENSIONS.**

Artigo Submetido

Este capítulo é constituído por artigo científico, que no texto integral da tese defendida ocupa o intervalo compreendido entre as páginas 49-63.

REFERENCES

- [1] A.M. Layton, *Int. J. Clin. Pract.*, **60**, 64 (2006).
- [2] A.L. Zaenglein, *Semin. Cutaneous Med. Surg.*, **177** (2008).
- [3] H.C. Williams, R.P. Dellavalle and S. Garner, *The Lancet*, **379**, 361 (2012).
- [4] *The Merck Index; Version 12.3; An encyclopedia of chemicals, drugs and biologics*. New Jersey, 2000.
- [5] D.R. Lima, *Manual de Farmacologia Clínica Terapêutica e Toxicologia*, v.1, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2004.
- [6] S. Piskin and E. Uzunali, *Ther. Clin. Risk Manage*, **3**, 4 (2007).
- [7] C.E. Irby, B.A. Yentzer and S.R. Feldman, *Journal of Adolescent Health*, **43**, 421 (2008).
- [8] D.M. Thiboutot, J. Weiss, A. Bucko, L. Eichenfield, T. Jones, S. Clarck, Y. Liu, M. Graeber and S. Kang, *J. Am. Acad. Dermatol.*, **57**, 791 (2007).
- [9] G.L. Mandell and W.A. Petri in J.G. Hardman, L.E. Limbird (eds) *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*. McGrawhill, New York, 1996.
- [10] A.C. Zanini and S. Oga, *Farmacologia Aplicada*, 3rd ed., Atheneu, São Paulo 1997.
- [11] *Martindale; The Complete Drug Reference*, 32th ed., Pharmaceutical Press, London, 1999.
- [12] United States Food and Drug Administration,
<http://www.fda.gov/safety/medwatch/safetyinformation/safetyrelateddruglabelingchanges/ucm116199.htm> (Accessed March 01, 2008).
- [13] V.E.G. Wozel, *Dermatol. Clin.*, **28**, 599 (2010).
- [14] J.J. Leyden, *J. Am. Acad. Dermatol.*, **38**, S1-4 (1998).
- [15] V. Bettoli, O. Sarno, S. Zauli, A. Borghi, S. Minghetti, M. Ricci, L. Mantovani, G. Toni and A.W. Virgili, *Annales de dermatologie et de vénéréologie*, **137**, 34 (2010).
- [16] J.G. Barrios, G.D. Farias, I. Roggia, S.C. Peixoto, F.R. Pons, M. Bruschi, R.P. Raffin and M.P. Alves, *Quím. Nova*, **34**, 1464 (2011).

- [17] G.S. Santos, G.G. Pereira, E.A. Bender, L.M. Colomé and S.S. Guterres, *Quím Nova*, **35**, 1388 (2012).
- [18] H. Fessi, F. Puisieux, J-Ph Devissaguet, N. Ammoury and S. Benita, *Int. J. Pharm.*, **55**, R1 (1989).
- [19] C.G. Venturini, E. Jager, C.P. Oliveira, A. Bernardi, A. Battastini, S.S. Guterres and A.R. Pohlmann, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **375**, 200, (2011).
- [20] M. Bakshi and S. Singh, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **28**, 1011 (2002).
- [21] Validation of Analytical methods text and methodology Q2(R1). International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, 2005.
- [22] United States Pharmacopeia 37, Rockville, 2014.
- [23] United States Food and Drug Administration. Reviewer Guidance: Validation of Chromatographic Methods, 1994.
- [24] G.A. Shabir, *J. Chromatogr. A*, **987**, 56 (2003).
- [25] N.E.S. Nudelman (ed) *Estabilidad de Medicamentos*, El Atheneo: Buenos Aires, 1975, pp. 23-41.

5. CAPÍTULO II – Desenvolvimento e caracterização de hidrogel contendo nanopartículas de adapaleno e dapsona para aplicação cutânea.

5.1 INTRODUÇÃO

Diversas estratégias tem sido estudadas a fim de otimizar a eficácia terapêutica de inúmeras substâncias químicas, modulando suas propriedades físico-químicas e biofarmacêuticas ou minimizando/eliminando efeitos adversos. Dentre elas, podem-se citar os sistemas carreadores nanoestruturados, em especial as nanopartículas poliméricas, as quais tem sido extensivamente estudadas para administração sistêmica e tópica (JALÓN, *et al.*, 2001; COUVREUR *et al.*, 2002; PAESE *et al.*, 2009; OURIQUE *et al.*, 2011; POLETTO *et al.*, 2011).

As nanopartículas poliméricas são sistemas carreadores biocompatíveis e biodegradáveis, que apresentam diâmetro submicrométrico, variando entre 10 a 1000 nm. São estruturas coloidais constituídas por vesículas de um fino invólucro polimérico e uma cavidade central composta por um núcleo oleoso, no qual a substância ativa encontra-se dissolvida e/ou adsorvida à parede polimérica, sendo, por isso, consideradas um sistema reservatório (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; ÁLVARES-ROMÁN *et al.*, 2004).

Estes sistemas apresentam vantagens como a proteção do ativo frente a processos de degradação, por diminuir seu contato com os demais componentes da formulação, além de permitir uma liberação gradual da substância, concomitantemente com o aumento do tempo de contato com a pele, evitando possíveis irritações locais passíveis de ocorrer com o ativo na forma livre (CUA *et al.*, 1990; CALVO *et al.*, 1997; KUMAR, 2000; LBOUTONNE *et al.*, 2002; JIMÉNEZ *et al.*, 2004). Devido ao seu tamanho reduzido, nanocarreadores podem também ser uma opção para melhorar a penetração de diversas substâncias na pele (GUTERRES *et al.*, 2007; SHIN *et al.*, 2010).

Nesse contexto, este capítulo descreve o desenvolvimento e caracterização físico-química de suspensões de nanocápsulas poliméricas de núcleo lipídico contendo adapaleno e dapsona, incorporadas em hidrogel, a fim de minimizar efeitos adversos ou até mesmo proporcionar um aumento dos benefícios terapêuticos pela via cutânea.

5.2 HYDROGEL CONTAINING ADAPALENE AND DAPSONE LIPID-CORE NANOCAPSULES FOR CUTANEOUS APPLICATION: DEVELOPMENT, CHARACTERIZATION, *IN VITRO* IRRITATION POTENTIAL AND PERMEATION STUDIES.

Artigo publicado no periódico Drug Development and Industrial Pharmacy

Este capítulo é constituído por artigo científico, que no texto integral da tese defendida ocupa o intervalo compreendido entre as páginas 71-98.

References

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, 2004.

ALVES, M.P., RAFFIN, R.P., FAGAN, S.B. Rheological behavior of semisolid formulations containing nanostructured systems. In: BECK, R. GUTERRES, S.; POHLMANN, A. **Nanocosmetics and Nanomedicines. New Approaches for the Skin Care**. Springer, p. 37-45, 2011.

ALVES, M.P.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S. Semisolid topical formulations containing nimesulide-loaded nanocapsules, nanospheres or nanoemulsion: development and rheological characterization. **Pharmazie**, v. 60, p. 900–904, 2005.

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, 2007.

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

BENDER, E.A.; ADORNE, M.D.; COLOMÉ, L.M.; ABDALLA, D.S.P.; GUTERRES, S.S.; POHLMANN, A.R. Hemocompatibility of poly(epsilon-caprolactone) lipid-core nanocapsules stabilized with polysorbate 80-lecithin and uncoated or coated with chitosan. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 426, p. 271-279, 2012.

BETTOLI, V.; SARNO, O.; ZAULI, S.; BORGHI, A.; MINGHETTI, S.; RICCI, M.; MANTOVANI, L. TONI, G.; VIRGILI, A. W. What's new in acne? New therapeutic. **Annales de dermatologie**, v. 137 (5), p. 34-38, 2010.

BETTONI, C.C.; FELIPPI, C.C.; ANDRADE, C. RAFFIN, R.P.; JAGER, A.; GUTERRES, S.S.; COSTA, T.D. Isotretinoin-Loaded Nanocapsules: Stability and Cutaneous Penetration by Tape Stripping in Human and Pig Skin. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 8 (2), p. 258-271, 2012.

BORGES, V.R.A.; SIMONS, A.; SENA, A.R.C.; CABRAL, L.M.; SOUSA, V.P. Nano emulsion containing dapsona for topical administration: a study of in vitro release and epidermal permeation. **International Journal of Nanomedicine**, p. 535 – 544, 2013.

BRUM, T.; FIEL, L.A.; CONTRI, R.V.; GUTERRES, S.S.; POHLMANN, A.R. Polymeric Nanocapsules and Lipid-Core Nanocapsules Have Diverse Skin Penetration. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 14, p. 1–8, 2014.

CALVO, P.; VILA-JATO, J.L.; ALONSO, M.J. Comparative in vitro evaluation of several colloidal systems, nanoparticles, nanocapsules and nanoemulsions, as ocular drug carrier. **Journal of Pharmaceutical Science**, v. 85, p. 530–536, 1996.

COLLIER, C.N.; HARPER, J.C.; CANTRELL, W.C.; WANG, W.; FOSTER, K.W.; ELEWSKI, B.E. The prevalence of acne in adults 20 years and older. **Journal of the American Academy of Dermatology** v. 58, p. 56-59, 2008.

DATE, A.A.; NAIK, B.; NAGARSENKER, M.S. Novel drug delivery systems: potential in improving topical delivery of antiacne agents. **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 19, p. 2-16, 2006.

DURÁN, N.; TEIXEIRA, Z., MARCATTO, P.D. Topical Application of Nanostructures: Solid Lipid, Polymeric and Metallic Nanoparticles. In: BECK, R. R. GUTERRES, S.; POHLMANN, A. **Nanocosmetics and Nanomedicines. New Approaches for the Skin Care**. Springer, p.37-45, 2011.

FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J-Ph.; AMMOURY, N.; BENITA, S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 55, R1-R4, 1989.

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.

ICH - International Conference on Harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. Validation of Analytical methods text and methodology Q2(R1). ICH Steering Committee, Switzerland, 2005.

IRBY, C.E.; YENTZER, B.A.; FELDMAN, S.R. A review of adapalene in the treatment of acne vulgaris. **Journal of Adolescent Health**, v. 43, p. 421-4214, 2008.

JAGER, E.; VENTURINI, C.G.; POLETTO, F.S.; COLOMÉ, L.M.; POHLMANN, J.P.U.; BERNARDI, A.; BATTASTINI, A.M.O.; GUTERRES, S.S.; POHLMANN, A.R. Sustained release from lipid-core nanocapsules by varying the core viscosity and the particle surface area. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 5, p. 130-140, 2009.

JAIN, A.K.; JAINA, A.; GARGA, N.K.; AGARWALA, A.; JAINA, A.; JAINA, S.A.; TYAGIC, R.K.; JAINA, R.K.; AGRAWALE,H.; AGRAWALA, G.P. Adapalene loaded solid lipid nanoparticles gel: An effective approach for acne treatment. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 121, p. 222–229, 2014.

LIU, W.; HU, M.; LIU, M.; XUE, C.; XU, H.; YANG, X.L. Investigation of the carbopol gel of solid lipid nanoparticles for the transdermal iontophoretic delivery of triamcinolone acetonide acetate. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 364, p. 135-141, 2008.

LUEPKE, N.P. Hen's Egg Chorioallantoic Membrane Test for Irritation Potential. **Chemical Toxicology**, v.23, p. 287-291. 1985.

KATZER, T.; CHAVES, P.; BERNARDO, A.; POHLMANN, A.; GUTERRES, S.S.; BECK, R.C. Prednisolone-loaded nanocapsules as ocular drug delivery system: development, *in vitro* drug release and eye toxicity. **Journal of Microencapsulation**, v. 31(6), p.519-528, 2013.

KNUTSEN-LARSON, S.; DAWSON, A.L.; DUNNICK, C.A.; DELLAVALE, R.P. Acne vulgaris: pathogenesis, treatment, and needs assessment. **Dermatology Clinic**, v. 30, p. 99-106, 2012.

MICHALOWSKI, C.B.; GUTERRES, S.S.; DALLA COSTA, T. Microdialysis for evaluating the entrapment and release of a lipophilic drug from nanoparticles, **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 35, p. 1093–1100, 2004.

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

MUNAVALLI, G.S.; WEISS, R.A. Evidence for laser- and light-based treatment of acne vulgaris. **Seminars in Cutaneous and Medical Surgery**, v. 27, p. 207-211, 2008.

PAESE, K. **Desenvolvimento tecnológico, estudo de fotoestabilidade e avaliação da permeação cutânea *in vitro* da benzofenona-3 a partir de nanocápsulas poliméricas incorporadas em diferentes veículos semissólidos**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)- Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, 2008.

POLETTO, F.S.; BECK, R.C., GUTERRES, S.S., POHLMANN, A.R. Polymeric Nanocapsules: Concepts and Applications. In: BECK, R. GUTERRES, S.; POHLMANN, A. **Nanocosmetics and Nanomedicines. New Approaches for the Skin Care**. Springer, p. 49-68, 2011.

OLIVEIRA, C.; VENTURINI, C.G.; DONIDA, B.; POLETTO, F.S.; GUTERRES, S.S.;

POHLMANN, A.R. An algorithm to determine the mechanism of drug distribution in lipid-core nanocapsule formulations. **Soft Matter**, v. 9, p. 1141-1151, 2013.

OURIQUE, A.F.; MELERO, A.; SILVA, C.B.; SCHAEFER, U.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S.; LEHR, C.M.; KOSTKA, K.H.; BECK, R.C.R. Improved photostability and reduced skin permeation of tretinoin: Development of a semisolid nanomedicine. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 79(1), p. 95-101, 2011.

PAESE, K.; JÄGER, A.; POLETTO, F.S.; PINTO, E.F.; ROSSI-BERGANN, B.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S. Semisolid Formulation Containing a Nanoencapsulated Sunscreen: Effectiveness, In Vitro Photostability and Immune Response. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 5, p. 1–7, 2009.

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.

SCHAFFAZICK, S.R.; SIQUEIRA, I.R.; BADEJO, A.S., JORNADA, D.S.; POHLMANN, A.R.; NETTO, C.A.; GUTERRES, S.S. Incorporation in polymeric nanocapsules improves the antioxidant effect of melatonin against lipid peroxidation in mice brain and liver. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 69(1), p. 64-71, 2008.

SPIELMANN, H.; LIEBSCH, M. HET-CAM Test. INVITTOX Protocol 47. Available online:http://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/ocutox_docs/ocubrd/hetcam/hetcamappa1.pdf, 2004.

TERROSO, T.; KULKAMP, I.C.; JORNADA, D.S.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S. Development of semi-solid cosmetic formulations containing coenzyme Q-10 loaded nanocapsules. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 28 (6), p.819-826, 2009.

USP. United States Pharmacopeia 37, US Pharmacopeial Convention, Rockville, MD, 2014.

VENTURINI, C.G.; JAGER, E.; OLIVEIRA, C.P.; BERNARDI, A.; BATTASTINI, A.; GUTERRES, S.S.; POHLMANN, A.R. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**. v. 375, p. 200-208, 2011.

WILLIAMS, H.C.; DELLAVALLE, R.P.; GARNER, S. Acne Vulgaris. **The Lancet**, v. 379, p. 361-370, 2012.

WOZEL, V.E.G. Innovative use of dapsons. **Dermatologic Clinics**, v. 28, p. 599-610, 2010.

6. DISCUSSÃO GERAL

6. Discussão geral

Recentemente, diversos estudos demonstram um crescente interesse pela pele como uma via atrativa e acessível para administração de fármacos (OURIQUE *et al.*, 2011; SHAHINAZE *et al.*, 2013; GE *et al.*, 2014). Por sua vez, o desenvolvimento de formulações tópicas inovadoras capazes de proporcionar diminuição de efeitos adversos, maior adesividade na pele, controle na liberação de ativos e aumento da penetração cutânea tem sido de grande interesse no âmbito farmacêutico. Neste contexto, os nanocarreadores poliméricos mostram-se sistemas promissores capazes proporcionar um maior desempenho das substâncias ativas na pele, aumentando a resposta terapêutica no sítio de ação por um período de tempo prolongado.

Para tanto, o presente trabalho visou o desenvolvimento de uma formulação nanoestruturada, contendo adapaleno e dapsona, incorporada em um veículo semissólido para aplicação tópica, bem como os estudos necessários para o controle de qualidade da mesma. Até o presente momento, não há nenhum relato na literatura de uma formulação contendo ambos os fármacos. Em um estudo do próprio grupo de pesquisa, foi desenvolvida uma formulação de nanopartículas lipídicas, denominadas de teoesferas, destinada à aplicação tópica de dapsona. Neste trabalho, as nanopartículas foram preparadas por homogeneização a alta pressão, apresentando como principais componentes a manteiga de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) e o óleo de castanha do Brasil (*Bertholletia excelsa*) (SANTOS *et al.*, 2012). Outro estudo, publicado por Borges e colaboradores (2013), apresenta o desenvolvimento de nanoemulsões de dapsona utilizando diferentes concentrações de miristato de isopropila, N-metil-pirrolidona, isobutanol, Tween 80 e Span 20. Barrios e colaboradores (2011) descrevem o preparo de suspensões de nanocápsulas contendo adapaleno, utilizando óleo de melaleuca como componente lipídico. Jain *et al.* (2014) relatam o desenvolvimento de nanopartículas lipídicas sólidas de adapaleno incorporadas em gel de Carbopol® 934.

Para doseamento dos ativos, faz-se necessário um método analítico eficaz, capaz de quantificar os fármacos presentes na formulação. Na literatura constam algumas metodologias para detecção do adapaleno e da dapsona por cromatografia líquida de alta eficiência (BARRIOS *et al.*, 2011; MUDASIR *et al.*, 2011; SANTOS *et al.*, 2012; BP,

2013; USP, 2014). Estudos preliminares utilizando alguns desses métodos foram realizados, entretanto, tornou-se necessário realizar diversas modificações, como comprimento de onda, coluna, vazão e proporção de fase móvel a fim de otimizar e adequar os métodos analíticos às condições de trabalho e à formulação desenvolvida. Os métodos foram validados segundo os Guias Oficiais (BRASIL, 2003; ICH, 2005) e demonstraram-se específicos, lineares, precisos, exatos e robustos. A validação dos métodos permitiu a determinação qualitativa e quantitativa dos fármacos de uma maneira rápida e eficiente. Estudos de degradação forçada, com a solução amostra e padrão das substâncias ativas, foram realizados a fim de determinar a especificidade do método, proporcionando a validação de um método indicativo de estabilidade. Os resultados obtidos demonstram a instabilidade do adapaleno em condições fotolíticas, oxidativas, ácidas e alcalinas. A dapsona apresentou-se instável mediante exposição à radiação UV-C, em meio alcalino e oxidativo.

Inicialmente, foram realizados diversos ensaios pilotos para a produção de nanocápsulas de núcleo lipídico, utilizando diferentes concentrações de ativos. Tentou-se nanoencapsular os ativos separadamente, realizando duas suspensões distintas, a fim de obter-se concentrações maiores dos fármacos. Estas suspensões poderiam ser incorporadas separadamente ao hidrogel. Entretanto, a concentração máxima dos ativos nanoencapsulada foi a mesma em suspensões distintas, bem como em uma única suspensão. Assim, optou-se por trabalhar com uma suspensão única, contendo adapaleno e dapsona. Para fins comparativos, desenvolveu-se uma emulsão submicrométrica (nanoemulsão) contendo a mesma fórmula qualitativa e quantitativa das nanocápsulas de núcleo lipídico, omitindo o polímero. Esta é uma estratégia frequentemente utilizada a fim de estabelecer o mecanismo de encapsulação dos fármacos, através da comparação dos perfis de liberação das nanocápsulas e das nanoemulsões (BETTONI *et al.*, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2012). Além disso, face às características físico-químicas dos ativos, optou-se por utilizar esta formulação comparativa, pois outras estratégias como adição de ciclodextrinas, incremento da quantidade de tensoativo ou uso de cossolventes teriam diversas variáveis influenciando na permeabilidade. De acordo com Borges *et al.* (2014), em formulações para uso tópico, a fase aquosa e os tensoativos afetam a permeabilidade da pele pela

hidratação do estrato córneo e quebra da matriz de lipoproteína, resultando numa diminuição da resistência do fármaco à difusão, promovendo um aumento da permeação.

A primeira etapa no desenvolvimento de novas formulações é a caracterização físico-química. Portanto, após a obtenção da suspensão de nanopartículas, estas foram caracterizadas em termos de tamanho de partícula, distribuição de tamanho (índice de polidispersão – PDI), potencial zeta, pH, morfologia, comportamento reológico, eficiência de encapsulação e avaliação da estabilidade. A segunda etapa do trabalho baseou-se nos estudos de liberação *in vitro* utilizando saco de diálise, potencial de irritação (HET-CAM) e estudo de permeação cutânea *in vitro* em célula de Franz.

Algumas características físico-químicas, como tamanho de partícula, são fundamentais para a estabilidade do sistema. Sendo este um importante parâmetro utilizado no controle de qualidade, pois a estabilidade física das dispersões depende do tamanho de partícula e de sua distribuição (MÜLLER-GOYMANN, 2004). Durante o desenvolvimento das nanopartículas, por deposição interfacial do polímero pré-formado, o controle de tamanho médio e da distribuição de tamanho é dependente do baixo grau de agregação na fase orgânica da solução, antes de incorporá-la na fase aquosa (BRUM *et al.*, 2014). O potencial zeta reflete o potencial de superfície de partículas, o qual é influenciado pelas mudanças na interface com o meio dispersante, em razão da dissociação de grupos funcionais na superfície da partícula ou da adsorção de espécies iônicas presentes no meio aquoso de dispersão. É um parâmetro utilizado para avaliar a estabilidade física das suspensões, a efetividade de mecanismos de revestimento de superfície ou adsorção de fármacos na superfície das nanopartículas. Cabe ressaltar, que as características de superfície das partículas também podem alterar a resposta biológica do fármaco associado, pois influenciam na sua deposição e/ou penetração no tecido biológico. Ambas as formulações, nanocápsula e nanoemulsão, apresentaram valores negativos de potencial zeta, que são importantes para manter o sistema sem agregação ou precipitação devido às forças eletrostáticas de repulsão. Estudos prévios demonstraram que as partículas carregadas negativamente interagem mais efetivamente com a superfície da pele do que partículas positivas (LEE *et al.*, 2013, RABER *et al.*, 2014). Valores elevados em módulo indicam

suspensões mais estáveis, pois a repulsão entre as partículas previne a agregação (SCHAFFAZICH *et al.*, 2003).

A avaliação da morfologia, utilizando microscopia eletrônica de transmissão (MET), tem sido empregada para obtenção de informações relativas à forma e ao tamanho das nanopartículas (SCHAFFAZICH *et al.*, 2003; GUTERRES *et al.*, 2007). As fotomicrografias mostraram partículas esféricas, homogêneas, de dimensões nanométricas e sem a presença de cristais aparentes. A presença de cristais pode contribuir negativamente na estabilidade física dos sistemas, ocasionando falta de homogeneidade devido à sedimentação dessas partículas (POHLMANN *et al.*, 2008). Ademais, a estabilidade física da formulação foi confirmada pela baixa variação de *backscattering* realizada por espalhamento múltiplo de luz.

O monitoramento do pH fornece informações relevantes sobre a estabilidade de suspensões nanoparticuladas. Alterações de pH pode ser indicio de degradação do polímero. No entanto, a diminuição dos valores de pH de suspensões coloidais poliméricas, em um curto período de tempo, pode ser atribuída tanto à ionização de grupos carboxílicos presentes no polímero, quanto à hidrólise, dependendo da hidrofobicidade do poliéster (SCHAFFAZICH *et al.*, 2003). O pH das formulações desenvolvidas demonstraram-se adequados para via tópica e similares aos valores relatados na literatura para estes sistemas.

Após a etapa de caracterização físico-química, as suspensões foram incorporadas em um veículo semissólido. De um modo geral, formulações para a via tópica são baseadas em emulsões ou géis devido à habilidade tecnológica de controle de viscosidade, a qual proporciona características apropriadas para aplicação cutânea (GUTERRES *et al.*, 2007). Optou-se pelo uso de Carbopol[®] 940, devido a sua habilidade de proporcionar alta viscosidade em baixas concentrações e sua compatibilidade com diversas substâncias. Além disso, considerando-se que a patologia da acne está relacionada com a elevada produção de sebo, e pessoas acneicas tendem a ter uma pele mais oleosa, faz-se necessário uma formulação base não oleosa.

A escolha das matérias-primas define a reologia da formulação que reflete nas propriedades de espalhamento sobre a pele (GUTERRES *et al.*, 2007). Além disso, o

comportamento reológico está associado a aspectos de absorção e biodisponibilidade, bem como à escolha correta dos equipamentos a serem utilizados na produção da formulação, portanto, é de extrema importância no desenvolvimento de produtos farmacêuticos e como ferramenta de controle de qualidade (NETZ e ORTEGA, 2002). A viscosidade de uma substância é a resistência ao fluxo quando submetida a uma tensão; quanto maior a viscosidade, maior a resistência (MARTIN *et al.*, 1993). Estudos reológicos envolvem a relação da taxa de cisalhamento pela tensão de cisalhamento. Quando a relação é linear, o fluido é descrito como Newtoniano e sua viscosidade é constante, independente da taxa e da tensão aplicada. Entretanto, quando a relação não é linear, classifica-se o fluido como não-Newtoniano. Estes fluidos podem ser viscoelásticos, independentes do tempo (plástico, pseudoplástico e dilatante) e dependentes do tempo (tixotrópicos ou reopéxicos) (ALVES *et al.*, 2011). Além da dependência da taxa, fluidos pseudoplásticos podem ser tixotrópicos, dependentes também do tempo de cisalhamento. Nestes casos, mesmo para taxas constantes de cisalhamento, a viscosidade reduz em função do tempo (SCHRAMM, 2006). As curvas de fluxo de fluidos tixotrópicos apresentam distinção entre as curvas ascendentes e descendentes, e este fenômeno é denominado de histerese. A presença de loop de histerese indica que ocorreu uma ruptura na estrutura, e a área dentro do loop pode ser usada como um índice do grau dessa ruptura (BARRY, 2005; ALVES *et al.*, 2011). Este comportamento foi observado para as formulações desenvolvidas, ou seja, não-Newtoniano pseudoplástico tixotrópico. A tixotropia apresenta um importante fator em aplicação percutânea. Este fenômeno acontece quando a preparação é submetida a uma força de cisalhamento e ocorre quebra em sua estrutura, levando a uma diminuição gradual da viscosidade, auxiliando no seu espalhamento na pele. Quando a força de cisalhamento é removida, a viscosidade se restabelece gradativamente e o aumento da viscosidade ajuda a manter a formulação na pele (LIU *et al.*, 2008).

Fluxos não-Newtonianos podem apresentar diversos comportamentos, obtendo-se diferentes tipos de reogramas. Assim, modelos matemáticos como Bingham, Ostwald, Hershel-Bulkley e Casson, embora não leve em consideração a dependência em relação ao tempo, tem sido aplicados para descrever o comportamento reológico destes fluidos, como índice de fluxo ou viscosidade (BARRY, 2005; ALVES *et al.*,

2011). As curvas de fluxo, ou reogramas, das formulações desenvolvidas indicaram o modelo de Hershel-Bulkley como o mais apropriado.

Estudos de liberação *in vitro*, pelo método de difusão em saco de diálise, foram realizados a fim de estabelecer o perfil de liberação dos fármacos. No caso das nanocápsulas, os fármacos, teoricamente dissolvidos no núcleo oleoso, seriam liberados desta estrutura vesicular mediante a sua difusão através da parede polimérica. Entretanto, para o adapaleno a quantidade de fármaco liberada durante as 8 h de análise foi muito baixa, impossibilitando a modelagem matemática. Este resultado foi observado em ambas as formulações (nanocápsulas e nanoemulsão), provavelmente, devido a algumas limitações da técnica. Conforme descrito por Michalowski e colaboradores (2004), a baixa solubilidade de alguns fármacos lipofílicos no meio de liberação, torna difícil a obtenção de um perfil de liberação confiável, pois a alta diluição requerida para atingir a condição sink, devido à concentração de saturação, acaba ultrapassando o limite de quantificação. Outros meios de dissolução foram testados, como a combinação de tampão fosfato e Tween 80 em diferentes concentrações e pH, porém, o melhor resultado de solubilização encontrado foi em etanol:água (1:1). O adapaleno é um fármaco lipofílico, solúvel em tetra-hidrofurano, entretanto a adição desse cossolvente alteraria a estrutura da membrana de diálise. Já para a dapsona, pode-se observar resultados semelhantes da formulação de nanocápsula comparada com a nanoemulsão, não havendo diferença significativa ($p > 0.05$). Segundo Oliveira e colaboradores (2012), perfis de liberação similares dos fármacos em nanocápsulas e nanoemulsões são, em geral, obtidos quando o fármaco está dissolvido na pseudo-fase externa ou mais concentrado na pseudo-fase interface. Quando uma dissolução mais lenta das nanocápsulas comparado às nanoemulsões é observado, o mecanismo de encapsulação corresponde à internalização do fármaco nas nanocápsulas sendo uma provável consequência da parede polimérica. Segundo Soppimath e colaboradores (2001), a liberação dos fármacos a partir de sistemas nanoparticulados poliméricos depende de diferentes fatores como da dessorção das moléculas adsorvidas na superfície das partículas, difusão através da parede polimérica (nanocápsulas) ou da matriz (nanoesferas), degradação do polímero, peso molecular, cristalinidade ou da combinação dos processos de difusão e erosão. A liberação também é influenciada

pelo pka do fármaco, juntamente com o pH do meio de liberação, os quais definem o grau de ionização (BRUXEL *et al.*, 2012).

Estudos de permeação cutânea *in vitro* são utilizados para a avaliação da segurança e eficácia de produtos destinados à aplicação cutânea e para a otimização dos processos de desenvolvimento de produtos para uso tópico. Além disso, a possibilidade de prever e correlacionar dados obtidos a partir de experimentos *in vitro* (BETTONI, 2009). Os experimentos mostraram que o adapaleno não foi encontrado no compartimento receptor após 8 h para ambas as formulações, evitando, assim, possíveis efeitos sistêmicos. Já para a dapsona, a quantidade encontrada não foi significativa, podendo ser atribuída a uma possível micro fissura ou lesão na pele, bem como, extravasamento da formulação para o meio receptor durante a montagem da célula de Franz. No estudo de retenção cutânea, houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre as formulações de nanocápsula e nanoemulsão. Para o adapaleno, houve maior retenção na epiderme e na derme com o hidrogel contendo a nanoemulsão, já para a dapsona, o oposto foi observado, ou seja, a formulação de nanocápsulas apresentou maior retenção cutânea em ambas as camadas da pele.

Com base nos resultados encontrados, pressupõe-se que o adapaleno, devido ao fato ser um fármaco altamente lipofílico, deve estar dissolvido no núcleo lipídico das nanocápsulas, promovendo uma liberação mais controlada, proporcionando quantidades menores na pele quando comparado com a nanoemulsão, que é uma estrutura menos rígida em virtude da ausência da parede polimérica. A difusão do fármaco através da parede polimérica é mais lenta quando este encontra-se disperso no núcleo (OLIVEIRA *et al.*, 2012). Entretanto, devido às limitações do ensaio de liberação *in vitro* por membrana de diálise, não foi possível obter os perfis de liberação do adapaleno em cada formulação, a fim de auxiliar na compreensão do mecanismo de liberação. No caso da dapsona, o fármaco deve estar adsorvido à parede polimérica da nanocápsula, e demonstrou chegar em maiores concentrações nas camadas da pele, epiderme e derme, quando comparado com à nanoemulsão.

Segundo Kalia e Guy (2001), o transporte de fármacos através do estrato córneo, a camada mais externa da epiderme, é complexo e representa um obstáculo na liberação de diversas moléculas em nível terapêutico. Não existe regra para prever a

permeação de nanocarreadores, devido ao fato de depender das características físico-químicas de cada sistema, como hidrofobicidade, rigidez e diâmetro de partícula (ALVAREZ-ROMÁN *et al.*, 2004; TEIXEIRA *et al.* 2010). O coeficiente de partição entre o veículo e o estrato córneo é um dos fatores que controla a permeabilidade dos fármacos, estabelecendo uma concentração maior nas camadas mais externas da pele (MORGANTI *et al.* 2001; TING *et al.* 2004). Além disso, o efeito oclusivo, devido à pequena dimensão das partículas carreadoras, também é um fator considerável que afeta a penetração de fármacos, podendo ocasionar um controle maior da penetração dos sistemas nanoestruturados (JAIN *et al.*, 2014).

No estudo publicado por JAIN *et al.* (2014), em que desenvolveu-se um gel de nanopartículas lipídicas sólidas contendo adapaleno, observou-se também uma maior quantidade do fármaco na epiderme, pois, de acordo com Kilfoyle *et al.* (2012), o aumento da hidrofilia da derme restringe significativamente o particionamento de fármacos hidrofóbicos. Cabe ressaltar, que um sistema carreador efetivo para o tratamento da acne deve ser capaz de transportar os fármacos até as camadas mais externas da pele, apresentando localização transdérmica mínima e ausência de absorção sistêmica (JAIN *et al.*, 2014). Os resultados encontrados no estudo de permeação cutânea demonstram que a formulação desenvolvida apresenta-se como um sistema carreador promissor para o adapaleno e a dapsona na terapêutica da acne.

7. CONCLUSÕES

7. Conclusões

- O desenvolvimento de suspensões de nanocápsulas poliméricas de núcleo lipídico, contendo adapaleno e dapsona, preparadas pelo método de deposição interfacial de polímero pré-formado, permitiu a obtenção de formulações com diâmetro de partícula inferior a 200 nm, índice de polidispersão abaixo de 0,14, teores totais e eficiência de encapsulação próximos a 100 % para ambos os fármacos;
- A análise morfológica das partículas, através de microscopia eletrônica de transmissão, mostrou formato esférico e homogêneo das nanocápsulas, na forma de suspensão e incorporadas em hidrogel;
- O pH das formulações demonstrou ser apropriado para uso dermatológico;
- O desenvolvimento de uma nanoemulsão, contendo adapaleno e dapsona, por emulsificação espontânea permitiu a comparação do perfil reológico, cinética de liberação e permeação cutânea *in vitro*;
- As formulações semissólidas desenvolvidas apresentaram comportamento reológico não-Newtoniano, pseudoplástico tixotrópico;
- Métodos bioanalíticos para determinação de adapaleno e dapsona em pele suína foram validados;
- Através dos estudos de penetração cutânea *in vitro* foi possível quantificar os fármacos nas diferentes camadas da pele;
- Nos experimentos de permeação cutânea *in vitro* foi encontrado uma quantidade insignificante de fármaco no meio receptor após 8 horas para ambas as formulações, evitando, portanto, absorção sistêmica;

- As formulações apresentaram-se não irritantes pela técnica de HET-CAM;
- Os métodos por CLAE indicativo de estabilidade demonstraram ser seletivos, lineares, precisos, exatos e robustos, ou seja, adequados para o controle de qualidade e quantificação dos fármacos na formulação;
- Os resultados obtidos sugerem que as formulações desenvolvidas podem ser um sistema promissor no tratamento da acne;
- Estes experimentos são ferramentas importantes para avaliação da eficácia e segurança de produtos administrados pela via cutânea e para otimização de processos de desenvolvimento de formulações aplicadas topicamente;
- O emprego em conjunto destes fármacos em sistemas nanoestruturados apresentou resultados positivos e o desenvolvimento de uma formulação inédita para aplicação tópica;
- Estudos clínicos complementares poderão indicar a formulação mais efetiva para o tratamento da acne.

8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. Referências Bibliográficas

AKYOL, M.; OZÇELIK, S. Non-acne dermatologic indications for systemic isotretinoin. **American Journal of Clinical Dermatology**, v.6, n.3, p.175-184, 2005.

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.

AL KHOURY-FALLOUTH, N.; ROBLLOT-TREUPEL, L.; FESSI, H.; DEVISSAGUET, J.P., PUISIEUX, F. Development of a new process for the manufacture of poly(isobutylcyanoacrylate) nanocapsules. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 28, 125-136, 1986.

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, 2004.

ALVES, M.P.; SCARRONE, A.L.; SANTOS, M.; POHLMANN, A.; 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.

ALVES, M.; RAFFIN, R.P.; FAGAN, S.B. Rheological behavior of semisolid formulations containing nanostructured systems. In: BECK, R. GUTERRES, S.; POHLMANN, A. **Nanocosmetics and Nanomedicines**. New Approaches for the Skin Care. Springer, p. 37-45, 2011.

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

ASCHOFF, R.; WOZEL, G. *In vivo* modulation of UV-induced erythema by topical dapsone and dapsone metabolites. **Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology**, v.13, p. 219, 2000.

BAKSHI, M.; SINGH, S. Development of validated stability-indicating assay methods-critical review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 28, p. 1011-1040, 2002.

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

BARRIOS, J.G.; FARIAS, G.D.; ROGGIA, I.; PEIXOTO, S.C.; PONS, F.R.; BRUSCHI, M.; RAFFIN, R.P.; ALVES, M.P. Validação de método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência para doseamento do adapaleno em suspensões de nanocápsulas. **Química Nova**, v. 34 (8), p. 1464-1467, 2011.

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

BATAILLE, V.; SNIEDER H.; MAC-GREGOR, A.J.; SASIENI, P.; SPECTOR, T.D. The influence of genetics and environmental factors in the pathogenesis of acne: a twin study of acne in women. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 119, p. 317-322; 2002.

BP, British Pharmacopoeia 2013. British Pharmacopoeia Commission Office. London: The Stationery Office, 2013.

BETTONI, C.C. Avaliação da penetração cutânea de nanocápsulas de isotretinoína por *tape stripping in vitro* em pele humana e suína. Porto Alegre: UFRGS, 2009.

BETTONI, C.C.; FELIPPI, C.C.; ANDRADE, C. RAFFIN, R.P.; JAGER, A.; GUTERRES, S.S.; COSTA, T.D. Isotretinoin-Loaded Nanocapsules: Stability and Cutaneous Penetration by Tape Stripping in Human and Pig Skin. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 8 (2), p. 258-271, 2012.

BORGES, V.R.A.; SIMON, A.; SENA, A.R.C.; CABRAL, L.M.; SOUSA, V.P. Nanoemulsion containing dapsona for topical administration: a study of in vitro release and epidermal permeation. **International Journal of Nanomedicine**, v. 8, p. 535-544, 2013.

BOLZINGER, M.A.; BRIANÇON, S.; PELLETIER, J.; CHEVALIER, Y. Penetration of drugs through skin, a complex rate-controlling membrane. **Current Opinion in colloid and interface science**, v. 17, p. 156-165, 2012.

BOUWSTRA, J.A.; DUBBELAAR, G.S.; GOORIS, M.; PONEC, M. The lipid organization in the skin barrier. **Acta Dermato-Venereologica**, v. 208, p. 23-30, 2000.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos". **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 2003.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia para a realização de estudo de estabilidade. RE nº 1, de 29 de julho de 2005. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 2005.

BRUM, T.; FIEL, L.A.; CONTRI, R.V.; GUTERRES, S.S.; POHLMANN, A.R. Polymeric Nanocapsules and Lipid-Core Nanocapsules Have Diverse Skin Penetration. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 14, p. 1-8, 2014.

BRUXEL, F.; LAUX, M.; WILD, L.B.; FRAGA, M.; KOESTER, L.S.; TEIXEIRA, H.F. Nanoemulsões como sistema de liberação parenteral de fármacos. **Química Nova**, v. 35 (9), p. 1827-1840, 2012.

CALVO, P.; REMUÑÁN-LÓPEZ, C.; VILA-JATO, J.L.; ALONSO, M.J. Development of positively charged colloidal drug carriers: Chitosan coated polyester nanocapsules and submicron-emulsions. **Colloid Polymer Science**, v. 275, p. 46-53, 1997.

CORDAIN, L.; LINDEBERG, S.; HURTADO, M.; HILL, K.; EATON, S.B.; BRAND-MILLER, J. Acne vulgaris: a disease of Western civilization. **Archives of Dermatology**, v. 138, n.12, p. 1584-90, 2002.

COUVREUR, P.; BARRATT, G.; FATTAL, E.; LEGRAND, P.; VAUTHIER, C. Nanocapsule technology: A review. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 19, p. 99-134, 2002.

CUA, A.B.; WILHELM, K.P.; MAIBACH, H.I. Elastic properties of human skin: relation to age, sex and anatomical region. **Archives of Dermatological Research**, v. 282, p. 283-288, 1990.

CZERNIELEWSKI J, MICHEL S, BOUCLIER M. Adapalene biochemistry and the evolution of a new topical retinoid for treatment of acne. **Journal of European Academic of Dermatology and Venereology**, v. 15 (3), p. 5-12, 2001.

DEL ROSSO, J.Q. Newer topical therapies for the treatment of acne vulgaris. **Cutis**, v. 80 (5), p. 400-10, 2007.

DRAELOS, Z.D.; CARTER, E.; MALONEY, J.M. Two randomized studies demonstrate the efficacy and safety of dapsona gel, 5% for the treatment of acne vulgaris. **Journal of American Academic Dermatology**, v. 56, n. 439, p. e1-e10, 2007.

DRENO, B.; POLI, F. Epidemiology of acne. **Dermatology**, v. 206, p. 7-10, 2003.

DU PLESSIS, J.; RAMACHANDRAN, C.; WEINER, N.; MULLER, D.G. The influence of particle size of liposomes on the deposition of drug into skin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 103, p. 277-282, 1994.

ESPUELAS, M.S.; LEGRAND, P.; IRACHE, J.M.; GAMAZO, C.; ORECHIONI, A.M.; DEVISSAGUET, J-PH.; YGARTUA, P. Poly(ϵ -caprolacton) nanospheres as an alternative way to reduce amphotericin B toxicity. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 158 (1), p. 19-27, 1997.

FDA. U.S. Food and Drug Administration. Safety Labeling Changes Approved By FDA Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Disponível em: <<http://www.fda.gov/safety/medwatch/safetyinformation/safetyrelateddruglabelingchanges/ucm116199.htm>>.

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

FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J-Ph.; AMMOURY, N.; BENITA, S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 55, p. R1-R4, 1989.

FIEL, L.A.; REBÊLO, L.M.R.; SANTIAGO, T.M.; ADORNE, M.D.; GUTERRES, S.S.; DE SOUSA, J.S.; POHLMANN, A.R. Diverse deformation properties of polymeric nanocapsules and lipid-core nanocapsules. **Soft Matter**, v.7, p. 7240-7247, 2011.

FOLDAVARI, M. Non-invasive administration of drugs through the skin: challenges in delivery system design. **Pharmaceutical Science and Technology Today**, v. 3 (12), p. 417-425, 2000.

GALDERMA LABORATORIES. Disponível em:
<http://www.differin.com/AboutDifferin/ProductInsert_Gel.aspx>.

GANACHAUD, F.; KATZ, J.L. Nanoparticles and nanocapsules created using the Ouzo effect: Spontaneous emulsification as an alternative to ultrasonic and high-shear devices. **Journal of Chemical Physics and Physical Chemistry**, v. 6, p. 209-216, 2005.

GE, S.; LIN, Y.; LU, H.; LI, Q.; HE, J.; CHEN, B.; WU, C.; XU, Y. Percutaneous delivery of econazole using microemulsion as vehicle: Formulation, evaluation and vesicle-skin interaction. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 465 (1-2), p. 120-131, 2014.

GIL, E.S. **Controle Físico-Químico de Qualidade de Medicamentos**. 3^a ed. Pharmabooks, São Paulo, p. 48, 2010.

GHODSI SZ, ORAWA H, ZOUBOULIS CC. Prevalence, severity, and severity risk factors of acne in high school pupils: a community based study. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 129, p. 2136-2144, 2009.

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.

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.

ICH - International Conference on Harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. Guideline on stability testing of new drug substance and products Q1A (R2). ICH Steering Committee, Switzerland, 2003.

ICH - International Conference on Harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. Validation of Analytical methods text and methodology Q2(R1). ICH Steering Committee, Switzerland, 2005.

IRBY, C.E.; YENTZER, B.A.; FELDMAN, S.R. A review of adapalene in the treatment of acne vulgaris. **Journal of Adolescent Health**, v. 43, p. 421-4214, 2008.

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

JAIN, A.K.; JAIN, A.; NEERAJ, K.G.; AGARWALA, A.; JAIN, A.; JAIN, S.A.; TYAGIC, R.K.; JAIN, R.K.; AGRAWALE, H.; AGRAWALA, G.P. Adapalene loaded solid lipid nanoparticles gel: An effective approach for acne treatment. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 121, p. 222–229, 2014.

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

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.

KALIA, N.Y.; GUY, R.H. Modeling transdermal drug release. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 48, p. 159-72, 2001.

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

KILFOYLE, B.E.; SHEIHET, L.; ZHANG, Z.; LAOHOO, M.; KOHN, J.; MICHNIAK-KOHN, B.B. Development of paclitaxel-TyroSpheres for topical skin treatment. **Journal of Controlled Release**, v. 163 (1), p. 18-24, 2012.

KLAZ, I. KOCHBA, I.; SHOHAT, T.; ZARKA, S.; BRENNER, S. Severe acne vulgaris and tobacco smoking in young men. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 126, p. 1749-1752; 2006.

KLICK, S.; MUIJSELAAR, P.G.; WATERVAL, J.; EICHINGER, T.; KORN, C.; GERDING, T.K.; DEBETS, A.J.; GRIEND, C.S.; BELD, C.V.D.; SOMSEN, G.W.; JONG, G.J. Toward a generic approach for stress testing of drug substances and drug products. **Pharmaceutical Technology**, p. 48-66, 2005.

KNUTSEN-LARSON, S.; DAWSON, A.L.; DUNNICK, C.A.; DELLAVALE, R.P. Acne vulgaris: pathogenesis, treatment, and needs assessment. **Dermatology Clinics**, v. 30, p. 99-106, 2012.

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 (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-S21, 2002.

KUMAR, M.N.V.R. Nano and microparticles as controlled drug delivery devices. **Journal of Pharmaceutical Science**, v. 3, p.234-258, 2000.

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

LAMBERT G, FATTAL E, PINTO-ALPHANDARY H, GULIK A, COUVREUR P. Polyisobutylcyanoacrylate nanocapsules containing an aqueous core as a novel colloidal carrier for the delivery of oligonucleotides. **Pharmaceutical Research**, v. 17, p. 707-714, 2000.

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

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

LEE, O.; JEONG, S.H.; SHIN, W.U.; LEE, C.; OH, C.; SON, S.W. Influence of surface charge of gold nanorods on skin penetration. **Skin Research and Technology**, v. 19, p. e390-e396, 2013.

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

LIU, W.; HU, M.; LIU, M.; XUE, C.; XU, H.; YANG, X.L. Investigation of the carbopol gel of solid lipid nanoparticles for the transdermal iontophoretic delivery of triamcinolone acetonide acetate. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 364, p. 135-141, 2008.

LOLIS, M. S.; BOWE, W.P.; SHALITA, A.R. Acne and Systemic Disease. **Medical Clinics of North America**, v. 93, p. 1161-1181, 2009.

MALVIYA R.; BANSAL V.; PAL, O.P.; SHARMA, P.K. High performance liquid chromatography: a short review. **Journal of Global Pharma Technology**, v. 2(5), p. 22-26, 2010.

MAGIN, P.; POND, D.; SMITH, W.; WATSON, A. A systematic review of the evidence for “myths and misconceptions” in acne management: diet, face-washing and sunlight. **Australian Journal of Dermatology**, v. 42, p. 98-101, 2004.

MANDELL, G.L.; PETRI, W.A. Antimicrobial agents: Penicilins, cephalosporins, and other β -lactam antibiotics. In: HARDMAN, J.G., LIMBIRD, L.E. (Eds.). **Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics**, 9 ed., McGRAWHILL, 1996.

MARCHAIS, H.; BENALI, S.; IRACHE, J.M.; THARASSE-BLOCH, C.; LAFONT, O.; ORECCHIONI, A.M. Entrapment efficiency and initial release of phenylbutazone from nanocapsules prepared from different polyesters. **Drug development and industrial pharmacy**, v. 24(9), p. 883-888, 1998.

MARTINDALE, W. MARTINDALE: The Complete Drug Reference. 32^a ed., The Pharmaceutical Press, Chicago, 1999.

MARTIN, A.; WARBRICK, J.; CAMMARATA, A. **Rheology in Physical Pharmacy**. 4 ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993.

MICHALOWSKI, C.B.; GUTERRES, S.S.; DALLA COSTA, T. Microdialysis for evaluating the entrapment and release of a lipophilic drug from nanoparticles, **Journal Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 35, p. 1093-1100, 2004.

MORGANTI, P.; RUOCCO, E.; WOLF, R.; RUOCCO, V. Percutaneous absorption and delivery systems. **Clinics in Dermatology**, v. 19 (4), p. 489-501, 2001.

MUDASIR, M.; TABASSUM, N.; ALI, J.; KHAN, N.A.; JAN, R. Qualitative and quantitative estimation by HPLC method in transdermal formulations: a technical note. **Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences**, v. 2 (1), P. 231-241, 2011.

MÜLLER-GOYMAN, C.C. Physicochemical characterization of colloidal drug delivery systems such as reverse micelles, vesicles, liquid crystals and nanoparticles for topical administration. **European Journal of Pharmaceuticals and Biopharmaceuticals**, v. 58, p. 343-346, 2004.

NETZ, P.A.; ORTEGA, G.G. **Fundamentos de físico-química: uma abordagem conceitual para as ciências farmacêuticas**. 1ª ed. Porto Alegre: Artmed, p. 236-246, 2002.

OLIVEIRA, C.; VENTURINI, C.G.; DONIDA, B.; POLETTO, F.S.; GUTERRES, S.S.; POHLMANN, A.R. An algorithm to determine the mechanism of drug distribution in lipid-core nanocapsule formulations. **Soft Matter**, v. 9, p. 1141-1151, 2013.

OURIQUE, A.F.; MELERO, A.; SILVA, C.B.; SCHAEFER, U.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S.; LEHR, C.M.; KOSTKA, K.H.; BECK, R.C.R. Improved photostability and reduced skin permeation of tretinoin: Development of a semisolid nanomedicine. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 79 (1), p. 95-101, 2011.

PAESE, K.; JÄGER, A.; POLETTO, F.S.; PINTO, E.F.; ROSSI-BERGANN, B.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S. Semisolid formulation containing a nanoencapsulated sunscreen: effectiveness, *in vitro* photostability and immune response. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 5, p. 1-7, 2009.

PFEIFFER, C.H.; WOZEL, G. Comments to “dapsons and sulfones in dermatology: overview and update”. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 48, p. 308-309, 2003.

POLETTO, F.S.; BECK, R.C., GUTERRES, S.S., POHLMANN, A.R. **Polymeric Nanocapsules: Concepts and Applications**. In: BECK, R. GUTERRES, S.; POHLMANN, A. Nanocosmetics and Nanomedicines. New Approaches for the Skin Care. Springer, p. 49-68, 2011.

POHLMANN, A.R.; MEZZALIRA, G.; VENTURINI, C.G.; CRUZ, L.; BERNARDI, A.; JÄGER E.; BATTASTINI, A.M.O.; SILVEIRA, N.P.; GUTERRES, S.S. Determining the simultaneous presence of drug nanocrystals in drug-loaded polymeric nanocapsule aqueous suspensions: A relation between light scattering and drug content. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 359, p. 288-293, 2008.

PROW, T.W.; GRICE, J.E.; LIN, L.L.; FAYE, R.; BUTLER, M.; BECKER, W.; WURM, E.M.T.; YOONG, C.; ROBERTSON, T.A.; SOYER, H.P.; ROBERTS, M.S. Nanoparticles and microparticles for skin drug delivery. **Advanced drug delivery reviews**, v. 63, p. 470-491, 2011.

QUINTANAR-GUERRERO, D. ALLÉMAN, E.; DOELKER, E.; FESSI, H. Preparation and characterization of nanocapsules from preformed polymers by a new process based on emulsification-diffusion technique. **Pharmaceutical Research**, v. 15(7), p. 1056-1062, 1998.

RABER, A.S.; MITTAL, A.; SCHÄFER, J.; BAKOWSKY, U.; REICHRATHC, J.; VOGT, T.; SCHAEFER, U.F.; HANSEN, S.; LEHR, C-M. Quantification of nanoparticle uptake into hair follicles in pig ear and human forearm. **Journal of Controlled Release**, v. 179, p. 25-32, 2014.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27 (5), p. 771-780, 2004.

RIBEIRO, C. **Cosmetologia Aplicada à Dermoestética**, 1^a ed. São Paulo: Pharmabooks, p. 77-115, 2006.

ROLLAND, A.; WAGNER, N.; CHATELUS, A.; SHROOT, B.; SCHAEFER, H. Site specific drug delivery to pilosebaceous structures using polymeric microspheres. **Pharmaceutical Research**, v. 10, p.1738-1744, 1993.

SANTOS, G.S.; PEREIRA, G.G.; BENDER, E.A.; COLOMÉ, L.M.; GUTERRES, S.S. Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas lipídicas destinadas à aplicação tópica da dapsona. **Química Nova**, v. 35(7), p. 1388-1394, 2012.

SANTOS-MAGALHÃES, N.S.; PONTES, A.; PEREIRA, V.M.W; CAETANO, M.N.P. Colloidal carriers for benzathin penicillin G: nanoemulsions and nanocapsules. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 208, p. 71-80, 2000.

SAKUMA, S.; SUZUKI, N.; KIKUCHI, H.; HIWATARI, K-I.; ARIKAWA, K.; KISHIDA, A.; AKASHI, M. Oral peptide delivery using nanoparticles composed of novel graft copolymers having hydrophobic backbone and hydrophilic branches. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 149 (1), p. 93-106, 1997.

SCHAEFER, H.; WATTS, F.; BROD, J.; ILLEL, B. Follicular penetration. In: R.C. Scott, R.H. Guy, J. Hadgraf (Eds.), **Prediction of Percutaneous Penetration. Methods, Measurements, Modeling**. IBC Technical Services, London, p. 163-173, 1990.

SCHAEFER, T.; NIEHNAUS, A.; VIELUF, D.; BERGER, J.; RING, J. Epidemiology of acne in the general population: the risk of smoking. **British Journal of Dermatology**, v. 145, p. 100-104, 2001.

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.

SCHRAMM, G. **Reologia e reometria: fundamentos teóricos e práticos**. São Paulo: Artliber, p. 240, 2006.

SCIFINDER. Disponível em: <http://www.cas.org/products/scifinder>

SETHI, P.D.; CHAREGAONKAR, P. **Identification of drugs in pharmaceutical formulations by Thin-Layer Chromatography**, 2nd ed., CBS Publishers & Distributors, New Dehli, p. 253, 1999.

SHAHINAZE A.F.; EMAD B.B.; MOHAMED, A.E.; SAADIA, A.T. Microemulsion and poloxamer microemulsion-based gel for sustained transdermal delivery of diclofenac epolamine using in-skin drug depot: *In vitro/in vivo* evaluation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 453 (2), p. 569-578, 2013.

SHALITA, A. The integral role of topical and oral retinoids in the early treatment of acne. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 15 (3), 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-S.; HAN, S-S.; KIM, J.; CHANG, I-S. Transdermal delivery of minoxidil with block copolymer nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, v. 97, p. 477-484, 2004.

SHIN, J.; SHIN, K.; LEE, H.; NAM, J.B.; JUNG, J.E.; RYU, J.H.; HAN, J.H.; SUH, K.D.; KIM, Y.J.; SHIM, J.; KIM, J.; HAN, S.H.; CHAR, K.; KIM, Y.K.; CHUNG, J.H.; LEE, M.J.; KANG, B.C.; KIM, J.W. Non invasive transdermal delivery route using electrostatically interactive biocompatible nanocapsules. **Advanced Materials**, v. 22, p. 739-743, 2010.

SHROOT B, MICHEL S. Pharmacology and chemistry of adapalene. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 36, p. 96-103, 1997.

SOPPIMATH, K.S.; AMINABHAVI, T.M.; KULKARNI, A.R.; RUDZINSKI, W.E. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **Journal of Controlled Release** 70, p. 1-20, 2001.

SOUTO, E.B.; SEVERINO, P.; SANTANA, M.H.A. Preparação de nanopartículas poliméricas a partir de polímeros pré-formados – Parte II. **Polímeros**, v. 22 (1), p. 101-106, 2012.

SWARTZ, M.E.; KRULL, I.S. Validação de métodos cromatográficos. **Pharmaceutical Technology**, v. 2, p. 12-20, 1998.

TAN, J.K. Psychosocial impact of acne vulgaris: evaluating the evidence. **Skin Therapy Letter**, v. 9, p. 1-3, 2004.

TAN, J.K.L. Topical Acne Therapy: Current and Advanced Options for Optimizing Adherence. **Skin pharmacies**, v. 4, p.1-3, 2009.

TAYLOR S.C.; COOK-BOLDEN, F.; RAHMAN, A. Acne vulgaris in skin of color. **Journal of American Academy of Dermatology**, v. 46 (2), p. 98-106, 2002.

TEIXEIRA, Z., ZANCHETTA, B., MELO, B.A., OLIVEIRA, L.L., SANTANA, M.H., PAREDES-GAMERO, E.J., JUSTO, G.Z., NADER, H.B., GUTERRES, S.S., DURAN, N. Retinyl palmitate flexible polymeric nanocapsule: characterization and permeation studies. **Colloids and Surfaces B: Bio interfaces**, v. 81, p. 374-380, 2010.

TING, W.W., VEST, C.D. AND SONTHEIMER, R.D. Review of traditional and novel modalities that enhance the permeability of local therapeutics across the stratum corneum. **International Journal of Dermatology**, v. 43, p. 538-47, 2004.

THE MERCK Index. An encyclopedia of chemicals, drugs and biologics. Version 12.3. New Jersey: Merck & Co. Inc., 2000. Adapalene. CD-ROM.

THIBOUTOT, D. Regulation of human sebaceous glands. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 123, p. 1-12, 2004.

THIBOUTOT, D.M.; WEISS, J.; BUCKO, A.; EICHENFIELD, L.; JONES, T.; CLARK, S.; LIU, Y.; GRAEBER, M.; KANG, S. Adapalene-benzoyl peroxide, a fixed-dose combination for the treatment of acne vulgaris: Results of a multicenter, randomized double-blind, controlled study. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 57, p. 791-799, 2007.

THIELITZ, A.; KRAUTHEIM, A.; GOLLNICK, H. Update in retinoid therapy of acne. **Dermatologic Therapy**, v. 19, p. 272-279, 2006.

USP. United States Pharmacopeia 37, US Pharmacopeial Convention, Rockville, MD, 2014.

VALERIE-ALLANORE, L.; SASSOLAS, B. ROUJEAU, J.C. Drug-induced skin, nail and hair disorders. **Drug Safety**, v. 30, p. 1011-1030, 2007.

VENTURINI, C.G.; JAGER, E.; OLIVEIRA, C.P.; BERNARDI, A.; BATTASTINI, A.; GUTERRES, S.S.; POHLMANN, A.R. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**. v. 375, p. 200-208, 2011.

VETTOR, M.; BOURGEOIS, S.; FESSI, H.; PELLETIER, J.; PERUGINI, P.; PAVANETTO, F.; BOLZINGER, M.A. Skin absorption studies of octyl-methoxycinnamate loaded poly(D,L-lactide) nanoparticles: estimation of the UV filter distribution and release behavior in skin layers. **Journal of Microencapsulation**, v. 27, p. 253 -262, 2010.

VITALE, S.A.; KATZ, J.L. Liquid droplet dispersion formed by homogeneous liquid-liquid nucleation: "The ouzo effect". **Langmuir**, v.19, p. 4105-4110, 2003.

VOLPATO, N.M.; FREITAS, Z.A.F.; STORPITIS, S. Biofarmacotécnica e bioequivalência de formulações dermatológicas semissólidas. In: **Ciências Farmacêuticas - Biofarmacotécnica**. STORPIRTIS, S.; GONÇALVES, J.E.; CHIANN, C.; GAI, M.N. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 212-223, 2009.

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

ZANINI, A.C.; OGA, S. **Farmacologia Aplicada**, 3ªed., Editora: Atheneu, São Paulo, 1997.

ZOUBOULIS, C.C. Retinoids – which dermatological indications will benefit in the near future? **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 14, p. 303-315, 2001.

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.

WEBSTER, G.F. The pathophysiology of acne. **Cutis**, v. 76 (2), p. 4-7, 2005.

WILLIAMS, H.C.; DELLAVALLE, R.P.; GARNER, S. Acne Vulgaris. **The Lancet**, v. 379, p. 361-370, 2012.

WOZEL, G.; BLASUM, C.; WINTER, C. Dapsone hydroxylamine inhibits the LTB₄-induced chemotaxis of polymorphonuclear leukocytes into human skin: results of a pilot study. **Inflammation Research**, v. 46, p. 420-422, 1997.

WOZEL, G.; BLUMLEIN, K.; BLASUM, C. Comments to "preventive effect of dapsone on renal scarring following mannose-sensitive piliated bacterial infection". **Chemotherapy**, v. 45, p. 233-234, 1999.

WOZEL, V.E.G. Innovative use of dapsone. **Dermatologic Clinics**, v. 28, p. 599-610, 2010.