

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

NANOPARTÍCULAS CONTENDO ISOTRETINOÍNA:
PREPARAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, ESTUDO
DE ESTABILIDADE E AVALIAÇÃO DA PENETRAÇÃO CUTÂNEA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Cândice Caroline Felíppi

Porto Alegre, 2008

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

NANOPARTÍCULAS CONTENDO ISOTRETINOÍNA:
PREPARAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, ESTUDO
DE ESTABILIDADE E AVALIAÇÃO DA PENETRAÇÃO CUTÂNEA

Dissertação apresentada por Cândice
Caroline Felippi para obtenção do
TÍTULO DE MESTRE em Ciências
Farmacêuticas

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª Teresa Dalla Costa

Co-Orientadora: Prof^ª. Dr^ª Silvia Guterres

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 24 de Setembro de 2008, pela Comissão Examinadora constituída por:

Profa. Dra. Adriana Raffin Pohlmann

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr Helder Teixeira Ferreira

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Marta Palma Alves

Centro Universitário Franciscano

F315n Felippi, Cândice Caroline

Nanopartículas contendo isotretinoína: preparação, caracterização físico-química, estudo de estabilidade e avaliação da penetração cutânea / Cândice Caroline Felippi – Porto Alegre : UFRGS, 2008. – xxii, 114 p.: il., tab., gráf.

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

1. Isotretinoína. 2. Nanopartículas. 3. Estabilidade. 4. Penetração cutânea. I. Dalla Costa, Teresa Cristina Tavares. II. Guterres, Silvia Stanisçuaski. III. Título.

CDU: 615.4

Bibliotecária responsável:

Margarida Maria Cordeiro Fonseca Ferreira – CRB10/480

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório 405 da Faculdade de Farmácia da UFRGS e contou com apoio financeiro da Rede Nanocosméticos/CNPq.

*Aos meu país César e Eneida
e minha irmã Gabriele*

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Teresa Dalla Costa, pela oportunidade em participar de seu grupo de pesquisa. Agradeço a confiança, a orientação, ensinamentos, a amizade e a paciência.

À Prof^a. Sílvia Guterres, pela co-orientação, incentivo, amizade e ensinamentos a mim dispensados.

Aos meus pais, César e Eneida, e minha irmã, Gabriele pelo incentivo constante e incansável, carinho, compreensão e amor. Ao Diogo, pelo companheirismo, amor e compreensão.

Aos meus familiares e amigos, que sempre torceram por mim. As gurias do futebol pelas horas de descontração.

Aos colegas do laboratório 405, Flávia, Moacir, Vitória, Sandra, Leandro, Karina, Nataly, Freddo, Eliézer, Fran, Eve, Thati, Lud, Ângelo, Denise, Fer Poletto, Lê Sias, Liberato, Laura e Cristiane pelo companheirismo e amizade. Não poderia deixar de agradecer especialmente àqueles que, com certeza esses 2 anos não teriam sido os mesmos, e também pelo exemplo de pesquisadores, sempre dispostos a ajudar e trocar conhecimentos, Rê Raffin, Lê Cruz, Alessandro, Lê Colomé e Manuela. A minha querida amiga e colega de mestrado Clá, pela amizade, paciência e parceria durante o último ano.

Meu agradecimento especial aos meus queridos voluntários Diogo, Bruno, Vini, Moacir, Freddo, Lê Colomé, Pablo, Eduardo, Rê Raffin, Clarissa, Cristiane, Marcelo, Ângelo, Patrícia, Cris de Garcia, Thiago Dipp, Fran, Damiana, Vitória, Bibiana e Dani, além de tudo pela paciência e colaboração durante os experimentos.

À Rede Nanocosmético/CNPq pelo financiamento deste projeto.

Ao PPGCF da UFRGS, pela oportunidade de realizar este trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	xiii
LISTA DE TABELAS.....	xv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xvii
RESUMO.....	xix
ABSTRACT.....	xxi
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVOS.....	5
2.1 Objetivo Geral.....	7
2.2 Objetivos Específicos.....	7
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	9
3.1 Os retinóides.....	11
3.1.2 Isotretinoína.....	14
3.2 Estabilidade da Isotretinoína.....	18
3.3 Penetração cutânea e a barreira da pele.....	21
3.4 Sistemas nanoparticulados para uso tópico.....	24
3.5 Avaliação da penetração cutânea pela técnica <i>tape stripping</i>	27
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
4.1 Materiais.....	31
4.1.1 Matérias-primas.....	31
4.1.2 Aparelhos e equipamentos.....	31
4.1.3 Solventes, reagentes e outros materiais.....	32
4.2 Métodos.....	33
4.2.1 Preparação das nanopartículas.....	33
4.2.2 Caracterização das suspensões e estabilidade frente ao armazenamento (efeitos de estocagem em função do tempo).....	35
4.2.2.1 Determinação do pH.....	35
4.2.2.2 Determinação do potencial zeta.....	36
4.2.2.3 Determinação do diâmetro médio das partículas e índice de polidispersão.....	36
4.2.2.4 Quantificação da isotretinoína nas suspensões.....	36

4.2.2.5	Análise morfológica.....	37
4.2.2.6	Determinação da taxa de associação.....	37
4.2.2.7	Análise em Turbiscan Lab®	37
4.2.3	Estabilidade das suspensões frente à luz UVA.....	38
4.2.4	Preparação de géis hidrofílicos contendo nanopartículas.....	39
4.2.4.1	Determinação do pH.....	40
4.2.4.2	Doseamento da isotretinoína nos géis.....	40
4.2.4.3	Avaliação das características reológicas.....	41
4.2.5	Avaliação da alergenicidade dos géis.....	42
4.2.5.1	Teste da medida de edema de orelha (<i>mouse ear swelling test - MEST</i>).....	42
4.2.5.2	Testes de alergenicidade por ensaio do linfonodo local (<i>local lymph node assay –LLNA</i>).....	43
4.2.6	Estudo de penetração cutânea em humanos pela técnica <i>tape stripping</i>	44
4.2.6.1	Protocolo experimental.....	45
4.2.6.2	Quantificação da isotretinoína nas fitas adesivas.....	46
4.2.7	Análise estatística.....	47
4.2.8	Descarte de resíduos químicos.....	48
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
5.1	Caracterização das suspensões	51
5.2	Estabilidade das suspensões frente ao armazenamento.....	54
5.2.1	Determinação do pH.....	55
5.2.2	Determinação do potencial zeta.....	56
5.2.3	Determinação do diâmetro médio das partículas e polidispersão.....	58
5.2.4	Doseamento de isotretinoína nas formulações em função do tempo.....	59
5.2.5	Análise morfológica e taxa de associação.....	63
5.2.6	Análise em Turbiscan LAb®	64
5.3	Estabilidade das suspensões frente à luz UVA.....	66
5.4	Preparação dos géis hidrofílicos contendo nanopartículas.....	73
5.4.1	Determinação do pH e doseamento.....	74
5.4.2	Avaliação das características reológicas dos hidrogéis.....	74
5.4.3	Avaliação da alergenicidade das formulações géis.....	77

5.4.3.1 Teste de medida de edema de orelha (<i>mouse ear swelling test - MEST</i>).....	77
5.4.3.2 Testes de alergenicidade por Ensaio do linfonodo local (<i>local lymph node assay –LLNA</i>).....	78
5.5 Estudo de penetração cutânea em humanos pela técnica <i>tape stripping</i> ...	79
6 CONCLUSÕES	83
7 REFERÊNCIAS	87
8 ANEXOS	99
Anexo 1.....	101
Anexo 2.....	107
Anexo 3.....	111
Anexo 4.....	113

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Fórmulas estruturais dos retinóides.....	13
Figura 2	Isotretinoína e seus metabólitos.....	15
Figura 3	Camadas da pele humana.....	22
Figura 4	Representação esquemática de nanocápsulas: a) fármaco adsorvido na parede polimérica das nanocápsulas; b) fármaco disperso por toda a partícula.....	24
Figura 5	Representação das regiões de aplicação do antebraço de um voluntário.....	45
Figura 6	Esquema da organização das fitas utilizadas no <i>tape stripping</i> para quantificação da isotretinoína.....	47
Figura 7	Representação gráfica das percentagens de isotretinoína nas suspensões em função do tempo de armazenamento. Valores determinados em relação ao dia zero (n = 3 / formulação).....	61
Figura 8	Cromatogramas das suspensões NC0,5, NC1,0 e NC1,5 mg/mL nos dias zero (A, B e C respectivamente) e dia 60 (D, E e F respectivamente).....	62
Figura 9	Fotomicrografias obtidas por MET da suspensão NC-BHT em diferentes aumentos (A) 12.000x, (B) 40.000x e (C) 100.000x.....	63
Figura 10	Gráficos de transmissão (<i>T</i>) e <i>backscattering</i> (<i>BS</i>) (%) das suspensões NC, NC-BHT, NE e NE-BHT (a, b, c e d, respectivamente) durante período de 24 h à 25°C.....	66
Figura 11	Conteúdo de isotretinoína em função do tempo para as formulações de nanopartículas estudadas frente à irradiação com luz UVA. (n = 3/formulação) Intensidade da luz de $1,19 \pm 1$ mW/cm ²	67
Figura 12	Cromatogramas após 8 horas de exposição à luz UVA das formulações LIVRE (esquerda), NC-BHT, NC, NE-BHT e NE, respectivamente.....	70
Figura 13	Perfis reológicos dos hidrogéis GEL-Br, GEL-NCBHT, GEL-NCBr e GEL-LIVRE descritos conforme modelo de Ostwald.....	76
Figura 14	Ensaio do linfonodo local (LNNA). Os resultados estão expressos	

como índice de estimulação relativo ao valor do controle negativo. A linha horizontal grossa identifica um índice de estimulação 3..... 79

Figura 15 Penetração de isotretinoína no estrato córneo comparando GEL-NCBHT e GEL-LIVRE 15 min (n = 3), 1 h (n = 6), 3 h (n = 9) e 6 h (n = 5) após aplicação cutânea das formulações. *Diferença significativa ($\alpha = 0.05$)..... 81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Composição das suspensões de nanocápsulas e nanoemulsões..	29
Tabela 2	Componentes da formulação dos géis de isotretinoína 0,05%.....	35
Tabela 3	Características físico-químicas das suspensões após preparação (dia zero).....	46
Tabela 4	Valores de pH das suspensões nos 60 dias do estudo de estabilidade.....	50
Tabela 5	Potencial zeta (mV) das suspensões nos 60 dias do estudo de estabilidade.....	51
Tabela 6	Diâmetro médio (nm) das suspensões nos 60 dias do estudo de estabilidade.....	52
Tabela 7	Índice de polidispersão das suspensões nos 60 dias do estudo de estabilidade.....	52
Tabela 8	Concentrações totais de isotretinoína (MG/mL) nas suspensões em função do tempo de armazenamento.....	54
Tabela 9	Concentrações percentuais de isotretinoína em função do tempo em percentagens após irradiação à luz UVA.....	61
Tabela 10	Modelagem cinética dos perfis de fotodegradação da formulação Livre assumindo cinética mono-exponencial.....	63
Tabela 11	Modelagem cinética dos perfis de fotodegradação das formulações NC, NC-BHT, NE e NE-BHT assumindo cinética biexponencial.....	64
Tabela 12	Valores de pH dos géis GEL-NCBHT e GEL-LIVRE após preparação (dia zero).....	67
Tabela 13	Valores dos coeficientes de regressão linear (R^2), índices de escoamento (n) e de consistência (K) dos géis obtidos a partir de seus perfis reológicos.....	69
Tabela 14	Resultados do teste de medida de edema de orelha (MEST). Aumento percentual do edema das orelhas.....	71
Tabela 15	Isotretinoína retida na superfície cutânea e permeada no estrato	

córneo após aplicação tópica de géis hidrofílicos contendo 0,05% do fármaco.....	73
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária;

ASC: Área sob a curva;

BHT: Butilhidroxitolueno;

BPM: Boas Práticas de Manipulação;

CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência;

FDA: Food and Drug Administration;

GEL-Br: Gel de hidroxietilcelulose preparado com água;

GEL-LIVRE: Gel de hidroxietilcelulose. contendo LIVRE;

GEL-NCBHT: Gel de hidroxietilcelulose contendo NC-BHT;

GEL-NCBr: Gel de hidroxietilcelulose. contendo NC-Br;

HP- β - CD: hidroxipropil- β -ciclodextrina;

LIVRE: Formulação contendo isotretinoína livre;

LLNA: *local lymph node assay*;

MEST: *mouse ear swelling test*;

MSC: Critério de Seleção do Modelo;

NC: Nanocápsulas;

NC0,5: Nanocápsulas de isotretinoína na concentração de 0,5 mg/mL;

NC1,0: Nanocápsulas de isotretinoína na concentração de 1,0 mg/mL;

NC1,5: Nanocápsulas de isotretinoína na concentração de 1,5 mg/mL;

NC-BHT: Nanocápsulas de isotretinoína na concentração de 0,5 mg/mL contendo BHT;

NE: Nanoemulsão de isotretinoína na concentração de 0,5 mg/mL;

NE-BHT: Nanoemulsão de isotretinoína na concentração de 0,5 mg/mL contendo BHT;

NC-Br: Nanocápsulas brancas;

NPS: nanopartículas lipídicas sólidas;

OMC: metoxicinamato de octila;

PCL: Poli(ϵ -caprolactona);

PDI: Polidispersão;

rpm: Rotações por minuto;

TCA: ácido tricloroacético;

TCM: triglicerídeos de cadeia média;

USRDA: *U.S. recommended daily allowance*.

RESUMO

O desenvolvimento tecnológico de novas formas farmacêuticas tem sido a estratégia mais promissora para modular a penetração de fármacos através da pele. A nanoencapsulação apresenta características vantajosas como aumento do índice terapêutico e diminuição de efeitos colaterais, assim como melhora da estabilidade. A isotretinoína (ISO) é utilizada para o tratamento tópico da acne e apresenta efeitos indesejados como irritação cutânea, eritema e descamação. O objetivo desse trabalho foi estudar a estabilidade de suspensões de nanocápsulas contendo isotretinoína e avaliar sua penetração cutânea quando incorporadas em gel hidrofílico, através da técnica de *tape stripping* em voluntários sadios. As nanocápsulas preparadas com poli(ϵ -caprolactona), por deposição de polímero pré-formado, apresentaram diâmetros médios entre 231 e 285 nm e baixos valores de polidispersão ($< 0,3$), que foram confirmados por microscopia eletrônica de transmissão, potencial zeta entre -7 e -9 mV e pH entre 4,4 e 6,3. O teor de ISO e a taxa de associação foram de aproximadamente 100 % para as nanocápsulas após o preparo. O estudo de estabilidade indicou que no período de 60 dias somente as nanocápsulas contendo BHT foram capazes de manter o conteúdo de ISO (0,5 mg/mL). A estabilidade frente à irradiação UVA mostrou a capacidade das nanocápsulas com BHT em proteger a ISO. A modelagem do perfil de degradação sugeriu que a ISO não se encontra inteiramente no interior da partícula, sendo que cerca de 50 % deve estar adsorvida na superfície externa nas nanopartículas. As suspensões de nanocápsulas de ISO foram incorporadas em hidrogéis de hidroxietilcelulose e apresentaram comportamento reológico pseudoplástico. A avaliação da alergenicidade dos géis mostrou que as nanocápsulas de ISO não produzem alergia. A avaliação da penetração cutânea através da técnica de *tape stripping* mostrou a capacidade das nanocápsulas em permear mais rapidamente o estrato córneo do que sua forma livre, nos primeiros minutos após aplicação. Em conclusão, os resultados indicam que a ISO nanoencapsulada é um sistema promissor para aplicação cutânea e capaz de melhorar a proteção do fármaco frente à luz.

Palavras-chave: Isotretinoína, nanocápsulas, estabilidade, penetração cutânea, *tape stripping*, voluntários humanos.

ABSTRACT

Technological development of new pharmaceutical dosage forms has been the most promising strategy to modulate drug penetration through the skin. Nanoencapsulation of drugs presents advantageous characteristics such as increased therapeutic index and reduced side effects, as well as stability improvement. Isotretinoin (ISO) is used for topical treatment of acne and presents unwanted topic effects as skin irritation, redness and scaling. The aims of this work were to evaluate the stability of ISO encapsulated into polymeric nanocapsules and its human cutaneous penetration by tape stripping after incorporation to hydrogel. Nanocapsules prepared by nanoprecipitation with poli(ϵ -caprolactone) presented average size between 231 and 285 nm and low polydispersity index (<0.3), which were confirmed by electronic transmission microscopy; zeta potential between -7 and -9 mV and pH between 4.4 and 6.3. The entrapment efficiency was 100 % after preparation. The stability study showed that only nanocapsules containing BHT kept drug concentration (0.5 mg/mL) constant for 60 days. The photostability under UVA irradiation indicated that nanocapsules with BHT were able to protect the drug. The degradation profile modeling suggested that ISO is not completely within the particle and about 50 % of the drug is adsorbed at the nanocapsules surface. hidroxyethylcellulose hydrogel containing ISO-loaded nanocapsules showed pseudoplastic rheological behavior. The allergenicity tests conducted with the hydrogel containing ISO-loaded nanocapsules showed no skin sensitization. The assessment of skin permeation by tape stripping showed that the nanoencapsulated ISO permeates the stratum corneum quicker than the drug in its free form in the first minutes after application. In conclusion, the results indicate that nanoencapsulated ISO is a promising delivery system for cutaneous application and it is able to protect the drug from light degradation.

Key-words: Isotretinoin, nanocapsules, stability, cutaneous penetration, tape stripping, human volunteers.

1. Introdução

Desde sua aprovação pelo *Food and Drug Administration* (FDA) em 1982 (AMICHAH *et al.*, 2006), a isotretinoína vem sendo o tratamento de escolha para as formas de acne severa. Tem sido também utilizada com sucesso no tratamento de outras patologias dermatológicas relacionadas com a diferenciação celular do epitélio e da unidade pilossebácea (PIQUERO, 2004).

Apesar dos benefícios terapêuticos da isotretinoína, existem efeitos adversos comuns à classe dos retinóides quando aplicados topicamente como eritema, descamação e irritação cutânea (LEYDEN, 1998). Além disso, a isotretinoína é um composto altamente instável e sua meia-vida depende principalmente de suas condições de estocagem como temperatura, oxigênio e luz (GATTI *et al.*, 2000; TASHTOUSH *et al.*, 2007).

Nos últimos anos, as nanopartículas têm sido objeto de intensa pesquisa devido à possibilidade de utilização como carreadores de fármacos visando proporcionar uma liberação seletiva em sítios fisiológicos específicos, órgãos, tecidos ou células, onde a atividade farmacológica é requerida (YOKOYAMA e OKANO, 1996; SOPPIMATH *et al.*, 2001; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). Esses sistemas nanoestruturados aplicados à área farmacêutica têm como objetivo principal aumentar o índice terapêutico e diminuir efeitos colaterais de fármacos (BARRATT, 2000; HANS e LOWMAN, 2002). Além desses benefícios, as nanoestruturas são potencialmente capazes de proteger o fármaco frente à degradação enzimática, química e imunológica (BARRAT, 2000).

A liberação sustentada de fármacos nanoencapsulados aplicados topicamente para o tratamento de doenças dermatológicas pode suprir a pele por um período de tempo prolongado, além de propiciar um tratamento diretamente no local da afecção, apresentando a possibilidade de reduzir a absorção sistêmica e os efeitos colaterais em sítios não específicos, proporcionando índices terapêuticos mais adequados (YOKOYAMA e OKANO, 1996).

Com base nas pesquisas relatadas na literatura que indicam a eficácia e a adequabilidade da via cutânea como alternativa terapêutica para administração de retinóides (GENDLER, 1998; PERSHING *et al.*, 2003) e conhecendo-se a potencialidade das nanopartículas de direcionar o fármaco para o local de ação, reduzir seus efeitos colaterais, protegendo-o da degradação, além da possibilidade

de solubilizar/dispersar em água compostos altamente insolúveis como os retinóides, o presente trabalho é centrado no estudo de formulações tópicas contendo isotretinoína encapsulada em nanopartículas. Desse modo, propõe-se o desenvolvimento de um sistema de liberação contendo isotretinoína que seja capaz de aumentar a penetração cutânea do fármaco, diminuir seus efeitos colaterais e protegê-lo da degradação frente a temperatura, luz e oxigênio, favorecendo o tratamento tópico de doenças como a acne. Cabe ressaltar que não há relatos na literatura sobre a associação de isotretinoína a nanocápsulas de PCL e nem da avaliação da penetração cutânea das mesmas através da técnica de *tape stripping* em humanos.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver, caracterizar e estudar a estabilidade de suspensões de nanocápsulas contendo isotretinoína e avaliar sua a penetração cutânea quando incorporadas a gel hidrofílico através da técnica de *tape stripping* em voluntários sadios.

2.2 Objetivos Específicos

- Desenvolver e caracterizar suspensões de nanocápsulas de poli(ϵ -caprolactona) contendo isotretinoína através do método de deposição interfacial do polímero;
- Estudar a estabilidade de suspensões de nanopartículas contendo isotretinoína a temperatura ambiente e frente à luz UVA;
- Preparar e caracterizar gel hidrofílico contendo isotretinoína livre e nanoencapsulada;
- Comparar a penetração cutânea de isotretinoína livre e nanoencapsulada através da técnica *tape stripping* após aplicação tópica de dose única de gel hidrofílico em indivíduos sadios.

3. Revisão de Literatura

3.1 Os retinóides

A definição atual de retinóide engloba todos os compostos naturais e sintéticos com atividade semelhante a da vitamina A. No homem essa existe sob a forma de vários compostos interconversíveis cujos principais são o retinal (essencial à visão) e o retinol, que é o análogo mais potente e principal forma de armazenamento e transporte (essencial à reprodução). O retinol, o retinal e o ácido retinóide são as formas fisiologicamente ativas da vitamina A (KLVANOVÁ e BRTKO, 2002).

A vitamina A é um álcool isoprenóide lipossolúvel e insaturado, encontrado em alimentos de origem animal como carne, leite e ovos, na forma de ésteres (palmitato). Também está presente em plantas, na forma de carotenóides, precursores do retinol, em especial nos vegetais verdes e folhosos e vegetais e frutas alaranjadas (CHAGAS *et al.*, 2003). A vitamina A foi descoberta no início do século 20 e a origem desse nome veio do seu papel essencial na função da retina (BICKERS e SAURAT, 2001). É uma vitamina necessária para o crescimento e a diferenciação do tecido epitelial, bem como para o crescimento dos ossos, a reprodução e o desenvolvimento embrionário. Juntamente com certos carotenóides, a vitamina A aumenta a função imune, reduz as conseqüências de algumas doenças infecciosas e pode proteger o organismo contra o desenvolvimento de certas neoplasias malignas. Em conseqüência, existe um considerável interesse pelo uso farmacológico dos retinóides na profilaxia do câncer e no tratamento de várias condições pré-malignas. Em virtude dos efeitos da vitamina A sobre os tecidos epiteliais, os retinóides e seus análogos são utilizados no tratamento de várias doenças cutâneas, incluindo algumas das conseqüências do envelhecimento e da exposição prolongada ao sol (MARCUS e COULSTON, 2003).

No humano há evidências indiretas de que a vitamina A em excesso, durante as primeiras semanas de gestação, é teratogênica. Existem controvérsias na literatura e também poucas informações sobre as doses seguras para suplementação para gestantes. Como o retinol circulante materno é controlado homeostaticamente após o consumo de alimentos fonte de vitamina A, espera-se a mesma resposta metabólica após o consumo de alimentos enriquecidos, indicando que não há risco de teratogenia. Consequentemente parece muito improvável que o

consumo de alimentos enriquecidos ou de suplementação de vitamina A pré-formada, nas doses diárias habituais, tenha efeito teratogênico no homem (CHAGAS *et al.*, 2003).

A importância dos retinóides em condições biológicas cutâneas foi primeiramente apreciada por WOLBACH e HOWE em 1925¹ (*apud* BICKERS e SAURAT, 2001), mostrando que a deficiência da vitamina A em animais manifestava alterações na queratinização da pele. O trabalho pioneiro sobre o tratamento dessas desordens de queratinização pelo tratamento tópico ou sistêmico com retinóides foi realizado por STUETTGEN em 1962² (*apud* BICKERS e SAURAT, 2001). A partir desse trabalho aconteceu um crescimento exponencial do número de retinóides avaliados e sintetizados devido ao seu grande potencial terapêutico. Atualmente existe mais de 1500 moléculas diferentes de compostos sintéticos similares a vitamina A, produzidas por sua manipulação química, com a única finalidade de melhorar sua eficácia clínica e reduzir seus efeitos secundários (PIQUERO, 2004).

Os retinóides são classificados em gerações conforme mostra a Figura 1. Os retinóides de primeira geração, da qual fazem parte o ácido *trans*-retinóico, ácido 9-*cis* retinóico e ácido 13-*cis* retinóico são isômeros. Eles ocorrem naturalmente no organismo e durante a metabolização sofrem interconversão. Os retinóides de segunda geração, monoaromáticos, são o etretinato e a acitretina e os de terceira geração, também conhecidos como arotenóides, incluem o bexacaroteno, o adapaleno e o tazaroteno, que são poliaromáticos formados a partir da ciclização da cadeia poliênica lateral (PIQUERO, 2004).

¹ WOLBACH, S. B.; HOWE, P. R. Tissue changes following deprivation of fat soluble vitamin A. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 43, p. 753, 1925. *apud* BICKERS, D. R. e SAURAT, J.H. Isotretinoin : A state-of-the-art conference. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 45, n. 5, p. S125-S128, 2001.

² STUETTGEN D. Zur lokalbehandlung von keratosen mit vitamin A: Säure. **Dermatologica**, v. 124, p. 65-80, 1962 *apud* BICKERS, D. R.; SAURAT, J.H. Isotretinoin : A state-of-the-art conference. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 45, n. 5, p. S125-S128, 2001.

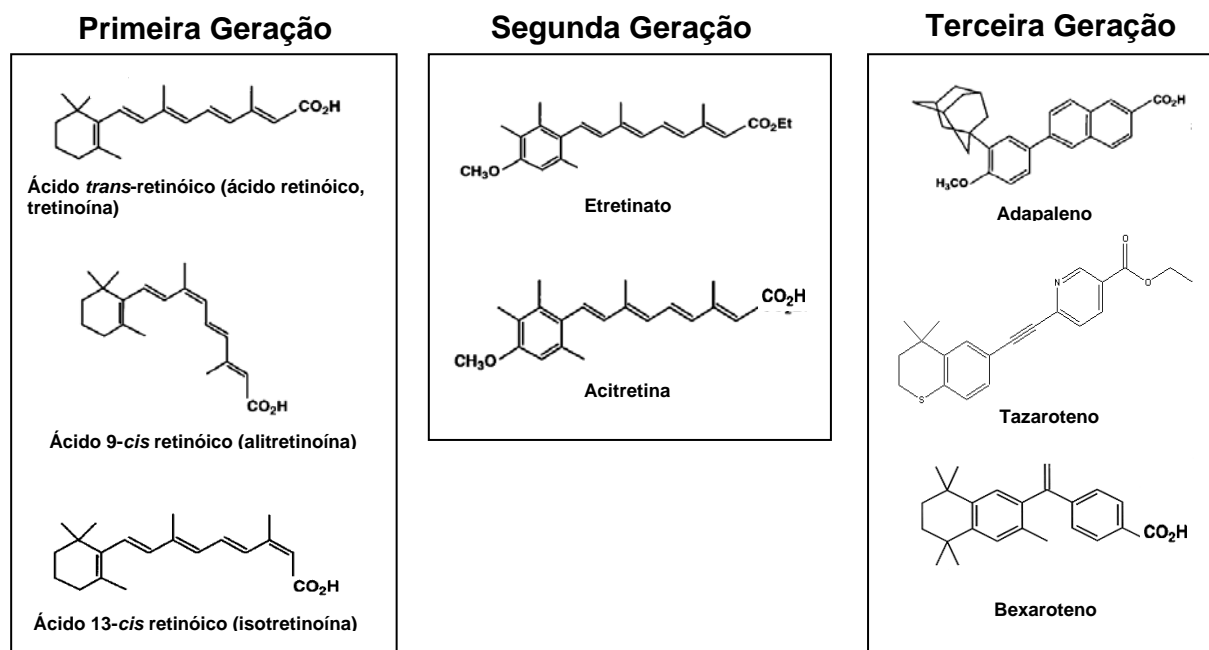


Figura 1. Fórmulas estruturais dos retinóides

Os retinóides tópicos são usados no tratamento da acne desde 1962. O primeiro deles foi a tretinoína, que continua em uso atualmente. Devido ao seu potencial irritante cutâneo, foram sintetizados novos fármacos com melhor tolerabilidade. Os retinóides mais freqüentemente prescritos atualmente são a isotretinoína, o adapaleno, o tazaroteno, a motretinida, o retinol β -glucuronide, o retinaldeído, além da tretinoína (KRAURTHEIM e GOLLNICK, 2004).

Além dos retinóides, diversas alternativas são disponíveis para o tratamento tópico da acne. Antibióticos tópicos foram amplamente utilizados no passado, mas devido ao fato de causarem resistência bacteriana, devem ser usados somente por períodos curtos de tempo ou em associação com peróxido de benzoíla ou ácido azelaico. Alfa-hidróxi-ácidos e ácido salicílico podem ser usados em algumas circunstâncias, além de androgênios tópicos. Terapia com luz, incluindo luz azul e luz vermelha, mostraram efetividade no tratamento da acne, especialmente quando usadas em combinação com agentes tópicos (KRAURTHEIM e GOLLNICK, 2004).

3.1.2 Isotretinoína

A isotretinoína ou ácido 13-*cis* retinóico é um membro do amplo grupo de compostos relacionados com a vitamina A (AYER e BURROWS, 2006).

Sua introdução no início dos anos 80 revolucionou o tratamento da acne, mais precisamente no ano de 1982 quando seu uso foi permitido pelo FDA (AMICHAH *et al.*, 2006). Ainda hoje continua sendo o fármaco anti-acne disponível mais efetivo (ZOUBOULIS, 2006), reduzindo a produção de sebo mais eficientemente do que todos retinóides disponíveis para o tratamento da acne (TÖRMÄ, 2001).

O mecanismo de ação da isotretinoína ainda não foi completamente elucidado (TÖRMÄ, 2001; KOROLKOVAS e FRANÇA, 2004). Sabe-se que ele está relacionado com vários efeitos, tais como: marcada atividade sebo supressora de até 90 %, levando a modificação da composição dos lipídios cutâneos; aumento dos esteróides livres e ceramidas; diminuição dos glicerídeos e ácidos graxos livres (resultando em um sebo mais rico em ácido linoleico e outros ácidos graxos circulantes); diminuição do tamanho das glândulas sebáceas e inibição da produção de sebócitos; diminuição da queratose folicular e da comedogênese, aparentemente por diminuição da formação e/ou aumento do grau de separação dos corneócitos dentro do ducto pilosebáceo; efeitos sobre a microflora como redução do *Propionibacterium acnes*; e efeito antiinflamatório. Resumindo, a isotretinoína atua seletivamente sobre a glândula sebácea, diminuindo a sebogênese e normalizando a queratinização folicular alterada. Desta forma, as condições para a proliferação bacteriana não são adequadas, tendo como resultado a cura da acne (LEYDEN, 1998; TÖRMÄ, 2001; PIQUERO, 2004).

Após administração de dose oral, as concentrações plasmáticas máximas de isotretinoína são atingidas em 2-4 horas. Nos indivíduos em jejum, a biodisponibilidade oral é estimada em cerca de 20 %, porém, devido à lipofilicidade da molécula, quando administrada juntamente com alimento a biodisponibilidade aumenta consideravelmente. A isotretinoína é altamente ligada às proteínas plasmáticas, principalmente albumina (> 99 %). Devido à ação da isomerase hepática, 25 % da isotretinoína se transformam em tretinoína, a qual pode também se converter em isotretinoína. Tanto a isotretinoína quanto a tretinoína se oxidam,

pela ação das oxidases do citocromo P450, nos metabólitos 4-oxo-isotretinoína e 4-oxo-tretinoína, os quais também podem se interconverter (Figura 2). A 4-oxo-isotretinoína é o principal metabólito, mas com atividade farmacológica muito menor, seguida pela 4-oxo-tretinoína e pela tretinoína (WIEGAND e CHOU, 1998; MARCUS e COULSTON, 2003; KOROLKOVAS e FRANÇA, 2004; PIQUERO, 2004).

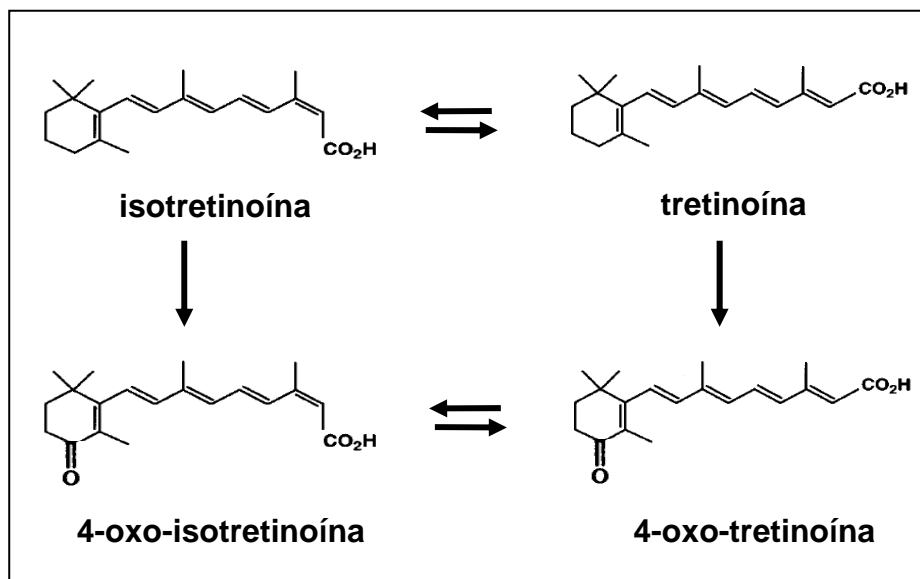


Figura 2. Isotretinoína e seus metabólitos.

A farmacocinética da isotretinoína e de seus metabólitos é linear, o que torna possível prever as concentrações plasmáticas durante o seu tratamento a partir de dose única. Vários parâmetros farmacocinéticos, tais como volume de distribuição, biodisponibilidade e depuração não podem ser expressos, pois a preparação intravenosa do composto não está disponível para uso em humanos (KOROLKOVAS e FRANÇA, 2004).

Devido à alta resistência desenvolvida por *P. acnes* em relação aos antibióticos, o uso de isotretinoína pela via oral tornou-se extremamente comum. A isotretinoína é o único fármaco que atua sobre todos os quatro principais fatores envolvidos na patogênese da acne, suprimindo a descamação anormal do epitélio e a produção de sebo, reduzindo o crescimento de *P. acnes* e exercendo ação

antiinflamatória, além de ser o único tratamento que leva à diminuição permanente da acne (ZOUBOULIS, 2004; YATES, 2005; AYER e BURROWS, 2006; KAYMAK e ILTER, 2006; ZOUBOULIS, 2006).

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

Os efeitos adversos mucocutâneos podem ser previstos a partir do próprio efeito farmacológico do fármaco e são considerados comuns. Dentre esses, encontram-se lábios e pele secos, dermatite facial irritante, vestibulites e outros, que podem ser controlados por reduções na dose, já que são dose-dependente, ou por aplicação de emolientes. Efeitos adversos como o aumento de triglicerídeos e colesterol são pouco comuns, assim como mudanças de humor e depressão. Apesar disso, a discussão da possibilidade de ocorrência desses efeitos adversos com o paciente é muito importante, bem como uma monitoração cuidadosa desses efeitos durante o tratamento (YATES, 2005; AYER e BURROWS, 2006; LAYTON, 2006).

Todas as doses de isotretinoína administradas pela via oral são teratogênicas. Dessa forma, mulheres que pretendem utilizar esse fármaco devem adotar medidas contraceptivas um mês antes do início do tratamento, durante o tratamento e mantê-las por seis semanas após o final do tratamento. Também deve ser feita uma associação de métodos anticoncepcionais, durante o uso da isotretinoína, pois ela diminui os níveis sanguíneos do estradiol e da progesterona. Além disso, deve-se realizar testes de gravidez constantemente (PIQUERO, 2004; YATES, 2005; AYER e BURROWS, 2006; THIELITZ *et al.*, 2006).

Devido aos graves efeitos adversos provocados pela isotretinoína oral, novas formulações e protocolos de aplicações intermitentes ou de baixas dosagens têm sido desenvolvidos nos últimos anos (KAYMAK e ILTER, 2006). Órgãos governamentais regulamentadores de diversos países, como a Diretiva Européia e ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), possuem programas de prevenção do uso da isotretinoína em mulheres durante a gravidez e divulgam protocolos de uso correto do fármaco (LAYTON, 2006).

A aplicação tópica de isotretinoína, assim como de outros retinóides, também pode gerar efeitos adversos, sendo comuns eritemas, descamação, irritação cutânea (40 %) e prurido (25 %) (PIQUERO, 2004). Estes efeitos podem ser diminuídos com aplicações de contato curto (YATES, 2005; LAYTON, 2006).

Inicialmente, acreditava-se que os efeitos de irritação cutânea provocados pela isotretinoína eram essenciais para obtenção do efeito terapêutico. Atualmente se sabe que esses efeitos são apenas adversos e não contribuem para a eficácia do fármaco (LEYDEN, 1998). A isotretinoína, ao agredir as barreiras celulares, pode modificar a penetração cutânea, tornando a sua permeabilidade aumentada e, dependendo do grau da lesão provocada, uma absorção sistêmica do fármaco pode ocorrer. A acne também pode ocasionar uma alteração das condições da pele e, em consequência, pode modificar os processos difusionais de fármacos, de modo que, numa inflamação cutânea, com a perda do estrato córneo e queratinização alterada, a permeabilidade pode aumentar (BARRY, 2005).

CHEN e colaboradores (1997) avaliaram a extensão da exposição sistêmica após aplicações de 10 g de creme de isotretinoína (0,1 %) uma vez ao dia durante 42 dias, em 18 pacientes do sexo feminino com pele foto-lesada. Esta dose corresponde a 10 x a dose normal recomendada para uso diário no tratamento com isotretinoína tópica. Os níveis plasmáticos dos retinóides (isotretinoína, tretinoína, 4-oxo-isotretinoína e 4-oxo-tretinoína) foram avaliados após os 42 dias de tratamento e comparados com os níveis basais iniciais (pré-tratamento). Os resultados mostraram que a média da área sob a curva (ASC) no plasma aumentou $48 \pm 9,2$ %, 77 ± 13 % e $1,7 \pm 1,7$ % em relação a linha de base para a isotretinoína, 4-oxo-isotretinoína e tretinoína, respectivamente, sugerindo absorção sistêmica da isotretinoína a partir do creme. No entanto, esse aumento está dentro do recomendado pelo USRDA (U.S. *recommended daily allowance*) para suplementação diária com vitamina A de 5000 UI que resulta em um aumento de 141 ± 19 % para isotretinoína e 171 ± 27 % para 4-oxo-isotretinoína em relação a linha basal. Portanto, o aumento dos níveis plasmáticos de isotretinoína e seu metabólitos observado com o tratamento tópico com doses exageradas de isotretinoína em creme foi considerado insignificante. No entanto, em razão dos estudos realizados com isotretinoína sistêmica em humanos que demonstraram uma intensa associação com a teratogenicidade e, visando a

segurança das pacientes, a isotretinoína tópica não é recomendada durante a gravidez (NAU, 2001).

A isotretinoína é comercializada no Brasil para uso oral como medicamento de marca registrada, similar e genérico e também é preparada em farmácias de manipulação, para adequação da posologia prescrita pelo médico. Para uso tópico, é comercializada na forma de gel hidroalcoólico ou creme na concentração de 0,05 %.

3.2 Estabilidade da isotretinoína

Existe um grande interesse no estudo da estabilidade da isotretinoína, pois ela é altamente instável e sua meia-vida depende principalmente das condições de estocagem como temperatura, oxigênio e luz (GATTI *et al.*, 2000; TASHTOUSH *et al.*, 2007).

A manipulação de substâncias retinóicas, para preparação de medicamentos de uso tópico, pode ser realizada por farmácias que sejam certificadas em Boas Práticas de Manipulação (BPM), conforme a Portaria n° 344 de 12/05/1998, que regulamenta a venda de produtos sujeitos ao controle da Vigilância Sanitária. Entretanto, informe técnico do laboratório Stiefel® (STIEFEL, 1997), fabricante de produtos à base de isotretinoína, relata um estudo realizado em 7 farmácias de manipulação visando avaliar o gel alcoólico de isotretinoína na concentração de 0,05 %. Os produtos foram quantificados logo após o preparo, 30 e 60 dias após manipulação. Segundo a *United States Pharmacopeia* (USP 31, 2008) a concentração de isotretinoína no gel, logo após preparo, deve estar na faixa entre 90 e 110 %. Se fabricada com todos os pré-requisitos exigidos, garante-se uma validade de três meses. Os resultados foram alarmantes, pois das 7 farmácias estudadas, apenas uma delas apresentou concentração de isotretinoína dentro da faixa preconizada. Todas as outras apresentaram produtos com concentração inicial abaixo do permitido (< 90 %). Nenhuma embalagem utilizada pelas farmácias era adequada para acondicionar o medicamento, pois permitiam a passagem de oxigênio e luz, além de apresentarem abertura muito grande quando a embalagem

era aberta o que facilitava a degradação do fármaco. Finalmente, o prazo de validade rotulado nos produtos manipulados por 6 das 7 farmácias estudadas estava além dos 90 dias preconizados. Desse modo, a Stiefel[®] comprovou que muitas farmácias de manipulação não estão preparadas para manipular esse fármaco, produzindo medicamentos que não são capazes de garantir aos usuários os efeitos benéficos desejados.

A fotoestabilidade de fármacos é objeto constante de artigos de revisão científica (TØNNESEN, 2001; GLASS *et al.*, 2004). A fotodegradação dos retinóides, em especial, é complexa e envolve vários processos, dos quais a isomerização é o mais importante.

MAIO e colaboradores (2003) avaliaram a estabilidade da isotretinoína e tretinoína em soluções metanólicas (40 µg/ mL) no momento de seu preparo e após 25 minutos de exposição à luz ambiente. Os autores verificaram que após 25 minutos de exposição da solução metanólica de isotretinoína à luz ambiente, restava apenas 25,5 % da concentração inicial e, nesse tempo, a concentração de tretinoína, o principal produto de degradação da isotretinoína quando exposta a luz, era de 27,6 % da concentração de isotretinoína inicial. A tretinoína também apresentou o mesmo comportamento, sendo a isotretinoína seu principal produto de degradação quando exposto a luz ambiente.

Segundo TASHTOUSH e colaboradores (2008), a luz UVA (componente da luz solar simulada - LSS) é a principal fonte de fotodegradação da isotretinoína e da tretinoína. Essa conclusão é resultante de estudo da estabilidade química desses retinóides em solução etanólica e em creme, na concentração de 0,025 %, frente a luz UVA, LSS e luz visível. A degradação de ambos retinóides foi maior nas formulações de creme do que nas soluções etanólicas, provavelmente devido aos adjuvantes da formulação que podem interagir com os fármacos. Nas condições empregadas, a tretinoína mostrou-se mais sensível à fotodegradação do que a isotretinoína. Os autores sugerem que seja desenvolvida uma formulação melhorada através da adição de um fotoprotetor UVA, capaz de diminuir os efeitos colaterais da terapia com tretinoína, pois a luz UVA penetra profundamente através da pele e ainda a fotodegradação da tretinoína pode contribuir para a fotosensibilidade.

Devido a grande instabilidade dos retinóides frente à luz, vários estudos são relatados na literatura visando melhorar a estabilidade desses fármacos através de sistemas como lipossomas, nanocápsulas, nanoemulsões e inclusão em ciclodextrinas.

YAP e colaboradores (2005) investigaram os efeitos da complexação da isotretinoína em hidroxipropil- β -ciclodextrinas (HP- β -CD) na melhora da sua fotoestabilidade. A fotoestabilidade da isotretinoína complexada foi examinada em soluções aquosas usando-se solução metanólica de isotretinoína como controle. Os resultados indicaram que a HP- β -CD foi capaz de diminuir a fotodegradação da isotretinoína, tornando-a mais estável na presença de luz. A degradação da isotretinoína em todos os casos estudados seguiu cinética de primeira ordem. A constante de degradação da isotretinoína na presença de HP- β -CD foi mais de sete vezes menor que aquela observada na ausência do complexo.

IOLE e colaboradores (2005) melhoraram a fotoestabilidade da isotretinoína e da tretinoína incluindo esses fármacos em lipossomas. A encapsulação em lipossomas aumentou a meia-vida da tretinoína em aproximadamente 12 vezes em comparação com a solução etanólica. Já a isotretinoína não mostrou resultados tão satisfatórios, o que foi atribuído a sua baixa inclusão no complexo lipossomal ($26,7 \pm 3,1$ %) comparada com a tretinoína ($59,4 \pm 2,3$ %). A maior incorporação da tretinoína foi provavelmente favorecida devida sua estrutura linear.

OURIQUE e colaboradores (2008) mostraram que nanocápsulas de PCL contendo tretinoína foram capazes de melhorar a fotoestabilidade desse fármaco em aproximadamente 2 vezes quando comparado com a solução metanólica. O polímero foi de extrema importância nesta melhora, pois nanoemulsões de tretinoína, omitindo o polímero, também apresentaram um potencial de melhorar sua fotoestabilidade, mas o aumento de tempos de meia-vida foi mais pronunciado para as nanocápsulas, o que pode ser atribuído à cristalinidade do polímero, capaz de refletir e espalhar a radiação UV.

WEISS-ANGELI e colaboradores (2008) estudaram a fotodegradação de nanocápsulas de octilmetoxicinamato (OMC), filtro solar amplamente usado em cosméticos, e sua associação com quercetina, usada como antioxidante, frente à

radiação UVA e mostraram que as nanocápsulas foram capazes de proteger o OMC, diminuindo sua degradação em suspensões aquosas. Além disso, a presença de quercetina melhorou a estabilidade da OMC e seu uso simultâneo com Span 60[®] foi o que mostrou melhores resultados. Os autores concluíram que a estabilidade da OMC foi melhorada provavelmente devido a dois mecanismos de fotoproteção: a capacidade antioxidante da quercetina e a habilidade das nanocápsulas de espalhar a luz.

3.3 Penetração cutânea e a barreira da pele

Uma importante e atrativa via para administração de substâncias é a pele, sendo considerada como uma rota não invasiva capaz de evitar a degradação de vários fármacos. A pele não é só uma via para terapia local, mas também uma via para que fármacos alcancem efeitos regionais ou sistêmicos (ASBILL e MICHNIAK, 2000; MIYAZAKI *et al.*, 2003).

Na administração tópica, o fármaco pode penetrar no estrato córneo tanto pela via transdérmica quanto pela via transfolicular. Em geral, partículas maiores que 10 μm permanecem na superfície da pele, partículas entre 3 e 10 μm concentram-se nos folículos pilosos e, quando menores que 3 μm , penetram nos folículos e no estrato córneo igualmente (BARRY, 2005).

A barreira da pele é localizada na parte mais externa do corpo, chamada de estrato córneo (Figura 3). O estrato córneo controla a difusão e a penetração de agentes para o interior e através da pele sendo formado por uma camada contínua de proteínas e corneócitos embebidos em uma matriz intercelular rica em lipídios não-polares e organizados em camadas lipídicas lamelares. Os lipídios da epiderme são compostos principalmente por ceramidas, colesterol e ácidos graxos livres em quantidades aproximadamente equivalentes. Esta camada de lipídios intercelulares tem função de mediar a perda de água transcutânea desenvolvendo um papel vital na função de barreira (SCHNETZ e FARTASCH, 2001). Assim, o estrato córneo constitui o principal obstáculo para a penetração de compostos aplicados topicamente na pele. Apesar da natureza quase impermeável da pele, conferida

especialmente pelo estrato córneo (RHEIN *et al.*, 2000; MOSER *et al.*, 2001), algumas substâncias são capazes de penetrá-la (DEGIM, 2006). Dessa forma, a pele torna-se uma potencial via de administração de fármacos, sendo o estrato córneo crucial no controle da absorção percutânea dos mesmos (ASBILL e MICHNIAK, 2000; HADGRAFT, 2001; DEGIM, 2006).

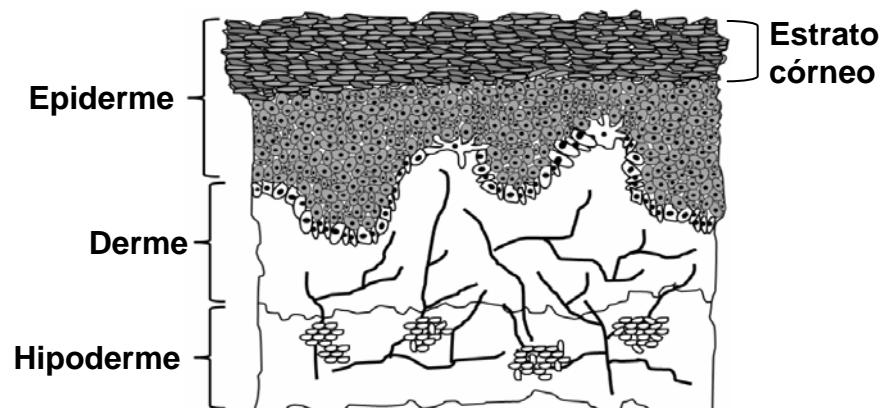


Figura 3. Camadas da pele humana (Adaptada de ESCOBAR-CHÁVEZ *et al.*, 2008)

A rota percutânea pode ser uma solução atrativa para a distribuição sistêmica de fármacos muito potentes, que possuem baixa biodisponibilidade oral, *clearance* sistêmico baixo e janela terapêutica estreita, pois evita o metabolismo de primeira-passage hepático e apresenta um potencial de liberação controlada a longo prazo. No entanto, quando se objetiva a administração tópica, espera-se que o fármaco seja distribuído somente no tecido alvo e que níveis sistêmicos não sejam alcançados, mantendo as concentrações terapêuticas do fármaco na pele, sem o risco de induzir efeitos secundários devido à exposição sistêmica (KREILGAARD, 2002).

A utilização de medicamentos tópicos nas doenças de pele oferece muitas vantagens. A mais evidente é que a pele está imediatamente acessível para a aplicação do medicamento e o controle do tratamento. Também a absorção sistêmica da maioria dos medicamentos tópicos é desprezível e, portanto, são poucos os efeitos colaterais e as interações farmacológicas. Além disso, há muitas

dificuldades na avaliação da biodisponibilidade dos agentes tópicos devido aos níveis sanguíneos muito baixos obtidos com o tratamento (WYATT *et al.*, 2003).

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

O produto tópico deve ser seguro para o usuário nas condições normais ou razoavelmente previsíveis de seu uso. Isto significa que os adjuvantes devem ser incorporados na formulação do produto em concentrações que apresentem uma margem de segurança adequada e que as matérias-primas utilizadas não apresentem riscos (BRASIL, 2003a).

Para a avaliação da segurança de produtos tópicos acabados a ANVISA (BRASIL, 2003a) sugere:

1. Avaliação do potencial irritante

a. Produto com risco desconhecido: triagem com métodos *in vitro* ou *in vivo* em animais, seguido de teste clínico.

b. Produto com ausência presumida de risco: teste clínico.

2. Avaliação do potencial alergênico

a. Nível de absorção dos ingredientes desconhecido: teste *in vivo*, em animais.

b. Produto com ausência presumida de risco: teste clínico.

Seguindo os critérios da ANVISA há necessidade de se avaliar o potencial alergênico do gel contendo nanopartículas de isotretinoína.

3.4 Sistemas nanoparticulados para uso tópico

A resposta farmacológica de um fármaco está diretamente relacionada com sua concentração no sítio de ação. Como a distribuição das moléculas no organismo está diretamente relacionada com suas propriedades físico-químicas, a associação de fármacos a sistemas carreadores tem sido considerada uma alternativa para controlar sua distribuição no organismo (COUVREUR *et al.*, 2002) permitindo a otimização da velocidade de cedência e do regime de dosagem das substâncias (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

Dentre os sistemas carreadores destacam-se as nanocápsulas, que são constituídas por um invólucro polimérico disposto ao redor de um núcleo oleoso, podendo o fármaco encontrar-se dissolvido neste núcleo e/ou adsorvido à parede polimérica (Figura 4) (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

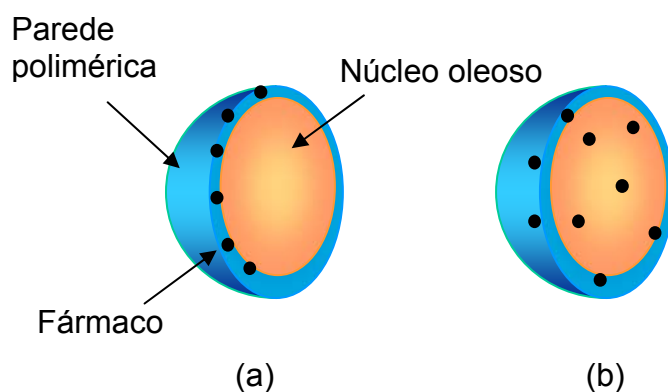


Figura 4. Representação esquemática de nanocápsulas: a) fármaco adsorvido na parede polimérica das nanocápsulas; b) fármaco disperso por toda a partícula. (Retirado de SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

Vários métodos encontram-se relatados na literatura para a preparação de nanocápsulas sendo, de uma forma geral, classificados em métodos baseados em polimerização de monômeros dispersos e em polímeros pré-formados (QUINTANAR-GUERRERO *et al.*, 1998). Dentre estes métodos, a preparação de nanocápsulas pela técnica de nanoprecipitação tem sido amplamente estudada.

O método de nanoprecipitação ou deposição interfacial de polímero pré-formado para a obtenção de nanocápsulas consiste na solubilização de um óleo, um tensoativo lipofílico e um polímero em um solvente orgânico, geralmente a acetona. Esta fase orgânica é misturada com uma dispersão aquosa de tensoativo hidrofílico e a formação das nanocápsulas baseia-se no princípio da formação de vesículas por emulsificação espontânea, enquanto o solvente difunde no não-solvente, quando a fase orgânica, contendo o polímero e o óleo, é vertida na fase aquosa (não-solvente). Assim, o polímero, insolúvel tanto no óleo quanto no não-solvente, é dessolvatado na interface dos dois componentes imiscíveis. Os tensoativos hidrofílicos e lipofílicos não são essenciais para a formação das nanopartículas, mas são importantes para a estabilização da suspensão, de forma a prevenir a agregação das partículas, durante o armazenamento (FESSI *et al.*, 1989; QUINTANAR-GUERRERO *et al.*, 1998).

Após a preparação, as nanocápsulas podem ser caracterizadas mediante a combinação de diversas técnicas, sendo estas, principalmente: a análise morfológica e a distribuição do tamanho das partículas, a determinação do potencial zeta e do pH, a determinação da concentração de fármaco associado às nanoestruturas e a cinética de liberação do fármaco (COUVREUR *et al.*, 2002; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

Uma das vantagens do uso de nanocápsulas é o confinamento do fármaco na cavidade oleosa, proporcionando uma liberação mais controlada, evitando o contato do fármaco com tecidos e, portanto, reduzindo a irritação do mesmo sobre o local de administração, além de protegê-lo da degradação após a administração (COUVREUR *et al.*, 2002; HANS & LOWMAN, 2002).

O tamanho de partícula recomendado para o uso em formulações farmacêuticas e cosméticas destinadas a aplicação tópica deve ser menor do que 600 nm (BOUCHEMAL *et al.*, 2004). Estudos realizados com microscopia confocal, claramente mostraram que os sistemas nanoparticulados preferencialmente acumulam-se no ducto folicular, sendo a acumulação dependente do tempo de contato e do tamanho da partícula. Quanto menor a partícula (20 nm) maior o acúmulo na região folicular, sendo as nanopartículas também encontradas nos sulcos epidérmicos (ALVAREZ-ROMÁN *et al.*, 2004a).

ALVES e colaboradores (2007), através de um estudo com nimesulida, relataram que as moléculas deste fármaco encapsulado em nanocápsulas de PCL não são capazes de atravessar a pele, aumentando a sua residência no estrato córneo sem, no entanto, aumentar o transporte transdérmico, e conseqüentemente, a absorção. Os autores também verificaram que a PCL apresenta alta afinidade pela camada mais superficial da pele e o gel contendo nanocápsulas apresenta extensa penetração tanto no estrato córneo quanto nas demais camadas da epiderme e na derme. Adicionalmente, a maior área superficial dos nanocarreadores possibilita aumento do contato do fármaco nanoencapsulado com o estrato córneo, aumentando a sua liberação nas primeiras camadas da pele e o seu tempo de residência (JENNING *et al.*, 2000; ALVAREZ-ROMÁN *et al.*, 2004b).

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

SHIM e colaboradores (2004) estudaram o mecanismo de penetração do minoxidil encapsulado em nanopartículas poliméricas e os efeitos do tamanho das nanopartículas na permeação cutânea. Os estudos demonstraram que as nanopartículas liberaram eficientemente o minoxidil na pele e que o folículo piloso representou a principal via de penetração. As nanopartículas empregadas neste experimento tinham tamanho entre 40 e 130 nm, sendo que as partículas menores apresentaram maior penetração do ativo.

Não existem relatos na literatura mostrando a preparação de nanocápsulas de isotretinoína com PCL. Até o momento, apenas dois artigos estão disponíveis na literatura relatando a incorporação de isotretinoína em nanosistemas. Um relata a incorporação em lipossomas (IOELE *et al.*, 2005) visando melhorar sua fotoestabilidade e o outro, em nanopartículas lipídicas sólidas (NLS), visando avaliar sua penetração cutânea (LIU *et al.*, 2006). Este artigo, recentemente publicado, mostrou a preparação de nanopartículas com tamanhos entre 30 e 50 nm e a avaliação da penetração cutânea utilizando célula de difusão de Franz. As

nanopartículas lipídicas sólidas foram capazes de aumentar significativamente a quantidade de fármaco acumulado na pele, evitando sua captação sistêmica, sendo um carreador promissor para liberação tópica de isotretinoína.

3.5 Avaliação da penetração cutânea pela técnica *tape stripping*

Dentre os testes para avaliação da penetração e permeação de produtos de aplicação tópica os mais relevantes são os realizados *in vivo* em humanos. Como estes testes envolvem voluntários, devem ser submetidos à avaliação ética para aprovação. Geralmente os voluntários são saudáveis, uma vez que a pele com alguma desordem apresenta grandes variações e mudanças durante o tempo. Nos Estados Unidos, produtos dermatológicos candidatos a medicamento genérico são dispensados de testes de bioequivalência, desde que os excipientes do produto sejam qualitativamente os mesmos e quantitativamente não difiram em mais de 5 % quando comparados com o produto inovador. No Brasil, as exigências para o registro são menos rígidas. Medicamentos de uso tópico, não destinados a efeito sistêmico, são dispensados de estudos de bioequivalência para registro como genérico. Deve ser demonstrada apenas a equivalência farmacêutica, ou seja, o candidato a genérico deve apresentar o mesmo fármaco, na mesma concentração em relação ao medicamento de referência e excipientes de mesma função, em concentrações compatíveis (U.S.FDA/CDER,1998; BRASIL, 2003b).

Apesar da legislação brasileira ainda não exigir, a comprovação de bioequivalência é necessária para a aprovação e registro de novos produtos dermatológicos candidatos a genérico. Nesse estudo, dois produtos, geralmente um teste (genérico) e um de referência (inovador) são comparados. Para que um medicamento seja considerado genérico em relação à aplicação tópica, é necessário certificar-se de que a liberação do produto e distribuição do fármaco na pele ou no sítio de ação tenha a mesma concentração e extensão que o produto inovador (JACOBI *et al*, 2003).

Para a determinação de bioequivalência de produtos tópicos, o método de escolha é o *tape stripping*, também chamado de método dermatofarmacocinético

(SHAH *et al.*, 1998). O *tape stripping* é amplamente usado e aceito para examinar a distribuição e localização de substâncias no estrato córneo (ESCOBAR-CHÁVEZ *et al.*, 2008) oferecendo uma alternativa real para avaliar a biodisponibilidade e/ou bioequivalência de agentes dermatológicos aplicados topicamente cujo alvo são os tecidos viáveis. Como o estrato córneo é usualmente a principal resistência para penetração de compostos aplicados topicamente, tem se argumentado que os níveis de fármaco no estrato córneo podem estar correlacionados com os níveis de fármaco atingidos nas camadas viáveis da pele (HERKENNE *et al.*, 2008).

No *tape stripping* segue-se um protocolo padronizado de aplicação de produtos e aplicações/remoção repetidas de fitas adesiva da superfície da pele é seguido. Desse modo, camadas consecutivas de células do estrato córneo são removidas (aproximadamente entre 0,5-1 μm do estrato córneo é removido, sendo a espessura do estrato córneo de 10 μm). Esse método é relativamente indolor e não-invasivo, pois são retiradas apenas as células (corneócitos) do “tecido morto”, onde se determina a concentração de fármaco. Através da análise individual de cada fita é possível observar que, em geral, a concentração de fármaco diminui log-linearmente e em torno de 90 % da quantidade de fármaco é encontrada nas primeiras 10 fitas. As próximas 10 fitas são responsáveis por menos de 5 % da dose (CARON *et al.*, 1990; BENFELDT *et al.*, 2007; HERKENNE *et al.*, 2008).

BENFELDT e colaboradores (2006) estudaram a penetração cutânea de creme e pomada de xilocaína (5 % de lidocaína), através da técnica de *tape stripping* em humanos, na qual três áreas de aplicação foram demarcadas no antebraço de 8 voluntários, nos tempos de 30 min e 120 min, sendo a terceira área usada como controle (branco). Foi aplicada uma dose de 4 mg/cm² em cada local, totalizando 12 mg de formulação por área. Os resultados obtidos não mostraram diferença na concentração de lidocaína no estrato córneo após 30 e 120 min de aplicação comparando-se a mesma formulação, mas quando comparou-se o creme com a pomada, observou-se uma diferença no conteúdo de lidocaína no estrato córneo cerca de 2,5 vezes maior para o creme em comparação à pomada nos dois tempos estudados, mostrando assim a maior capacidade da formulação em pomada de penetrar através do estrato córneo.

4. Materiais e Métodos

4.1 Materiais

4.1.1 Matérias-primas

- Fármaco: Isotretinoína (Pharma Nostra[®], teor 99,5 %);
- Polímero: Poli(ϵ -caprolactona) (PCL): $M_w = 65000$ g/mol (Aldrich[®]);
- Tensoativo lipofílico: Monoestearato de sorbitano (Span 60[®]), EHL = 4,3 (Delaware[®]);
- Tensoativo hidrofílico: Polissorbato 80 (Tween 80[®]), EHL = 15,0 (Delaware[®]);
- Triglicerídeos do ácido cáprico/caprílico/triglicerídeos de cadeia média (TCM) (Brasquim[®]);
- Butil-hidroxitolueno (BHT) (Viafarma[®]);
- Hidroxietilcelulose (Natrosol[®]) (Pharmaspecial);
- Imidazolinidil uréia (Brasquim[®]).

4.1.2 Aparelhos e equipamentos

- Agitador magnético Certomat MV (Vitaris[®]);
- Evaporador rotatório (Buchi[®]);
- Bomba de vácuo (Buchi Vac[®]);
- Balança analítica modelo AX 200 (Shimadzu[®]);
- Vórtex Certomat MV (Braun[®]);
- Potenciômetro B474 (Micronal[®]);
- Zetasizer[®] nano-ZS modelo ZEN 3600 (Malvern Instruments);

- Sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) (Waters®) 746 composto de: Integrador Data Module Waters® 746, bomba e controlador de fluxo Waters® 600, injetor automático Waters® 717, detector Ultra-Violeta Waters® 2487, software Millenium;
- Sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) (Shimadzu®) composto de: bomba LC-10ADVP, controlador de sistema SCL-10AVP, autoinjeter SIL-10ADVP, detector de fluorescência RF-10AXL, software Shimadzu® CLASS-VP (versão 6.12);
- Câmera fotográfica Sony DSC-W50 6.0 mega pixels;
- Turbiscan Lab® (Formulaction, France);
- Viscosímetro rotacional Brookfield, modelo LVDV-II+ provido de *spindle* SC4-25;
- Banho ultra-som Ultrasonic Cleaner (Unique®);
- Microscópio Eletrônico de Transmissão Jeol® (MET, JEM 1200 ExII) (Centro de Microscopia Eletrônica da UFRGS, Porto Alegre, Brasil);
- Radiômetro – Medidor de ultravioleta modelo UV-400 (Icel®);
- Câmera de Irradiação UVA (confeccionada na Universidade de Caxias do Sul – UCS) contendo 5 lâmpadas fluorescentes UVA, 130 V, 30 W e lâmpadas fluorescentes UVA, 130 V, 30 W (3 Starlux® e 2 Sanzio®).

4.1.3 Solventes, reagentes e outros materiais

- Água Milli-Q (Destilador/Deionizador Milli Q® – Millipore®);
- Acetonitrila grau CLAE (Tedia® Company, Inc.);
- Ácido trifluoroacético (Merck®);
- Etanol grau CLAE (Tedia® Company, Inc.);

- Ácido acético glacial (Merck®);
- Acetona p.a. (Nuclear®);
- Coluna cromatográfica Nova-Pak C₁₈, (150 mm x 3,9 mm; 4 µm) (Waters®);
- Pré-coluna C₁₈ (Phenomenex®);
- Membranas GV (Durapore) em polivinilideno (PVDF) 0,45 µm de poro, 47 mm de diâmetro, hidrofílica, branca, lisa (Millipore®);
- Membranas em polivinilideno (PVDF) 0,45 µm de poro, 13 mm de diâmetro (Millipore®);
- Microcon – Filtros para microcentrífuga com membrana de celulose regenerada 10000 NMWL (Millipore®);
- Fita adesiva (Scotch®, 3M, 45 mm, com validade até Julho de 2009);
- Fita crepe (Eurocel®, Sicad, 25 mm);
- Filtros Ultrafree® MC GPMC 10,000 NMWL (Millipore®).

4.2 Métodos

4.2.1 Preparação das nanopartículas

Foram preparadas nanocápsulas conforme o método de deposição interfacial do polímero pré-formado e nanoemulsões pelo método de emulsificação espontânea (FESSI *et al.*, 1989; CRUZ *et al.*, 2006). As nanocápsulas foram constituídas de um invólucro polimérico (PCL), contendo um sistema reservatório oleoso de triglicerídios de cadeia média (TCM), e as nanoemulsões constituídas por uma fase dispersa em uma fase contínua, estabilizada por tensoativos, sem a presença da PCL.

A composição das suspensões está descrita na Tabela 1. A fase orgânica foi solubilizada em banho-maria sob aquecimento moderado (37 a 40 °C) até completa

dissolução de seus constituintes. A fase aquosa foi submetida à agitação para dispersão do tensoativo hidrofílico. Em seguida, a fase orgânica foi injetada lentamente na fase aquosa, sob agitação e com auxílio de um funil. Este procedimento foi realizado com ausência de luz devido à fotoinstabilidade do fármaco. Após 10 minutos de agitação a suspensão foi vertida para dentro de um balão âmbar de fundo redondo. A eliminação do solvente orgânico e a concentração da suspensão foram realizadas em evaporador rotatório sob temperatura controlada (37 a 40 °C), até o ajuste final do volume para a concentração de fármaco desejada. Todas as vidrarias utilizadas para preparo das nanopartículas foram âmbar.

Tabela 1. Composição das suspensões de nanocápsulas e nanoemulsões.

Constituintes*	NC0,5	NC1,0	NC1,5	NC-BHT	NE	NE-BHT	NC-Br
<u>Fase Orgânica</u>							
Isotretinoína (g)	0,025	0,050	0,075	0,025	0,025	0,025	-
BHT (g)	-	-	-	0,05	-	0,05	-
TCM (mL)	1,65	1,65	1,65	1,65	1,65	1,65	1,65
Span 60 [®] (g)	0,383	0,383	0,383	0,383	0,383	0,383	0,383
PCL (mg)	0,5	0,5	0,5	0,5	-	-	0,5
Acetona (mL)	135	135	135	135	135	135	135
<u>Fase Aquosa</u>							
Tween 80 [®] (g)	0,383	0,383	0,383	0,383	0,383	0,383	0,383
Água destilada (mL)	265	265	265	265	265	265	265

*Volume final de 50 mL; NC0,5: Nanocápsulas contendo 0,5 mg/ml de isotretinoína; NC1,0: Nanocápsulas contendo 1,0 mg/ml de isotretinoína; NC1,5: Nanocápsulas contendo 1,5 mg/ml de isotretinoína; NC-BHT: Nanocápsulas contendo 0,5 mg/ml de isotretinoína e BHT; NE: Nanoemulsão contendo 0,5 mg/ml de isotretinoína; NE-BHT: Nanoemulsão contendo 0,5 mg/ml de isotretinoína e BHT; NC-Br: Nanocápsulas brancas.

As nanocápsulas foram preparadas na concentração de 0,5; 1,0 e 1,5 mg/mL e as nanoemulsões na concentração de 0,5 mg/mL. As nanocápsulas e nanoemulsões na concentração de 0,5 mg/mL foram preparadas também com o uso do antioxidante butil-hidroxitolueno (BHT). Além dessas, foram preparadas nanocápsulas brancas, sem o fármaco e sem BHT. As suspensões foram denominadas: NC0,5: nanocápsulas na concentração de 0,5 mg/mL; NC1,0: nanocápsulas na concentração de 1,0 mg/mL; NC1,5: nanocápsulas na concentração de 1,5 mg/mL; NC-BHT: nanocápsulas na concentração de 0,5 mg/mL contendo BHT; NE: nanoemulsão na concentração de 0,5 mg/mL; NE-BHT: nanoemulsão na concentração de 0,5 mg/mL contendo BHT e NC-Br: nanocápsulas brancas.

4.2.2 Caracterização das suspensões e estabilidade frente ao armazenamento (efeitos de estocagem em função do tempo)

As suspensões de nanocápsulas e nanoemulsões foram preparadas em triplicata e acondicionadas em frascos âmbar de vidro, com batoque e tampa rosqueável e mantidas à temperatura ambiente por dois meses. Além do aspecto físico destas formulações, elas também foram caracterizadas de acordo com pH, diâmetro de partícula, índice de polidispersão, potencial zeta e doseamento de isotretinoína nos dias 0, 1, 7, 15, 30 e 60 após preparação. A taxa de associação e a morfologia foram avaliadas somente para a formulação NC-BHT no primeiro dia da estabilidade. As alíquotas para avaliação das amostras foram retiradas após prévia agitação.

4.2.2.1 Determinação do pH

A determinação do pH das suspensões foi realizada em triplicata com o auxílio de um potenciômetro B474 (Micronal[®]) previamente calibrado com soluções-tampão de pH 4,0 e 7,0.

4.2.2.2 Determinação do potencial zeta

O potencial zeta das suspensões foi determinado através da técnica de mobilidade eletroforética no aparelho Zetasizer[®] nano-ZS modelo ZEN 3600 (Malvern Instruments). As amostras foram previamente diluídas em uma solução de água Milli-Q[®] contendo 10 mM de cloreto de sódio filtrados (0,22 µm), e colocadas em células capilares fechadas (DTS1060) para posterior análise. Os resultados foram expressos em milivolts (mV) a partir de uma média de 3 determinações.

4.2.2.3 Determinação do diâmetro médio das partículas e índice de polidispersão

O diâmetro das nanopartículas, bem como o índice de polidispersão das mesmas foi determinado através de espalhamento de luz dinâmico (espectroscopia de correlação de fótons). As análises foram obtidas pela observação da luz espalhada a 90° no equipamento Zetasizer[®] nano-ZS modelo ZEN 3600 (Malvern Instruments[®], USA). As amostras foram previamente diluídas 500 vezes em água Milli-Q[®] filtrada (0,22 µm) e colocadas em um dispositivo de poliestireno (DTS0012) para análise. Os resultados foram expressos em nanômetros (nm) a partir de uma média de 3 determinações.

4.2.2.4 Quantificação da isotretinoína nas suspensões

A quantificação da isotretinoína nas suspensões foi realizada por CLAE, utilizando sistema Shimadzu[®]. Para a determinação do teor ou taxa de recuperação do fármaco, as suspensões foram diluídas 100 vezes em acetonitrila (100 µL de suspensão em um balão volumétrico de 10 mL contendo acetonitrila), o que gera dissolução dos componentes das nanopartículas. A medida da concentração total de isotretinoína foi realizada por CLAE, utilizando metodologia adaptada e validada a partir do trabalho de GATTI e colaboradores (2000). A descrição da metodologia para quantificação da isotretinoína nas suspensões de nanocápsulas e os resultados da validação encontram-se no Anexo 1.

4.2.2.5 Análise morfológica

A avaliação morfológica foi realizada em microscópio eletrônico de transmissão Jeol[®] (JEM 1200 ExII) operando a 80 kV (Centro de Microscopia Eletrônica, UFRGS, Brasil) para a formulação NC-BHT. A suspensão foi previamente diluída em Água Milli-Q[®] na proporção de 1:10 e depositada em um *grid* composto de suporte de cobre e filme de Formvar-Carbono (Electron Microscopy Sciences) e contrastadas com solução de acetato de uranila (2 % m/v).

4.2.2.6 Determinação da taxa de associação

A concentração da isotretinoína associada às nanoestruturas foi determinada por CLAE Shimadzu[®] (Anexo 1), pela diferença entre a concentração total de isotretinoína na formulação e a concentração presente na fase aquosa da suspensão (isotretinoína não associada). A determinação da isotretinoína na fase aquosa foi realizada por ultrafiltração-centrifugação das suspensões (Filtros Microcon - Millipore[®]) durante 5 minutos a 10.000 rotações por minuto (rpm). A concentração de isotretinoína não-associada foi quantificada no ultrafiltrado, utilizando-se as mesmas condições descritas para a determinação da concentração total de isotretinoína. Esta determinação foi realizada apenas para a suspensão NC-BHT, em triplicata, logo após sua preparação.

4.2.2.7 Análise em Turbiscan LAb[®]

As suspensões NC0,5, NC-BHT, NE e NE-BHT foram submetidas à análise em Turbiscan LAb[®] para verificação de possíveis fenômenos de instabilidade. Através deste equipamento é possível determinar a ocorrência de fenômenos como cremagem, sedimentação, coalescência e mesmo a homogeneidade da amostra. O Turbiscan[®] consiste de uma fonte de luz de infravermelho próximo e de dois detectores que agem de forma sincronizada. Desta forma, o detector de transmissão recebe informações da luz transmitida através do produto (*T*) e o detector de *backscattering* mede a luz refletida (*BS*) pelo produto (LEMARCHAND *et al.*, 2003).

As amostras (20 mL) foram colocadas em cubetas de vidro e as análises foram conduzidas a 25 °C durante 24 h, com leituras a cada 6 minutos.

4.2.3 Estabilidade das suspensões frente à luz UVA

A fotodegradação da isotretinoína nas nanoestruturas foi estudada mediante a exposição das formulações à radiação UVA. Para isto, as formulações foram colocadas em cubetas de poliestireno mantidas em suporte composto por 15 contentores individuais, a uma distância de 15 cm da fonte luminosa (5 lâmpadas fluorescentes BLB, 130 V, 30 W: 3 Starlux[®] e 2 Sanzio[®]).

A intensidade da luz UVA foi medida com um radiômetro modelo UV-400 (Icel[®]) em três momentos do experimento (início, 4 horas e final), a uma distância de 15 cm das lâmpadas, distância na qual as formulações foram colocadas.

Foram preparadas suspensões de NC, NC-BHT, NE, NE-BHT e uma formulação contendo a isotretinoína livre utilizada como controle (LIVRE). A formulação LIVRE foi composta de fase orgânica contendo isotretinoína (0,025 g) e acetona (135 mL) e fase aquosa contendo Tween 80[®] (0,383 g) e água destilada (265 mL). Todas as formulações foram preparadas de acordo com metodologia descrita em 4.2.1, na véspera do experimento.

Foram adicionados em cada cubeta de poliestireno, 3 mL de cada formulação as quais foram submetidas à radiação UVA durante 8 horas. Os tempos de coleta foram 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240, 360 e 480 min. Para análise, foram retirados 100 µL de formulação em cada tempo de coleta e diluídos em 10 mL de acetonitrila, visando quantificação da isotretinoína em CLAE de acordo com o método previamente descrito e validado (Anexo 1). Triplicatas de todas as formulações foram submetidas à irradiação.

Com o objetivo de investigar a influência da degradação térmica, uma amostra de cada formulação foi submetida à irradiação coberta com papel alumínio. Alíquotas dessas amostras foram analisadas nos mesmos tempos de coleta.

Os perfis de fotodegradação obtidos foram modelados utilizando o programa Scientist[®] (MicroMath Scientific Software, Inc.), sem a utilização de peso, conforme cinética de primeira ordem monoexponencial ou biexponencial utilizando as equações 1 e 2, respectivamente

$$C = C_0 \cdot e^{-k \cdot t} \quad \text{Eq. 1}$$

$$C = A \cdot e^{-\alpha \cdot t} + B \cdot e^{-\beta \cdot t} \quad \text{Eq. 2}$$

onde A: quantidade de fármaco degradado na velocidade α ; B: quantidade de fármaco degradado na velocidade β ; α , β , e k: constantes de degradação; C_0 : concentração de fármaco no tempo zero.

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

4.2.4. Preparação de géis hidrofílicos contendo nanopartículas

Foram preparados quatro géis hidrofílicos não-iônicos contendo 2 % (m/v) de hidroxietilcelulose (Natrosol[®]) e 0,05 % de isotretinoína. A composição qualitativa das formulações está descrita na Tabela 2. Na preparação dos géis contendo suspensão de nanocápsulas, essas substituíram a água da formulação (GEL-NCBHT e GEL-NCBr). Para comparação, foi preparado um gel contendo suspensão de isotretinoína livre (GEL-LIVRE), a qual foi preparada nas mesmas condições descritas no item anterior, sendo que na fase orgânica foi acrescentado 0,05 g BHT, e um gel branco (GEL-Br). Todas as suspensões usadas nos géis foram preparadas nas condições descritas em 4.2.1. A mistura de todos os componentes de cada gel foi colocada em geladeira (4 °C) por período de aproximadamente 36 horas, para geleificação. Passado este tempo, as dispersões foram homogeneizadas com o auxílio de grau de porcelana e pistilo para obtenção dos géis. As formulações foram acondicionadas em frascos plásticos, de parede dupla, com tampa rosqueável e mantidos em geladeira.

Tabela 2. Componentes da formulação dos géis de isotretinoína 0,05 %.

Constituintes (g)*	GEL-NCBHT	GEL-NCBr	GEL-Br	GEL-LIVRE
Hidroxietilcelulose	1,00	1,00	1,00	1,00
Imidazolinidil Uréia	0,25	0,25	0,25	0,25
Suspensão de nanocápsulas contendo isotretinoína e BHT	48,73	-	-	-
Suspensão de nanocápsulas brancas	-	48,73	-	-
Água destilada	-	-	48,73	-
Suspensão com a isotretinoína livre e BHT	-	-	-	48,73

*Quantidades para 50 gramas de gel; GEL-NCBHT – Gel contendo suspensão de nanocápsulas de isotretinoína 0,5 mg/mL com BHT; GEL-NCBr – Gel contendo suspensão de nanocápsulas brancas (sem o fármaco); GELBr – Gel preparado com água destilada; GEL-LIVRE – Gel preparado com uma suspensão do fármaco livre.

Os hidrogéis preparados foram caracterizados quanto ao pH, concentração de fármaco e viscosidade.

4.2.4.1 Determinação do pH

As formas farmacêuticas semi-sólidas foram diluídas a 10 % (m/v) em água destilada e as determinações do pH foram efetuadas utilizando-se potenciômetro B474 (Micronal[®]) calibrado com soluções-tampão pH 4,0 e 7,0. Esta avaliação foi realizada para os géis GEL-NCBHT e GEL-LIVRE, em triplicata.

4.2.4.2 Doseamento da isotretinoína nos géis

A quantificação de isotretinoína presente nas formulações semi-sólidas GEL-NCBHT e GEL-LIVRE foi realizada por CLAE, utilizando sistema Waters[®] conforme descrito no Anexo 2.

Para a determinação do teor de fármaco contido nos géis pesou-se aproximadamente 0,2 g de cada formulação semi-sólida em um Erlenmeyer âmbar. Após pesagem, adicionou-se ao Erlenmeyer uma quantidade de aproximadamente 8 mL de acetonitrila (solução extratora) e homogeneizou-se por 1 hora. Esta dispersão foi colocada em um balão volumétrico de 10 mL e o resíduo contido no Erlenmeyer foi tratado com os 2 mL restantes de acetonitrila para completar os 10 mL. Esta dispersão foi filtrada através de papel filtro e deste filtrado foi retirada quantidade desejada para o doseamento da isotretinoína. A amostra foi filtrada através de membrana hidrofílica (0,45 µm, Millipore) e uma alíquota de 50 µL foi utilizada para quantificação da isotretinoína por CLAE.

4.2.4.3 Avaliação das características reológicas

As características reológicas das formulações semi-sólidas foram avaliadas com auxílio de viscosímetro rotacional Brookfield®, modelo LVDV-II+ provido de *spindle* SC4-25. Para as determinações, as amostras foram acondicionadas em dispositivo Brookfield para avaliação de pequenas quantidades de amostra, acoplado a banho de água termostaticado circulante a 25 °C ± 1 °C. As análises foram feitas em triplicata.

As velocidades de rotação do *spindle* foram selecionadas a partir de determinações preliminares, respeitando os limites de valores de torque (superiores a 10 % e inferiores a 10 %). Após o ajuste das velocidades de rotação do *spindle*, efetuaram-se as leituras das viscosidades, tensões de cisalhamento e velocidades de cisalhamento de cada amostra. A partir destas leituras, construíram-se os reogramas através da representação gráfica das velocidades de cisalhamento em função das tensões de cisalhamento. As propriedades reológicas dos géis foram determinadas seguindo o modelo para fluídos não-newtonianos conforme a Equação 3:

$$\tau = K\dot{\gamma}^n \quad (\text{Eq. 3})$$

onde τ é a tensão de cisalhamento, $\dot{\gamma}$ representa a taxa de cisalhamento, K é o coeficiente de consistência e n é o índice de escoamento ou coeficiente de fluxo,

que é adimensional, e pode ser utilizado na caracterização das formulações, visto que ele caracteriza o desvio em relação ao comportamento newtoniano. A constante K está relacionada à própria viscosidade do produto e é representada pelas unidades de viscosidade (ALVES, 2006).

4.2.5 Avaliação da alergenicidade dos géis

A alergenicidade dos géis preparados (GEL-NCBHT, GEL-NCBr, GEL-Br e GEL-LIVRE) e também do produto comercial Isotrex[®], todos contendo isotretinoína na concentração de 0,05 %, foi avaliada através de dois testes: medida de edema de orelha (*mouse ear swelling test* - MEST) e ensaio do linfonodo local (*local lymph node assay* - LLNA) (WAHLKVIST, 1999; DEAN *et al.*, 2001). Ambos os testes foram realizados na Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Laboratório de Imunofarmacologia, sob responsabilidade da Profa. Dra. Bartira Rossi Bergmann.

4.2.5.1 Teste da medida de edema de orelha (*mouse ear swelling test* - MEST)

O teste de medida de orelha (MEST) é um método robusto na detecção de alérgenos, indicando poucos resultados falso-negativos ou falsos-positivos (ROBINSON *et al.*, 1995).

Para este teste foram utilizados camundongos BALB/c, entre 8 e 12 semanas, de idade com variação de peso que não excedeu 20 % do seu peso médio. Foram utilizados 3 animais para cada formulação investigada.

Na primeira fase do teste (fase de indução) foram realizadas três aplicações tópicas de 100 μ L de cada gel a cada 2 dias (dias 0, 2 e 4) no dorso tricotomizado dos camundongos. Após 5 dias da última aplicação, tempo necessário para que o organismo produza resposta imunológica, procedeu-se à aplicação tópica de 25 μ l das substâncias no dorso de ambas as orelhas (fase de desafio). A resposta imunológica foi avaliada através da medida do inchaço das orelhas dos camundongos, que foram realizadas 24 e 48 horas após a fase do desafio.

As amostras avaliadas neste estudo foram GEL-NCBHT, GEL-NCBr, GEL-Br e GEL-LIVRE e Isotrex[®], oxazolona (0,3 %) como controle positivo e acetona:óleo de oliva (4:1) como controle negativo. Cada amostra foi analisada em triplicata e os resultados apresentados como a média das três repetições.

4.2.5.2 Testes de alergenicidade por ensaio do linfonodo local (*local lymph node assay* – LLNA)

O princípio básico do LLNA é que as substâncias sensibilizadoras induzem uma proliferação primária de linfócitos no linfonodo que drena o local de aplicação da amostra. Esta proliferação é proporcional à dose aplicada e à potência do alérgeno e constitui-se num modo simples de obter uma medida quantitativa objetiva da sensibilização. O LLNA avalia essa proliferação numa relação de dose/resposta na qual a proliferação nos grupos de ensaio é comparado com a obtida nos grupos controles, determinando-se a razão entre a proliferação grupos ensaio/ grupo controle, que é denominado índice de estimulação e deve apresentar o valor de, pelo menos, três para que o produto sob investigação possa ser posteriormente avaliada como potencial sensibilizadora da pele. Este método baseia-se na utilização de marcação radioativa para medir a proliferação celular (ANDERSEN e FRANKILD, 1997).

Os animais utilizados para este teste foram camundongos BALB/c, entre 8 e 12 semanas de idade com variação de peso que não excedeu 20 % do seu peso médio. Foram utilizados 3 animais em cada grupo.

O calendário do experimento seguiu as seguintes etapas:

Dia 1: Aplicação no dorso de cada orelha de 25 µL de cada gel estudado.

Dias 2 e 3: Repetição do procedimento de aplicação efetuado no dia 1.

Dias 4 e 5: Sem tratamento.

Dia 6: Depois de anotado o peso de cada animal, injetou-se 250 µL de tampão fosfato (PBS) contendo 20 µCi de 3H-timidina através da veia caudal. Cinco horas

após administração os animais foram sacrificados. Os linfonodos auriculares foram retirados (2 linfonodos por animal, totalizando 6 por grupo) e colocados em PBS, reunindo-se aqueles de cada grupo experimental (procedimento de conjunto de grupo de tratamento), os quais foram macerados e as células lavadas duas vezes com PBS e precipitadas com uma solução de 5 % em ácido tricloroacético (TCA) a 4 °C durante 18 horas. Os sedimentos foram ressuspensos em 1 mL de TCA e transferidos para frascos de contador de cintilações contendo 2 mL de líquido de cintilação para contagem de ^3H .

A determinação da proliferação celular procedeu-se pela incorporação de ^3H -timidina que foi medida por contagem de cintilação β em desintegrações por minuto (cpm). A incorporação foi expressa em cpm/grupo de tratamento.

As amostras analisadas foram GEL-NCBHT, GEL-NCBr, GEL-Br e GEL-LIVRE e Isotrex[®] e formaldeído (5 % v/v) como controle positivo. Cada amostra foi analisada em triplicata e os resultados apresentados como a média das três repetições.

4.2.6. Estudo de penetração cutânea em humanos por *tape stripping*

O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS, registro n° 2007844 (Anexo 3).

Os voluntários foram escolhidos após seleção conforme critérios de inclusão como não apresentar irritação, alergia ou patologia cutânea na área em estudo (antebraço), não estar fazendo uso de qualquer tipo de produto cosmético nos antebraços 1 dia antes do início do teste (ALBERTI *et al*, 2001), e também não estar fazendo uso de complexos vitamínicos contendo vitamina A.

Cada voluntário recebeu um termo de consentimento e foi esclarecido sobre o estudo pela mestranda. Somente foram incluídos no estudo os voluntários que aceitaram participar, após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 4). Também foi enfatizado aos voluntários de que poderiam desistir do protocolo quando julgassem conveniente.

Participaram do estudo 23 voluntários. Os géis estudados ficaram em contato com a pele dos voluntários por tempos pré-determinados de 15 min ($n = 3$), 1 h ($n = 6$), 3 h ($n = 9$) e 6 h ($n = 5$).

4.2.6.1 Protocolo experimental

No estudo de penetração cutânea em humanos através da técnica de *tape stripping* foram testados dois géis: GEL-NCBHT e GEL-LIVRE, o primeiro contendo a isotretinoína encapsulada e o segundo, contendo na sua forma livre. Em cada voluntário foram aplicados os dois produtos nos dois antebraços.

No dia do experimento, as seguintes etapas foram realizadas:

- Limpeza com água e sabão neutro dos antebraços de cada voluntário, secagem com papel toalha e repouso em ambiente climatizado (temperatura de $21^{\circ}\text{C} \pm 2$) durante 30 min antes da aplicação dos produtos;
- Demarcação, com fita crepe (Eurocel[®], Sicad, 25 mm), de duas regiões em cada antebraço, com áreas de 16 cm^2 cada ($4 \times 4\text{ cm}$), totalizando 4 regiões de aplicação em cada voluntário. Cada produto foi aplicado nos dois antebraços em regiões previamente estabelecidas como mostrado na Figura 5, sendo que na região 1 foi aplicado o GEL-NCBHT, na região 2 o GEL-LIVRE, região 3 o GEL-LIVRE e região 4 o GEL-NCBHT. Neste momento os antebraços dos voluntários foram fotografados.

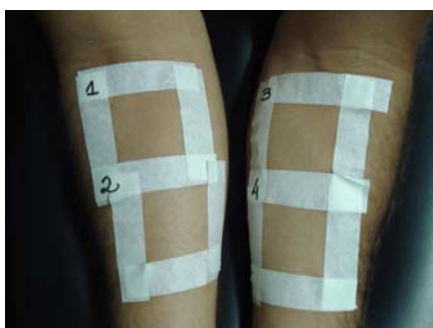


Figura 5. Representação das regiões de aplicação nos antebraços de um voluntário.

- Em cada região demarcada foi aplicada uma dose de aproximadamente 64 mg de cada produto a ser testado correspondendo, portanto, a uma quantidade de aproximadamente 4 mg produto/cm² (32 µg de isotretinoína livre ou nanoencapsulada).
- Os produtos foram aplicados com auxílio de espátulas de polipropileno que, após aplicação, foram colocadas em tubos com acetonitrila para posterior doseamento.
- Os produtos em estudo ficaram em contato com a pele dos voluntários por tempos pré-determinados de 15 min a 6 h. Durante esse período os voluntários permaneceram em sala climatizada e isenta de iluminação natural, devido à foto-instabilidade do fármaco.
- Finalizado o tempo de contato, foram feitas as remoções do estrato córneo com as fitas adesivas (Scotch[®], 3M, 45 mm), cortadas em tamanhos de aproximadamente 5 x 5 cm, totalizando 14 remoções de cada local de aplicação. Antes da remoção, foi feita pressão sobre a pele abaixo de cada fita, com auxílio de uma espátula (10 compressões com força constante). Todos os procedimentos foram conduzidos pela mestrandia, para padronização do protocolo. No final da remoção das 14 fitas, os antebraços dos voluntários foram fotografados novamente.
- Realizou-se um *tape stripping* do antebraço de cada voluntário, em região que não recebeu o produto, para confirmar a especificidade do método analítico para quantificação do fármaco (amostra branco).
- Depois de encerrado o experimento, as demarcações de fita crepe foram retiradas, a pele foi limpa com água e o voluntário instruído a não aplicar produtos tópicos (perfumes, cosméticos ou medicamentos) no local por um período de 24 horas. Neste momento, cada antebraço foi fotografado pela terceira vez.

4.2.6.2. Quantificação da isotretinoína nas fitas adesivas

A quantificação da isotretinoína nesta etapa do estudo foi realizada por CLAE, utilizando sistema Waters[®] conforme descrito no Anexo 2. A determinação do teor de

isotretinoína de cada gel foi realizada no dia de cada experimento, conforme descrito em 4.2.4.2. Desse modo, foi possível ajustar a dose aplicada em cada indivíduo.

A primeira fita foi quantificada separada das demais, pois foi considerado que o fármaco presente nessa está sobre a superfície da pele, não tendo sofrido retenção cutânea. Os adesivos provenientes das 13 remoções de estrato córneo seguintes foram colocados em tubos de ensaio de vidro âmbar, reunidos em grupos (fitas 2 e 3 – tubo 3, fitas 4 e 5 – tubo 4, fitas 6 a 8 – tubo 5, fitas 9 a 11 – tubo 6 e fitas 12 a 14 – tubo 7), conforme esquematizado na Figura 6. Após, adicionou-se 4 mL de acetonitrila em cada tudo (exceção do tubo 1 que recebeu 6 mL) para que ocorresse a dissolução/extração do fármaco. Separadamente, cada frasco contendo as fitas e o solvente foi submetido ao vórtex por 3 min e depois colocados em ultrassom por 30 min. As amostras contidas em cada tudo foram analisadas separadamente (7 análises por local de aplicação), para isto antes foram filtradas através de membrana hidrofílica (0,45 μm , Millipore®) e uma alíquota de 50 μL foi utilizada para quantificação da isotretinoína por CLAE.

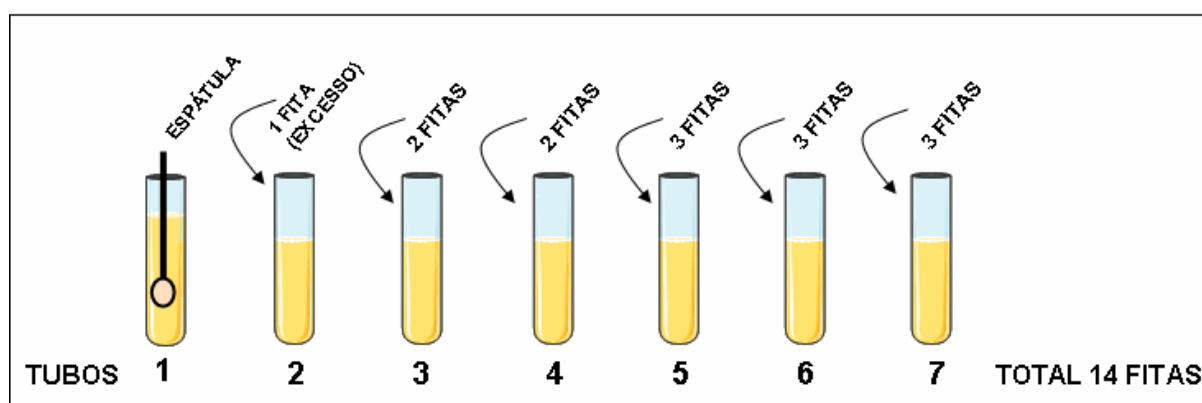


Figura 6. Esquema da organização das fitas utilizadas no *tape stripping* para quantificação da isotretinoína

4.2.7 Análise estatística

Os valores das medidas determinados para os diferentes estudos foram comparados estatisticamente utilizando-se a Análise da Variância (ANOVA),

considerando-se um nível de significância de 0,05. Os testes foram realizados no programa SigmaStat 3.5.

4.2.8 Descarte de resíduos químicos

O descarte de resíduos químicos seguiu procedimento padrão realizado pela Faculdade de Farmácia – UFRGS. Os resíduos gerados foram devidamente acondicionados em frascos apropriados, rotulados e entregues à Comissão de Saúde e Ambiente de Trabalho (COSAT) desta Faculdade, que é responsável pelo envio dos resíduos ao Instituto de Química da UFRGS, onde são realizados os procedimentos adequados de reciclagem e/ou descarte do material.

5. Resultados e Discussão

5.1 Caracterização das suspensões

As suspensões NC0,5, NC1,0, NC1,5, NC-BHT, NE e NE-BHT foram preparadas com sucesso seguindo a metodologia descrita no item 4.2.1. Todas as formulações obtidas apresentaram aspecto macroscopicamente homogêneo, com coloração leitosa branca (NC-Br) ou levemente amarelada para as nanopartículas contendo isotretinoína (NC0,5; NC1,0; NC1,5; NC-BHT, NE e NE-BHT) que neste caso ocorreu uma atenuação da coloração alaranjada do fármaco puro via nanoencapsulação. A Tabela 3 mostra as características físico-químicas das suspensões no dia de sua preparação.

Todas as formulações estudadas apresentaram diâmetros de partícula inferiores a 300 nm, resultados esses coerentes com os sistemas coloidais obtidos através da metodologia de precipitação interfacial de polímero pré-formado e emulsificação espontânea (POLETTO *et al.*, 2007; OURIQUE *et al.*, 2008; WEISS-ANGELI *et al.*, 2008). Diâmetros entre 100 e 500 nm e população monodispersa são características dos colóides obtidos pelo método de nanoprecipitação (FESSI *et al.*, 1989; COUVREUR *et al.*, 2002). OURIQUE e colaboradores (2008) prepararam nanocápsulas e nanoemulsão contendo tretinoína, que assim como a isotretinoína, pertence a primeira geração do grupo dos retinóides, na concentração de 0,5 mg/mL utilizando o mesmo núcleo oleoso (TCM) e PCL como polímero, obtendo partículas com diâmetro médio de 228 ± 8 nm e 210 ± 7 nm, respectivamente, semelhantes aos obtidos no presente trabalho.

Tabela 3. Características físico-químicas das suspensões após preparação (dia zero)

Suspensões	Diâmetro de Partícula (nm)	Índice de polidispersão	pH	Potencial Zeta (mV)	Concentração de isotretinoína (MG/mL)
NC0,5	285 ± 31	0,2 ± 0,0	5,4 ± 0,1	- 8,0 ± 0,1 ^{h,i}	0,53 ± 0,02
NC1,0	255 ± 18	0,2 ± 0,0	4,4 ± 0,5 ^d	-7,4 ± 0,2 ^{h,i}	1,03 ± 0,01
NC1,5	267 ± 26	0,2 ± 0,0	4,4 ± 0,1 ^d	-8,5 ± 0,4 ^{h,i}	1,44 ± 0,01
NC-BHT	231 ± 9 ^a	0,1 ± 0,0	6,3 ± 0,0 ^{d,e,f}	- 9,1 ± 1,9 ^{h,i,j}	0,48 ± 0,02
NE	225 ± 8 ^{a,b,c}	0,3 ± 0,0	6,0 ± 0,1 ^{e,f}	-12,7 ± 1,1 ^{h,i}	0,50 ± 0,01
NE-BHT	220 ± 10 ^{a,b,c}	0,3 ± 0,0	6,6 ± 0,3 ^{d,e,f,g}	- 4,5 ± 0,8	0,47 ± 0,05
NC-Br	227 ± 2 ^a	0,2 ± 0,0	6,3 ± 0,0 ^{d,e,f}	- 6,7 ± 0,2 ^h	-

Valores representam a média de 3 formulações ± desvio padrão; ^{a,b,c} diferenças significativas do diâmetro de partícula em relação a suspensão NC0,5 NC1,0 e NC1,5, respectivamente ($\alpha = 0,05$); ^{d,e,f,g} diferenças significativas do pH em relação a suspensão NC0,5, NC1,0, NC1,5 e NE, respectivamente ($\alpha = 0,05$); ^{h,i,j} diferenças significativas do potencial zeta em relação a suspensão NE-BHT, NC-Br, NE, respectivamente ($\alpha = 0,05$).

Os maiores tamanhos médios de partícula foram observados para as suspensões NC0,5, NC1,0 e NC1,5, as quais foram estatisticamente similares entre si (Tabela 3). Portanto, aumentando-se a concentração de isotretinoína, não ocorrem alterações nos tamanhos médios das partículas ($p < 0,05$). Também foi observada uma diferença significativa entre essas três suspensões quando comparadas com as suspensões preparadas sem o polímero, as nanoemulsões (NE e NE-BHT) que apresentaram diâmetros médios ligeiramente menores. Quando adicionado BHT às nanocápsulas (NC-BHT) estas obtiveram tamanhos médios estatisticamente menores que a formulação sem antioxidante (NC0,5), já para nanoemulsões não observou-se essa diferença.

Para todas as formulações os índices de polidispersão foram inferiores a 0,3 indicando uma adequada homogeneidade desses sistemas (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

Foram verificados valores de pH ácidos para todas as formulações. Valores mais ácidos foram observados para as suspensões com maior concentração de isotretinoína (NC1,0 e NC1,5), devido à acidez do fármaco (pH de uma suspensão de isotretinoína 0,2 % em água = 3,5). O pH da suspensão NC0,5 foi estatisticamente diferente de todas as outras formulações estudadas, com exceção da NE, que possui a mesma concentração de fármaco, diferenciando-se pela ausência do polímero. Este resultado indica que a adição do polímero não interferiu no pH das suspensões. Essa conclusão é reforçada analisando-se as duas formulações de NC e NC com BHT, as quais também foram estatisticamente iguais em relação aos valores de pH. Comparando-se as formulações contendo BHT (NC-BHT e NE-BHT) com as sem esse adjuvante (NC0,5 e NE), foi possível observar que o pH tornou-se menos ácido para formulações contendo antioxidante (pH de uma suspensão de BHT 0,2 % em água = 5,7). As diferenças de pH encontradas, com exceção do aumento de pH com o aumento da concentração de isotretinoína (NC0,5; NC1,0 e NC1,5), podem também ser devidas a água utilizada no preparo das formulações, que apresentou mudanças significativas no pH de um dia para outro. Como as formulações não foram todas preparadas no mesmo dia, as diferenças no pH podem estar atribuídas a mudança de pH da água.

De acordo com a literatura, suspensões de nanocápsulas e nanoemulsão contendo tretinoína na concentração de 0,5 mg/mL, preparadas com TCM e PCL também apresentaram valores ácidos de pH ($6,64 \pm 0,31$ e $6,48 \pm 0,01$ respectivamente), os quais também mostraram-se estatisticamente iguais, indicando que a presença de PCL não altera os valores de pH das suspensões (OURIQUE *et al.*, 2008).

Os valores do potencial zeta obtidos para todas as formulações após preparação foram negativos (entre $-4,5 \pm 0,8$ e $-12,7 \pm 1,1$ mV). A suspensão NE-BHT foi a que obteve menor valor em módulo de potencial zeta, diferenciando-se estatisticamente de todas outras suspensões com valores em módulo maiores. Segundo SCHAFFAZICH e colaboradores (2003), os polímeros, fosfolipídeos e poloxamers constituintes das nanopartículas são os principais componentes presentes nas formulações capazes de influenciar o potencial zeta. No presente trabalho, os valores negativos são decorrentes da presença de PCL e dos tensoativos Span 60[®] e Tween 80[®].

A taxa de recuperação da isotretinoína foi próxima a 100 % no primeiro dia após preparação para todas as suspensões estudadas (106 ± 4 % para NC0,5; 103 ± 1 % para NC1,0; $96 \pm 0,6$ % para NC1,5; 96 ± 4 % para NC-BHT; 100 ± 2 % para NE; 94 ± 10 % para NE-BHT).

5.2 Estabilidade das suspensões frente ao armazenamento

O controle da estabilidade das suspensões coloidais é importante na avaliação da viabilidade tecnológica das formulações, pois é capaz de fornecer informações sobre o prazo de validade das mesmas. No caso da isotretinoína, que é um fármaco altamente instável, a meia-vida de degradação depende das condições de armazenagem, particularmente temperatura, oxigênio e luz, o que torna a avaliação da estabilidade das formulações ainda mais relevante.

A estabilidade físico-química das suspensões acondicionadas em frascos âmbar foi investigada à temperatura ambiente após 1, 7, 15, 30 e 60 dias de sua

preparação, avaliando-se como parâmetros a concentração total de isotretinoína, o pH, o potencial zeta, o diâmetro médio de partícula e o índice de polidispersão. As formulações foram agitadas previamente a realização das análises.

Para verificar a influência da camada polimérica e do antioxidante no aumento da estabilidade das nanocápsulas contendo 0,5 mg/mL de isotretinoína, foram também preparadas as nanoemulsões, omitindo-se o polímero, com e sem BHT (NE e NE-BHT), com a mesma concentração de fármaco. Como o BHT foi adicionado na fase oleosa no momento da preparação, provavelmente ocorreu uma co-nanoencapsulação de BHT e isotretinoína. Em estudo realizado por WEISS-ANGELI e colaboradores (2008) utilizando OMC, fotoprotetor amplamente utilizado em formulações cosméticas, e a quercetina, flavonóide que apresenta acentuado efeito antioxidante, foi possível obter sistemas nanoestruturados muito mais estáveis quando ambos foram co-nanoencapsulados do que nanoencapsulando as substâncias isoladamente.

5.2.1 Determinação do pH

Informações relevantes sobre a estabilidade de suspensões nanoparticuladas podem ser obtidas mediante o monitoramento do pH, em função do tempo (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). A medida de pH é importante na avaliação da estabilidade de sistemas coloidais, pois alterações deste parâmetro podem estar relacionadas com a degradação do polímero, de algum outro componente da formulação ou até mesmo difusão da substância ativa da partícula para o meio aquoso (GUTERRES *et al.*, 1995). A Tabela 4 expressa os valores referentes ao pH medidos para as suspensões após a preparação, 1, 7, 15, 30 e 60 dias.

Após 60 dias, todas as formulações contendo isotretinoína apresentaram diminuição significativa do pH ($p < 0,05$) com exceção da NC1,0 que foi a única que manteve seu pH estável durante os dias de análise. No caso das formulações contendo PCL a diminuição pode ser decorrente da relaxação das cadeias poliméricas ocasionando uma exposição de um maior número de grupos carboxílicos terminais. O pH levemente ácido também poderia ocasionar a hidrólise

do poliéster, o que alteraria o pH das formulações (SCHAFFAZICK *et al.*, 2002). Nos casos das formulações sem fármaco (NC-Br) e sem polímero (NE e NE-BHT) as reduções dos valores de pH podem ser decorrentes da degradação parcial da isotretinoína, TCM e/ou dos tensoativos empregados. Entretanto, para todas as formulações o decaimento dos valores de pH mostrou-se coerente com os relatos da literatura (SCHAFFAZICK *et al.*, 2002) para o caso da nanoencapsulação de outros fármacos, empregando-se o mesmo método e polímero e ainda valores compatíveis com a aplicação cutânea.

Tabela 4. Valores de pH das suspensões nos 60 dias do estudo de estabilidade.

Suspensão	Dia zero	Dia 1	Dia 7	Dia 15	Dia 30	Dia 60
NC0,5	5,4 ± 0,1	5,7 ± 0,2	5,1 ± 0,0	4,5 ± 0,2*	4,1 ± 0,1*	4,1 ± 0,2*
NC1,0	4,4 ± 0,5	4,6 ± 0,6	4,5 ± 0,3	4,1 ± 0,2	4,1 ± 0,2	3,9 ± 0,1
NC1,5	4,4 ± 0,1	4,5 ± 0,2	4,5 ± 0,1	4,1 ± 0,1	4,0 ± 0,0*	3,8 ± 0,0*
NC-BHT	6,3 ± 0,0	6,3 ± 0,1	5,7 ± 0,1*	5,2 ± 0,1*	5,3 ± 0,1*	5,3 ± 0,1*
NE	6,0 ± 0,1	6,0 ± 0,2	5,7 ± 0,0	5,6 ± 0,0*	5,2 ± 0,1*	4,9 ± 0,2 *
NE-BHT	6,6 ± 0,3	6,5 ± 0,3	6,1 ± 0,1	6,0 ± 0,1*	5,7 ± 0,1*	5,4 ± 0,2*
NC-Br	6,3 ± 0,0	-	-	-	-	-

Valores representam a média de 3 formulações ± desvio padrão. *diferença significativa em relação ao dia zero ($\alpha = 0,05$).

5.2.2 Determinação do potencial zeta

O potencial zeta reflete o potencial elétrico da superfície das nanopartículas, sendo influenciado pela carga dos diferentes componentes da formulação. Em módulo, um valor de potencial zeta relativamente alto é importante para uma boa estabilidade físico-química da suspensão coloidal, pois grandes forças repulsivas tendem a evitar a agregação em função das colisões ocasionais de nanopartículas adjacentes (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). Segundo COUVREUR e colaboradores (2002), valores de potencial zeta próximos a 30 mV (positivo ou negativo) estão

relacionados a suspensões mais estáveis devido à repulsão entre as partículas, prevenindo sua agregação.

A Tabela 5 expressa os valores referentes ao potencial zeta medidos para as suspensões após a preparação, 1, 7, 15, 30 e 60 dias.

A suspensão NC-BHT foi a única que manteve os valores de potencial zeta estáveis durante os 60 dias de análise. Observou-se um aumento significativo desse parâmetro para as suspensões NC0,5, NC1,0 e NC1,5 nos dias 15 e 60, para NE no dia 15 e para NE-BHT a partir do dia 7, todos em relação ao dia zero. Este aumento pode estar relacionado à degradação parcial dos componentes das formulações, o que pode ser evitado pelo emprego simultâneo de BHT e PCL, como material de revestimento das nanogotículas de óleo.

Tabela 5. Potencial zeta (mV) das suspensões nos 60 dias do estudo de estabilidade.

Suspensão	Dia zero	Dia 1	Dia 7	Dia 15	Dia 30	Dia 60
NC0,5	-8,0 ± 0,1	-7,6 ± 0,9	-6,3 ± 0,3	-14,7 ± 0,1*	-8,9 ± 2,1	-18,1 ± 8,0*
NC1,0	-7,4 ± 0,2	-8,9 ± 1,9	-7,0 ± 0,4	-15,9 ± 1,7*	-8,7 ± 0,2	-20,3 ± 1,1*
NC1,5	-8,5 ± 0,4	-7,4 ± 0,4	-7,1 ± 0,8	-15,9 ± 0,2*	-10,2 ± 0,3	-18,1 ± 3,8*
NC-BHT	-9,1 ± 1,9	-7,3 ± 0,2	-5,8 ± 1,1	-6,1 ± 1,6	-7,3 ± 1,0	-9,4 ± 1,3
NE	-12,7 ± 1,1	-12,5 ± 3,7	-12,0 ± 0,8	-18,0 ± 3,2*	-13,6 ± 1,6	-11,3 ± 0,9
NE-BHT	-4,5 ± 0,8	-4,9 ± 0,2	-11,0 ± 0,4*	-8,1 ± 0,5*	-13,5 ± 1,4*	-7,3 ± 0,1*
NC-Br	-6,7 ± 0,2	-	-	-	-	-

Valores representam a média de 3 formulações ± desvio padrão.*diferença significativa em relação ao dia zero ($\alpha = 0,05$).

5.2.3 Determinação do diâmetro médio das partículas e índice de polidispersão

A Tabela 6 expressa os valores referentes ao diâmetro médio das partículas e a Tabela 7, os índices de polidispersão, avaliados para as suspensões após a preparação e até 60 dias do estudo de estabilidade.

Tabela 6. Diâmetro médio (nm) das suspensões nos 60 dias do estudo de estabilidade.

Suspensão	Dia zero	Dia 1	Dia 7	Dia 15	Dia 30	Dia 60
NC0,5	285 ± 31	291 ± 26	277 ± 6	300 ± 14	277 ± 18	251 ± 12
NC1,0	255 ± 18	282 ± 16	279 ± 12	273 ± 13	275 ± 10	304 ± 95
NC1,5	267 ± 26	275 ± 8	282 ± 12	291 ± 5	266 ± 5	247 ± 1
NC-BHT	231 ± 9	227 ± 12	231 ± 10	233 ± 11	264 ± 24	226 ± 11
NE	-	226 ± 8	222 ± 8	222 ± 10	228 ± 7	236 ± 14
NE-BHT	220 ± 10	239 ± 10*	238 ± 9*	223 ± 8	221 ± 11	222 ± 8
NC-Br	227 ± 2	-	-	-	-	-

Valores representam a média de 3 formulações ± desvio padrão. *diferença significativa em relação ao dia zero ($\alpha = 0,05$).

Tabela 7. Índice de polidispersão das suspensões nos 60 dias do estudo de estabilidade.

Suspensão	Dia zero	Dia 1	Dia 7	Dia 15	Dia 30	Dia 60
NC0,5	0,2 ± 0,02	0,2 ± 0,01	0,2 ± 0,03	0,2 ± 0,01	0,4 ± 0,16*	0,2 ± 0,02
NC1,0	0,2 ± 0,02	0,2 ± 0,01	0,2 ± 0,02	0,1 ± 0,01	0,2 ± 0,03	0,3 ± 0,12
NC1,5	0,2 ± 0,01	0,2 ± 0,03	0,2 ± 0,01	0,2 ± 0,01	0,2 ± 0,01	0,2 ± 0,00
NC-BHT	0,1 ± 0,02	0,2 ± 0,04	0,2 ± 0,03*	0,2 ± 0,02*	0,2 ± 0,03*	0,2 ± 0,04
NE	-	0,3 ± 0,04	0,3 ± 0,01	0,3 ± 0,04	0,2 ± 0,03*	0,3 ± 0,02
NE-BHT	0,3 ± 0,03	0,3 ± 0,02	0,3 ± 0,15	0,2 ± 0,02*	0,2 ± 0,02	0,2 ± 0,02
NC-Br	0,2 ± 0,03	-	-	-	-	-

Valores representam a média de 3 formulações ± desvio padrão. * diferença significativa em relação ao dia zero ($\alpha = 0,05$).

A investigação da variação do tamanho de partícula em função do tempo é uma propriedade importante que deve ser estudada em suspensões coloidais, pois mudanças nesse parâmetro podem indicar uma tendência à agregação e sedimentação (GUTERRES *et al.*, 1995; CALVO *et al.*, 1996). Vários estudos mostram que geralmente as nanopartículas, mesmo preparadas através de diferentes métodos, apresentam diâmetros médios entre 100 e 300 nm, coerentes aos obtidos no presente trabalho (SCHAFFAZICK *et al.*, 2002).

Durante os 60 dias de armazenamento, todas as suspensões mostraram-se estáveis em relação ao diâmetro médio das suas partículas e índice de polidispersão (todos menores de 0,3), a exceção da formulação NC0,5 no dia 30 do experimento (0,4).

5.2.4 Doseamento de isotretinoína nas formulações em função do tempo

O teor médio de isotretinoína presente nas nanopartículas foi próximo a 100 % para todas as formulações no momento de sua preparação (dia zero). Os valores

de concentrações totais de isotretinoína medidas em função do tempo de armazenamento encontram-se na Tabela 8.

A Figura 7 representa graficamente os resultados do teor de isotretinoína em porcentagem em função do tempo. Considerando as suspensões de nanocápsulas NC0,5, NC1,0 e NC1,5 houve uma redução de 45,1 %, 71,5 % e 76,3 % após 60 dias da preparação, respectivamente. Esses resultados evidenciam que, com o aumento da concentração de fármaco nas formulações, ocorre uma maior diminuição na sua concentração em função do tempo. O decaimento de teor mais acentuado para as formulações contendo concentrações mais elevadas de isotretinoína pode ser indício de que nestas formulações parte considerável do fármaco não se encontra no interior da partícula, estando livre na fase externa aquosa ou adsorvido as nanocápsulas e, portanto, mais susceptível a degradação. Para a NE houve uma diminuição de 41,7 % de isotretinoína após os 60 dias da preparação. No entanto, para as formulações de NC-BHT e NE-BHT, não foram observadas diferenças significativas nos percentuais de isotretinoína após 60 dias, as quais mantiveram o teor de fármaco em torno de 100 % durante o período de avaliação da estabilidade.

Tabela 8. Concentrações totais de isotretinoína (mg/mL) nas suspensões em função do tempo de armazenamento.

Suspensão	Dia zero	Dia 1	Dia 7	Dia 15	Dia 30	Dia 60
NC0,5	0,53 ± 0,02	0,52 ± 0,00	0,41 ± 0,02	0,40 ± 0,00*	0,36 ± 0,00*	0,29 ± 0,08*
NC1,0	1,03 ± 0,01	1,00 ± 0,03	0,76 ± 0,00*	0,69 ± 0,01*	0,50 ± 0,00*	0,29 ± 0,08*
NC1,5	1,44 ± 0,01	1,40 ± 0,02	1,04 ± 0,02*	0,90 ± 0,03*	0,62 ± 0,00*	0,34 ± 0,01*
NC-BHT	0,48 ± 0,02	0,48 ± 0,01	0,48 ± 0,02	0,47 ± 0,02	0,51 ± 0,02	0,56 ± 0,02*
NE	0,50 ± 0,01	0,42 ± 0,01*	0,37 ± 0,00*	0,39 ± 0,02*	0,37 ± 0,02*	0,29 ± 0,04*
NE-BHT	0,47 ± 0,05	0,47 ± 0,04	0,49 ± 0,03	0,46 ± 0,03	0,41 ± 0,03	0,46 ± 0,11

Valores representam a média de 3 formulações ± desvio padrão. *diferença significativa em relação ao dia zero ($\alpha = 0,05$).

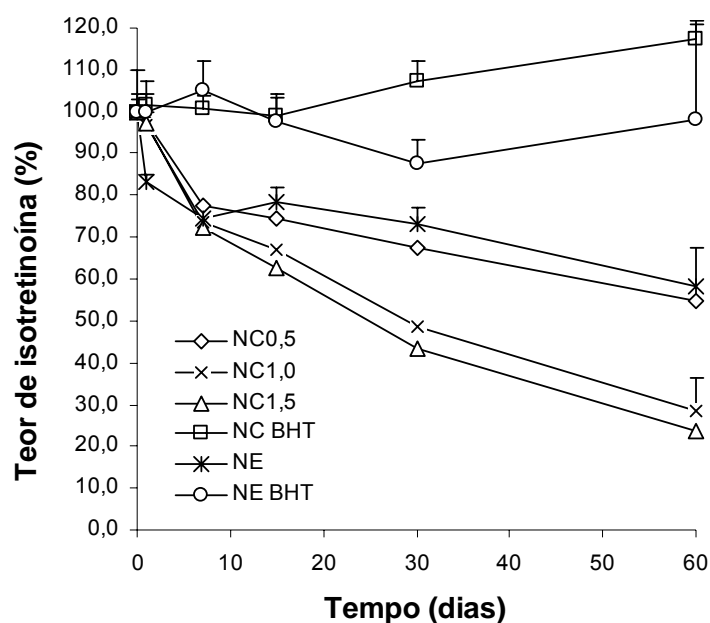


Figura 7. Representação gráfica das percentagens de isotretinoína nas suspensões em função do tempo de armazenamento. Valores determinados em relação ao dia zero (n = 3/formulação).

Para as formulações NC0,5, NC1,0, NC1,5 e NE houve uma diminuição significativa ($p < 0,05$) da concentração total de isotretinoína após 7 dias da preparação; ao contrário da formulação NC0,5 que manteve-se estável após 15 dias. Devido ao fato de que menores concentrações de isotretinoína obtiveram melhores resultados de estabilidade em relação à quantidade de fármaco em função do tempo, a menor concentração (0,5 mg/mL) foi a escolhida para ser analisada frente ao uso de antioxidante e a ausência da parede polimérica.

A acentuada diminuição do teor de isotretinoína nas formulações sem BHT, em função do tempo, pode ser atribuída à degradação do fármaco em presença de oxigênio e temperatura ambiente (LIMA *et al.*, 2005), uma vez que as suspensões foram mantidas em recipiente com presença de oxigênio e em armários sem temperatura controlada. O uso de vidraria âmbar impediu a possível degradação da isotretinoína frente à luz.

De acordo com GUTERRES e colaboradores (1995), pode ocorrer uma diminuição no teor de fármaco em formulações de nanopartículas, em função do

tempo, devido à formação de nanocristais de fármaco durante a formação das nanoestruturas, os quais ficariam estabilizados pelo tensoativo hidrofílico. Estes nanocristais, com o tempo, tenderiam a crescer e a precipitar, tornando o sistema heterogêneo para a amostragem, fato que conduziria à redução no teor de fármaco nas formulações. Esta hipótese, no entanto, não parece explicar os resultados obtidos, uma vez que as suspensões contendo antioxidante se mantiveram estáveis durante todo o período de armazenamento, indicando que a degradação da isotretinoína deve-se principalmente ao seu contato com oxigênio e temperatura. A redução quantitativa do fármaco foi acompanhada do surgimento de pico de produto de degradação da isotretinoína, o que pode ser confirmado através da análise dos cromatogramas das formulações NC0,5, NC1,0 e NC1,5 mg/mL após 60 dias de estabilidade (Figura 8).

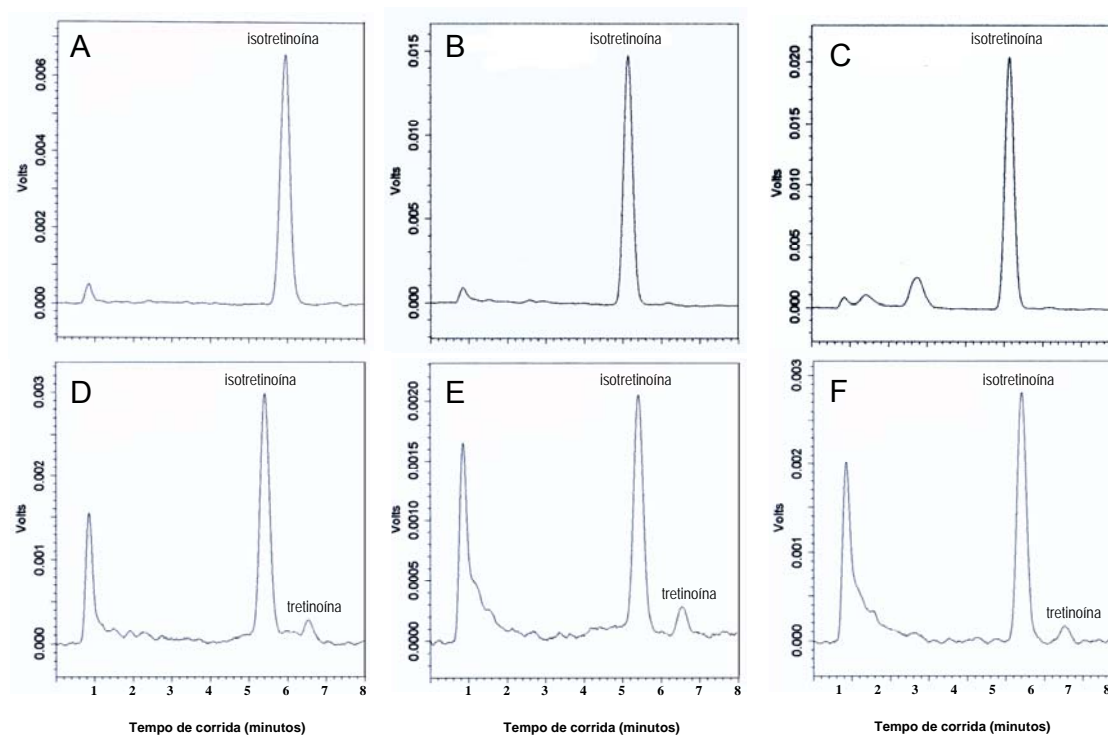


Figura 8. Cromatogramas das suspensões NC0,5, NC1,0 e NC1,5 mg/mL nos dias zero (A, B e C, respectivamente) e dia 60 (D, E e F, respectivamente).

Foi possível observar que a formulação NE, a qual não contém PCL nem BHT, em apenas 1 dia de armazenamento já apresentou uma diminuição significativa no teor, pois uma quantidade de aproximadamente 16 % de isotretinoína foi degradada em 1 dia, quando comparada com todas as outras formulações que não tiveram perdas significativas de fármaco no mesmo período. Isso mostra que o polímero utilizado nas nanocápsulas também tem uma importante contribuição frente à estabilidade, assim como a utilização de BHT.

5.2.5 Análise morfológica e taxa de associação

A análise morfológica da suspensão de nanocápsulas 0,5 mg/mL contendo BHT (NC-BHT) foi realizada por MET com aumentos de 12.000 a 100.000 vezes (Figura 9).

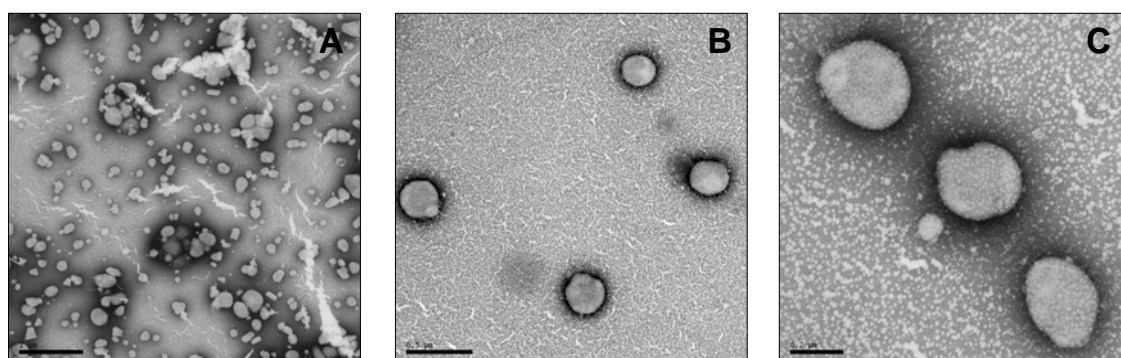


Figura 9. Fotomicrografias obtidas por MET da suspensão NC-BHT em diferentes aumentos (A) 12.000x, (B) 40.000x e (C) 100.000x.

Analisando as fotomicrografias da suspensão NC-BHT é possível observar estruturas esféricas com vesículas bem delimitadas as quais demonstram que os diâmetros das nanocápsulas estão de acordo com as análises realizadas por espectroscopia de correlação de fótons ($231 \pm 9,4$ nm).

A taxa de associação para a mesma suspensão (NC-BHT) foi próxima a 100 % no tempo zero. Este resultado era esperado, uma vez que a taxa de associação

está relacionada com a solubilidade do fármaco no óleo (FRESTA *et al.*, 1996), ou seja, com a lipofilia da substância, e a isotretinoína apresenta um alto valor de log P (Log P = 6,8) (NANKERVIS *et al.*, 1996).

5.2.6 Análise em Turbiscan LAb[®]

O aparelho Turbiscan LAb[®] é um analisador óptico que vem sendo empregado com sucesso em estudos de estabilidade de emulsões e dispersões coloidais concentradas. A principal vantagem apresentada por este equipamento é a detecção de possíveis fenômenos de instabilidade muito antes de esses serem detectados por observação visual do analista, especialmente no caso de sistemas opacos e concentrados. Nesses casos, a desestabilização pode ocorrer seguida de processos irreversíveis como coalescência (variação no tamanho de partícula) e floculação (agregação de partículas), ou seguida de processos reversíveis como cremagem e sedimentação. Em sistemas opacos as desestabilizações serão visualizadas através de alterações no retroespalhamento de luz (*backscattering*) e em sistemas translúcidos será visualizado através de alterações nas medidas de transmissão da luz (LEMARCHAND *et al.*, 2003; MENGUAL *et al.*, 1999).

Na Figura 10 são apresentados os gráficos resultantes das análises de transmissão e retroespalhamento de luz das suspensões NC, NC-BHT, NE e NE-BHT utilizando o Turbiscan LAb[®], sob condições analíticas descritas no item 4.2.2.7.

Observando os gráficos verifica-se que os valores de variação do sinal de transmissão (T) são inferiores a 0,2 % e segundo o manual do equipamento, quando este resultado é obtido, somente os gráficos de *backscattering* (BS) podem ser analisados separadamente. Sendo assim, somente os sinais de BS foram avaliados (LEMARCHAND *et al.*, 2003; MENGUAL *et al.*, 1999).

Em cada gráfico, a parte esquerda refere-se à base da cubeta de análise e a direita ao topo da mesma, os fenômenos de instabilidade são demonstrados na base, no topo, ou no centro da cubeta, observando-se o aumento ou a diminuição do sinal de *backscattering* (BS).

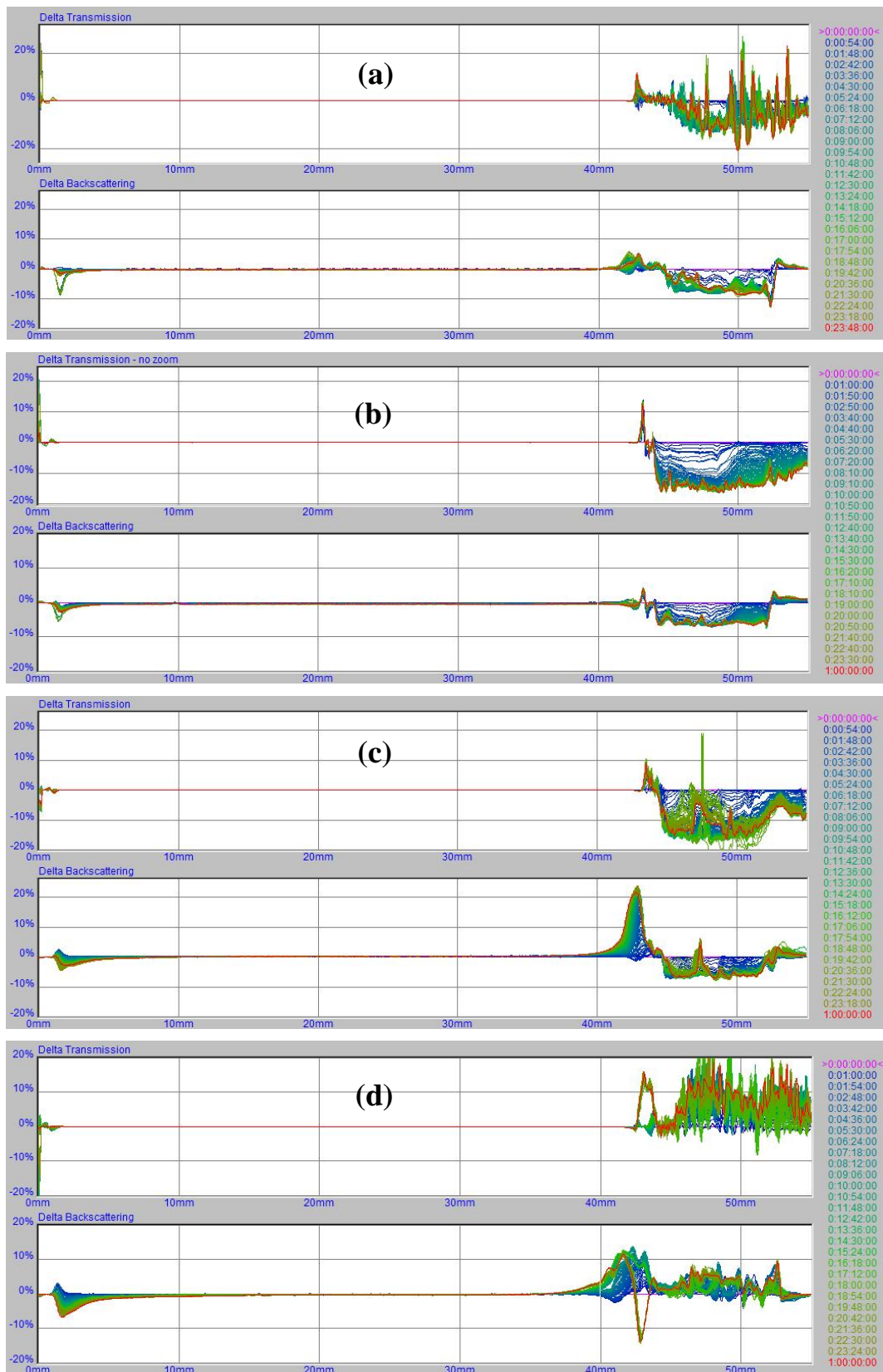


Figura 10. Gráficos de transmissão (T) e *backscattering* (BS) (%) das suspensões NC, NC-BHT, NE e NE-BHT (a, b, c e d, respectivamente) durante período de 24 h à 25°C.

As formulações NC (Figura 10-a) e NC-BHT (Figura 10-b) apresentaram valores de *backscattering* (BS) inferiores a 5 %, tanto na base, no topo como no início da cubeta, esses resultados são considerados negligenciáveis indicando não haver fenômenos de instabilidade significativos para estas duas formulações frente as condições estudadas. A formulação NE (Figura 10-c) apresentou tendência à desestabilização que pode ser observada através da análise do sinal de *backscattering* na base da cubeta (cerca de 5 %) e no topo (cerca de 20 %), indicando uma tendência a cremagem das partículas. Esta tendência também foi observada para a formulação NE-BHT (Figura 10-d).

5.3 Estabilidade das suspensões frente à luz UVA

A avaliação da estabilidade das suspensões de nanopartículas contendo isotretinoína foi realizada frente à luz UVA para as formulações NC, NC-BHT, NE, NE-BHT e LIVRE. As medidas da intensidade da luz UVA emitida foram realizadas com o auxílio de radiômetro no início, meio e fim do experimento. Os resultados foram de 1,20; 1,18 e 1,19 mW/cm², respectivamente.

Os perfis de fotodegradação da isotretinoína em função do tempo encontram-se apresentados na Figura 11, assim como suas concentrações em porcentagens estão apresentados na Tabela 9.

Na Figura 11 é possível observar uma queda da concentração de isotretinoína em função do tempo para todas as formulações estudadas frente à exposição à luz UVA. Como outros retinóides, a cadeia alquila da isotretinoína é propensa à isomerização quando exposta a luz (YAP *et al.*, 2005).

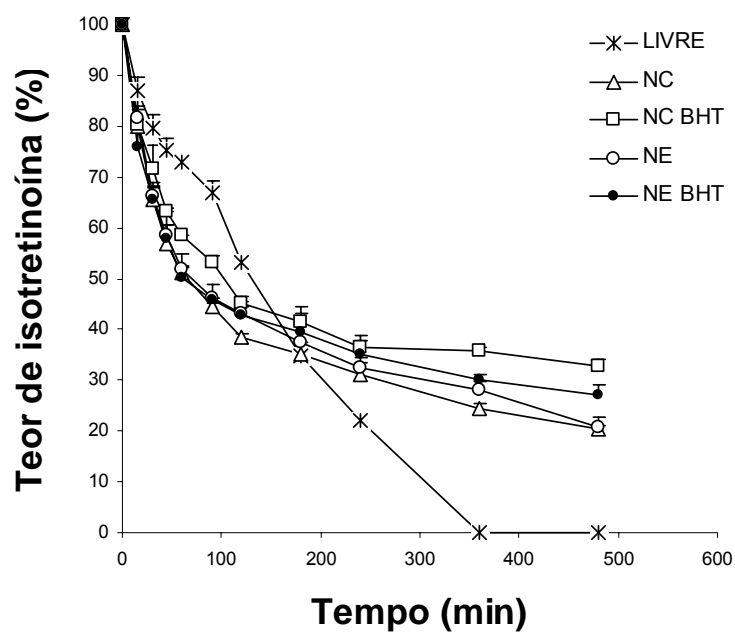


Figura 11. Conteúdo de isotretinoína em função do tempo para as formulações de nanopartículas estudadas frente à irradiação com luz UVA. ($n = 3$ /formulação). Intensidade da luz de $1,19 \pm 1 \text{ mW/cm}^2$.

Tabela 9. Concentrações percentuais de isotretinoína em função do tempo em percentagens após irradiação à luz UVA.

Tempo (min)	NC-BHT	NC	NE-BHT	NE	LIVRE
Zero	100	100	100	100	100
15	87,2 ± 3,2	79,9 ± 5,3	76,01 ± 5,2	81,5 ± 2,3	87,1 ± 2,7
30	71,6 ± 4,5	65,5 ± 3,4 ^a	65,40 ± 2,9 ^a	66,1 ± 1,6 ^a	79,6 ± 2,5
45	63,2 ± 0,5 ^a	57,0 ± 3,5 ^a	57,9 ± 5,5 ^a	58,5 ± 2,1 ^a	75,3 ± 2,2
60	58,4 ± 0,3 ^a	51,2 ± 1,5 ^{a,b}	50,2 ± 1,8 ^{a,b}	51,7 ± 3,1 ^{a,b}	72,8 ± 0,2
90	53,2 ± 1,3 ^a	44,5 ± 0,8 ^{a,b}	45,7 ± 0,4 ^{a,b}	46,3 ± 2,6 ^{a,b}	66,8 ± 2,5
120	45,2 ± 1,2 ^a	38,6 ± 0,6 ^{a,b}	42,9 ± 2,6 ^a	43,2 ± 1,3 ^a	53,2 ± 0,8
180	41,4 ± 3,0	34,9 ± 0,4 ^b	39,6 ± 3,5	37,5 ± 0,1	34,7 ± 0,7 ^b
240	36,6 ± 2,2 ^a	31,1 ± 2,4 ^a	35,3 ± 2,4 ^a	32,3 ± 2,0 ^a	22,0 ± 1,3
360	35,8 ± 0,5 ^a	24,3 ± 1,3 ^{a,b,c}	30,2 ± 1,0 ^{a,b}	28,2 ± 1,6 ^{a,b,c}	0
480	32,6 ± 1,4 ^a	20,3 ± 0,7 ^{a,b,c}	27,1 ± 1,8 ^{a,b}	20,8 ± 2,0 ^{a,b,c}	0

Valores representam a média de 3 formulações ± desvio padrão. ^adiferença significativa em relação a suspensão LIVRE ($\alpha = 0,05$). ^bdiferença significativa em relação a suspensão NC-BHT ($\alpha = 0,05$). ^cdiferença significativa em relação a suspensão NE-BHT ($\alpha = 0,05$).

Após 15 minutos de exposição à luz UVA, cerca de 18 % do conteúdo de fármaco degradou para todas as formulações. Desse momento em diante, o perfil de fotodegradação das formulações começou a se comportar de modo significativamente diferente.

Após 8 horas de exposição à luz UVA as concentrações encontradas para as formulações NC, NC-BHT, NE, NE-BHT e LIVRE foram, respectivamente, de 20,3 ± 0,7 %, 32,6 ± 1,4 %, 20,8 ± 2,1 %, 27,1 ± 1,8 % e zero.

A formulação LIVRE diferenciou-se significativamente de todas as outras durante os primeiros 120 min de exposição à luz UVA, mostrando um teor maior de isotretinoína. Após esse tempo, o conteúdo de fármaco decaiu rapidamente e essa

formulação passou a apresentar teor de isotretinoína menor do que as suspensões nanoparticuladas.

A coloração da formulação LIVRE, que era alaranjada no início no experimento, esmaeceu a partir de 90 min de exposição à luz. Em 240 min a suspensão apresentava-se amarelo claro e, após esse tempo, não foi mais possível observar coloração amarela na formulação, o que pode ser explicado pelo teor de isotretinoína que, a partir do tempo de 360 min, passou a ser insignificante, não sendo mais possível detectar o fármaco com o método analítico empregado.

A maior instabilidade observada para a formulação LIVRE pode ser explicada pelo contato direto da isotretinoína com a água, já que a isotretinoína degrada em contato com oxigênio, e a água contém aproximadamente 30 vezes mais oxigênio que uma solução etanólica, por exemplo (STIEFEL, 1997).

Para as formulações contendo nanopartículas de isotretinoína, não foi possível observar mudanças significativas na coloração a olho nu. A formulação NC-BHT, a partir dos 60 min de exposição à luz UVA, já mostrou sua capacidade de proteger a isotretinoína da fotodegradação. Essa diferença de comportamento foi observada até o final do experimento, sendo a proteção mais eficiente que a observada para as outras formulações (Figura 11).

A partir de 360 min até o final do experimento, foi possível observar uma diferença significativa das duas formulações contendo BHT (NC-BHT e NE-BHT) em relação às demais estudadas, sendo que a NC-BHT diferenciou-se significativamente de todas outras e a NE-BHT diferenciou-se de todas, exceto da NC-BHT. Isso mostra a capacidade da nanocápsula em proteger a isotretinoína, que protegeu o fármaco da degradação além da proteção garantida pelo antioxidante.

Na Figura 12 é possível visualizar os cromatogramas das formulações LIVRE, NC-BHT, NC, NE-BHT e NE após 8 horas de exposição à luz UVA. Observa-se o aparecimento de um pico de degradação logo após o pico da isotretinoína, pico este equivalente a tretinoína, principal produto de degradação quando da exposição à luz (MAIO *et al.*, 2003; TASHTOUSH *et al.*, 2008). Além disso, é possível observar que para a formulação LIVRE não foi possível detectar pico no tempo de retenção da

isotretinoína após 8 horas de exposição à luz, indicando que neste momento totalidade do fármaco foi degradada.

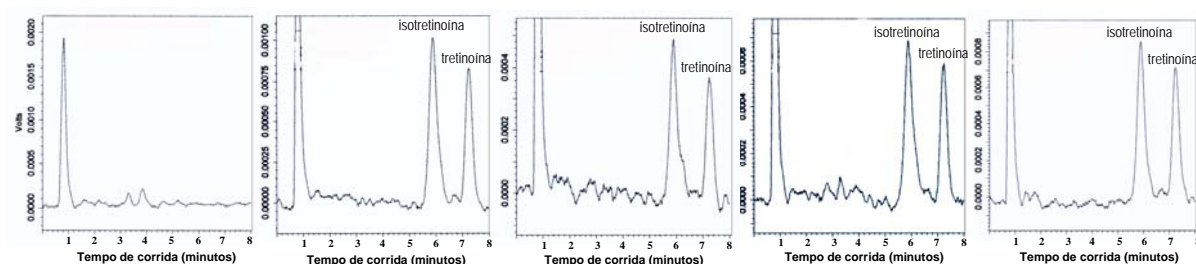


Figura 12. Cromatogramas após 8 horas de exposição à luz UVA das formulações LIVRE (esquerda), NC-BHT, NC, NE-BHT e NE, respectivamente.

Os perfis de fotodegradação da isotretinoína foram modelados conforme descrito em 4.2.3 e os resultados encontram-se nas Tabelas 10 e 11. A formulação LIVRE foi adequadamente descrita pelo modelo monoexponencial de primeira ordem enquanto as formulações nanoencapsuladas foram melhor descritas pelo modelo de primeira ordem biexponencial.

Tabela 10. Modelagem cinética dos perfis de fotodegradação da formulação LIVRE assumindo cinética mono-exponencial.

Formulação	$T_{1/2}$ (min)	k (min^{-1})	MSC	R
LIVRE	$122,3 \pm 4,1$	0,0057	3,11 a 3,82	0,985 a 0,992

Valores representam a média de 3 formulações \pm desvio padrão.

Tabela 11. Modelagem cinética dos perfis de fotodegradação das formulações NC, NC-BHT, NE e NE-BHT assumindo cinética biexponencial.

Formulação	A (%)	B (%)	α (min ⁻¹)	β (min ⁻¹)	$t_{1/2,\alpha}$ (min)	$t_{1/2,\beta}$ (min)	MSC	r
NC	52,3 ± 3,1	48,0 ± 2,0	0,032 ± 0,01	0,0018 ± 0,0002	22,27 ± 4,53	381,87 ± 46,16	5,04 a 5,55	0,999 a 0,999
NC-BHT	51,7 ± 0,3	46,6 ± 1,5	0,022 ± 0,0009	0,0008 ± 0,0001	30,87 ± 1,21	894,50 ± 68,42	3,31 a 4,99	0,991 a 0,998
NE	49,1 ± 2,9	51,5 ± 3,3	0,033 ± 0,0027	0,0018 ± 0,0003	20,82 ± 1,62	391,47 ± 69,92	4,40 a 4,86	0,997 a 0,998
NE-BHT	50,8 ± 3,7	48,6 ± 3,9	0,037 ± 0,012	0,0013 ± 0,0002	20,48 ± 7,02	560,64 ± 90,55	4,28 a 4,69	0,997 a 0,998

Valores representam a média de 3 formulações ± desvio padrão.

Através das Tabelas 10 e 11 é possível observar que todas as formulações nanoparticuladas mostraram-se melhores em relação à LIVRE quanto ao efeito fotoestabilizador. Quando livre, a isotretinoína mostrou valor de tempo de meia-vida inferior ($122,3 \pm 4,1$ min) ao das formulações nanoparticuladas ($381,87 \pm 46,16$ min a $894,50 \pm 68,42$ min).

Em uma modelagem biexponencial de perfil de degradação a partir de nanopartículas, o primeiro termo da equação representa a fase de liberação rápida do fármaco, também conhecida como *burst*. Durante essa fase, a isotretinoína que foi degradada encontrava-se adsorvida à parede polimérica. O segundo termo da equação corresponde à fase sustentada, que representa a fase de liberação lenta e descreve a degradação da isotretinoína que se encontra (dissolvida) encapsulada no núcleo oleoso. Portanto, através desse experimento, foi possível concluir que a isotretinoína não se encontra inteiramente no interior das nanopartículas, sendo que parte do fármaco se encontra adsorvido à superfície externa das nanopartículas. Baseado nos valores de A e B obtidos para todas as formulações (NC, NC-BHT, NE, NE-BHT) pode-se concluir que aproximadamente 50 % da isotretinoína esteja no interior das nanopartículas e a outra metade adsorvida ou na interfase óleo/água, no caso das nanoemulsões.

Avaliando o $t_{1/2}$ da fase de degradação mais lenta (β) pode se observar que a co-encapsulação com BHT aumentou significativamente o tempo de meia-vida de degradação da isotretinoína em relação as outras formulações. Isso também é observado quando avalia-se o $t_{1/2}$ da fase de degradação rápida (α), que também foi maior para a NC-BHT.

Como observado na Tabela 11, a NE-BHT apresentou um potencial de melhorar a fotoestabilidade da isotretinoína. No entanto, essa melhora foi menos pronunciada que a observada para a NC-BHT, tanto para o $t_{1/2}$ α quanto para o β . A estabilidade da isotretinoína provavelmente foi aumentada devido a dois mecanismos de proteção: a capacidade antioxidante do BHT e a capacidade da nanocápsula e da nanoemulsão de agirem como um fotoprotetor, espalhando a luz, conforme descrito por WEISS-ANGELI e colaboradores (2008) para o metoxicinamato de octila.

Em resumo, todas as formulações nanoparticuladas foram capazes de proteger a isotretinoína e diminuir sua degradação em suspensões aquosas. Além disso, a presença de BHT melhorou a estabilidade do fármaco e seu uso simultâneo com PCL mostrou os melhores resultados.

5.4. Preparação dos géis hidrofílicos contendo nanopartículas

A hidroxietilcelulose (Natrosol®) é comumente utilizada na composição de diversas formas farmacêuticas como agente suspensor, estabilizante ou agente de consistência para emulsões e formador de gel não-iônico, comportando-se como fluido não-newtoniano com perfil reológico de caráter pseudoplástico. Dentre as suas propriedades físico-químicas destacam-se a estabilidade em uma ampla faixa de pH (a viscosidade sofre pequenas alterações entre pH 2-12), a compatibilidade com substâncias aniônicas, não-iônicas, anfotéricas e catiônicas, a possibilidade de obtenção do gel tanto a frio quanto a quente e não necessidade de utilização de neutralizantes (BRAUN e ROSEN, 2000).

As características citadas acima foram determinantes para a escolha da hidroxietilcelulose como base para a incorporação das suspensões, devido à isotretinoína sofrer degradação em temperaturas elevadas, o que torna a possibilidade de preparação a frio de extrema importância. A característica hidrofílica da hidroxietilcelulose também foi determinante para sua escolha, devido à maior facilidade de formulações de caráter lipofílico (como é o caso de nanocápsulas e nanoemulsão), quando incorporadas em bases hidrofílicas, difundirem-se a partir do veículo, tornando-se disponíveis para permear as camadas da pele. O caráter não-iônico das formulações à base de hidroxietilcelulose também contribui para a escolha deste polímero, pois a possibilidade de incompatibilidade com a isotretinoína (caráter ácido) é minimizada.

5.4.1 Determinação do pH e doseamento

Na Tabela 12 encontram-se os valores de pH dos hidrogéis analisados após a preparação.

Tabela 12. Valores de pH dos géis GEL-NCBHT e GEL-LIVRE após preparação (dia zero)

Géis	pH
GEL-NCBHT	6,6 ± 0,0
GEL-LIVRE	6,6 ± 0,1

Valores representam a média de 3 formulações
± desvio padrão.

Os hidrogéis apresentaram valores de pH semelhantes, indicando que a incorporação da suspensão NC-BHT não provocou alteração em relação ao pH do hidrogel contendo isotretinoína na forma livre. Uma vez que o pH da pele varia de 4,0 a 7,0, estes hidrogéis se mostram adequados para aplicação cutânea (BARATA, 2002).

O doseamento de isotretinoína nos géis, após preparação, mostrou teor de 95 % para o GEL-NCBHT e 95 % para o GEL-LIVRE, em relação à concentração nominal de 0,5 mg/mL de fármaco.

5.4.2 Avaliação das características reológicas dos hidrogéis

A reologia é tema de grande e crescente importância para as indústrias cosmética e farmacêutica, tendo em vista que a consistência e o espalhamento dos produtos devem ser reproduzidos de lote-a-lote, assegurando a qualidade tecnológica do produto acabado. Os géis hidrofílicos têm sido muito utilizados em produtos cosméticos e como bases dermatológicas, pois apresentam fácil espalhamento, não são gordurosos e podem veicular fármacos variados (CORRÊA *et al.*, 2005).

Os fluídos não-newtonianos (não descritos pela lei de Newton) são sistemas complexos. Os líquidos complexos e preparações semi-sólidas apresentam comportamento não-newtoniano, o qual é caracterizado por variações da viscosidade aparente em função da velocidade de cisalhamento aplicada à amostra. O modelo matemático mais simples para exprimir o comportamento dos fluidos não-newtonianos é a lei da potência (Equação 3). Esses sistemas podem ser classificados quanto ao tipo de escoamento em reofluidificantes, quando $n < 1$ (pseudoplástico) ou reofluidificantes com valor de cedência (plásticos) e reoespessantes (dilatantes), quando $n > 1$ (MARTIN *et al.*, 1993; ALMEIDA e BAHIA, 2003; ALVES, 2007).

O comportamento reológico de um sistema e a viscosimetria têm sido estudados com o objetivo de caracterizar e avaliar a estabilidade físico-química dos produtos diante dos efeitos causados pelo tempo, pela temperatura ou mesmo pela incorporação de substâncias ativas e de carreadores de substâncias, como é o caso dos sistemas nanoparticulados (MILÃO, 2003; ALVES, 2007). Uma forma de quantificar a reologia dos fluídos é a medição da tensão de cisalhamento em função da taxa de cisalhamento, que pode ser representada por um reograma através da relação tensão *versus* taxa de cisalhamento (WILKINSON e MOORE, 1990; ALVES, 2007).

O comportamento reológico é determinado pelo maior coeficiente de regressão obtido da equação linear para o modelo matemático. Neste trabalho, foram realizadas as análises reológicas das amostras GEL-NCBHT, GEL-NCBr, GEL-Br e GEL-LIVRE, e os resultados de taxas de cisalhamento e tensões de cisalhamento foram plotados (Figura 13) e tratados de acordo com a Equação 3 ou modelo de Oswald. Na Tabela 13 estão descritos os valores dos coeficientes de regressão linear e os parâmetros característicos do modelo de Ostwald.

Analisando os reogramas e seus respectivos valores de coeficientes de regressão obtidos para as equações lineares, observa-se que as bases semi-sólidas, contendo diferentes formulações estiveram de acordo com o modelo descrito por Ostwald.

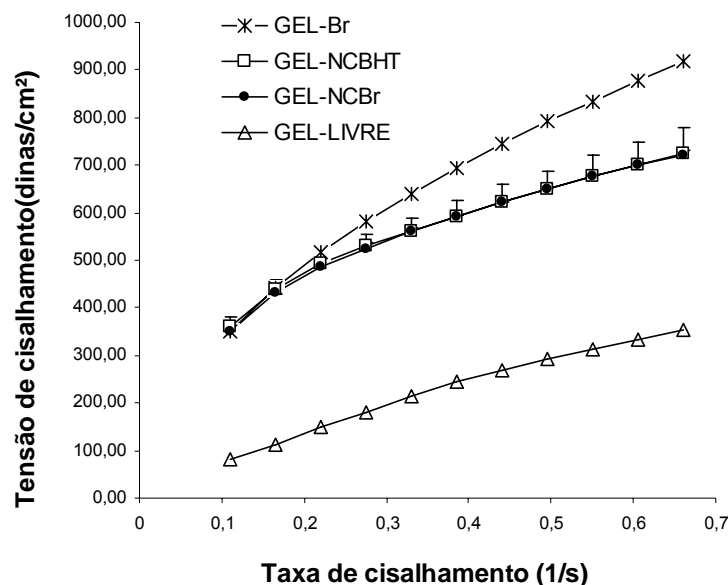


Figura 13. Perfis reológicos dos hidrogéis GEL-Br, GEL-NCBHT, GEL-NCBr e GEL-LIVRE descritos conforme modelo de Ostwald.

Tabela 13. Valores dos coeficientes de regressão linear (R^2), índices de escoamento (n) e de consistência (K) dos géis obtidos a partir de seus perfis reológicos.

Géis	R^2	N	$K (Pa.s^n)$
GEL-Br	$0,9994 \pm 0,0007$	$0,53 \pm 0,00$	$28,64 \pm 0,54$
GEL-NCBHT	$0,9916 \pm 0,0128$	$0,37 \pm 0,03$	$34,15 \pm 1,93$
GEL-NCBr	$0,9940 \pm 0,0057$	$0,39 \pm 0,03$	$33,21 \pm 2,13$
GEL-LIVRE	$0,9968 \pm 0,0010$	$1,21 \pm 0,03$	$4,01 \pm 0,65$

Valores representam a média de 3 géis \pm desvio padrão.

* diferença significativa em relação ao tempo zero ($\alpha = 0,05$).

Os índices de consistência (K) não apresentaram diferenças significativas com a adição das nanocápsulas aos géis, indicando, portanto, que a adição das suspensões de nanocápsulas em completa substituição à água no preparo dos hidrogéis não modificou o comportamento pseudoplástico originalmente observado para os géis de hidroxietilcelulose. Por outro lado, quando a formulação contendo a isotretinoína livre (LIVRE) foi adicionada ao gel (GEL-LIVRE), o gel resultando

comportou-se de maneira diferente. Este resultado é evidenciado pela comparação dos valores de índices de escoamento (n). Os géis GEL-Br, GEL-NCBHT e GEL-NCBr obtiveram valores menores que 1, diferentemente do GEL-LIVRE, com valor de índice de escoamento (n) maior do que 1, fazendo com que o GEL-LIVRE não seja considerado um fluido pseudoplástico e sim reoespessante (dilatante). Segundo ALMEIDA e BAHIA (2003), as preparações que apresentam comportamento dilatante são dispersões concentradas de partículas. Os espaços interpartículas são reduzidos e a quantidade de líquido presente é apenas a necessária para preenchê-los. Quando a suspensão é agitada, o volume dos espaços interpartículas aumenta e a quantidade de líquido se torna insuficiente para assegurar a lubrificação, resultando no aumento da resistência ao escoamento, ou seja, a viscosidade aumenta com a taxa de cisalhamento. As preparações com comportamento de acordo com fluidos pseudoplástico são caracterizadas pela diminuição da resistência do material ao escoamento com o aumento da velocidade de deformação.

5.4.3 Avaliação da alergenicidade das formulações géis

5.4.3.1 Teste de medida de edema de orelha (*mouse ear swelling test* - MEST)

O teste LLNA é utilizado como ensaio na detecção de resposta imunológica aguda, já o teste MEST detecta uma resposta crônica.

O controle positivo usado para este teste foi a oxazolona (0,3 %) que é capaz de promover um aumento de 30 % da espessura da orelha em relação à medida antes do desafio (KATO *et al.*, 2002). A Tabela 14 mostra os resultados obtidos para o teste de medida de edema de orelha (MEST), onde é possível observar que a percentagem de edema de orelha para o controle positivo foi de 129 e 133 %, ou seja, cerca de 30 % a mais em relação ao valor de 100 % indicado pela espessura da orelha antes da fase do desafio, corroborando com os dados encontrados na literatura.

É possível observar que todos os géis estudados, bem como o controle negativo, obtiveram uma percentagem do edema de orelha de camundongo entre 91 e 104 %. Como esses valores foram menores que 110 % (ROBINSON *et al.*, 1995), é possível concluir que todas as formulações estudadas aplicadas topicamente não foram capazes de promover sensibilização cutânea em camundongos, indicando a potencialidade destes veículos para a administração tópica.

Tabela 14. Resultados do teste de medida de edema de orelha (MEST). Aumento percentual do edema das orelhas.

Formulações testadas	% do edema (24 h)	% do edema (48 h)
GEL-NCBr	102	103
GEL-NCBHT	99	99
GEL-LIVRE	103	104
GEL-Br	96	99
Isotrex[®]	98	105
Controle negativo	95	91
Controle positivo	129	133

5.4.3.2 Testes de alergenicidade por ensaio do linfonodo local (*local lymph node assay* – LLNA)

A Figura 14 mostra os resultados obtidos para o teste de alergenicidade por ensaio do linfonodo local (LLNA). Os resultados estão expressos como índice de estimulação relativo ao valor do controle negativo.

É possível observar que os índices de sensibilização produzidos no teste LLNA foram abaixo de 3 para todas as formulações estudadas. Em relação aos géis contendo isotretinoína, uma aplicação tópica de 3 doses de 25 µL dos géis do fármaco na concentração de 0,05 % não foram capazes de produzir sensibilização cutânea nos camundongos.

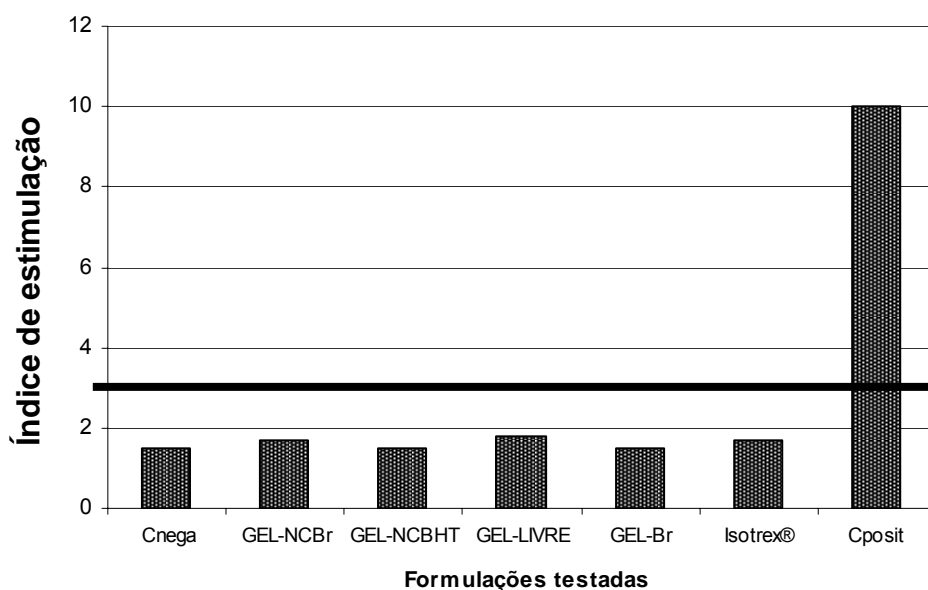


Figura 14. Ensaio do linfonodo local (LLNA). Os resultados estão expressos como índice de estimulação relativo ao valor do controle negativo. A linha horizontal grossa identifica um índice de estimulação 3.

Em suma, a avaliação da alergenicidade dos géis, através dos testes MEST e LLNA, mostrou que os géis contendo nanocápsulas de isotretinoína ou fármaco livre, assim como a formulação comercial não são potencialmente alergênicas.

5.5 Estudo de penetração cutânea em humanos por *tape stripping*

Participaram do estudo 23 voluntários com idade entre 23 e 33 anos (média 26,9 anos), sendo desses 12 homens e 11 mulheres.

A Tabela 15 apresenta os resultados do experimento de retenção sobre a superfície cutânea equivalente a remoção da primeira fita (retirada do excesso de fármaco que não sofreu retenção cutânea) e penetração no estrato córneo de gel de isotretinoína na forma nanoencapsulada e livre em 15 min, 1, 3 e 6 horas após aplicação cutânea. A Figura 15 ilustra o perfil comparativo de retenção cutânea da isotretinoína nos dois géis.

Através da Figura 15 é possível observar que houve uma diferença significativa na retenção de isotretinoína no estrato córneo em 15 min quando se compara o GEL-NCBHT ($27,3 \pm 1,1$ %) com o gel livre GEL-LIVRE ($20,8 \pm 2,5$ %). Por outro lado, em 1, 3 e 6 h não foi observada diferença significativa na porcentagem de penetração cutânea entre os dois géis. Resultados semelhantes em relação a perfis de permeação foram encontrados por SHAH e colaboradores (2007), estudando a permeação de nanopartículas lipídicas sólidas contendo tretinoína pela técnica *in vitro* de células de difusão de *Franz*, com amostras de pele abdominal de ratos *Wistar*. Os autores compararam a permeação de gel contendo nanopartículas lipídicas sólidas e creme disponível comercialmente Retinol-A[®] (Janssen-Cilag, Índia). Os resultados mostraram perfis de permeação comparáveis, pois a quantidade total de tretinoína permeada durante 12 h de estudo não mostrou diferenças significativas comparando-se as duas formulações.

Tabela 15 Isotretinoína retida na superfície cutânea e permeada no estrato córneo após aplicação tópica de géis hidrofílicos contendo 0,05 % do fármaco.

Tempo	GEL-NCBHT Sobre a pele (%)	GEL-LIVRE Sobre a pele (%)	GEL-NCBHT Estrato Córneo (%)	GEL-LIVRE Estrato Córneo (%)
15 min	$69,3 \pm 8,6$	$78,45 \pm 5,45$	$27,3 \pm 1,1$	$20,8 \pm 2,5^{**}$
1 h	$66,5 \pm 6,8$	$72,4 \pm 5,1$	$25,7 \pm 3,9$	$25,3 \pm 3,7$
3 h	$59,2 \pm 6,2$	$55,5 \pm 7,0$	$25,0 \pm 6,0$	$25,3 \pm 4,8$
6 h	$63,7 \pm 7,4$	$59,5 \pm 10,8$	$22,8 \pm 4,7$	$21,5 \pm 4,6$

* percentual em relação à dose de 32 μg aplicada; valores representam média \pm desvio padrão;
 **diferença significativa em relação ao GEL-NCBHT ($\alpha = 0,05$).

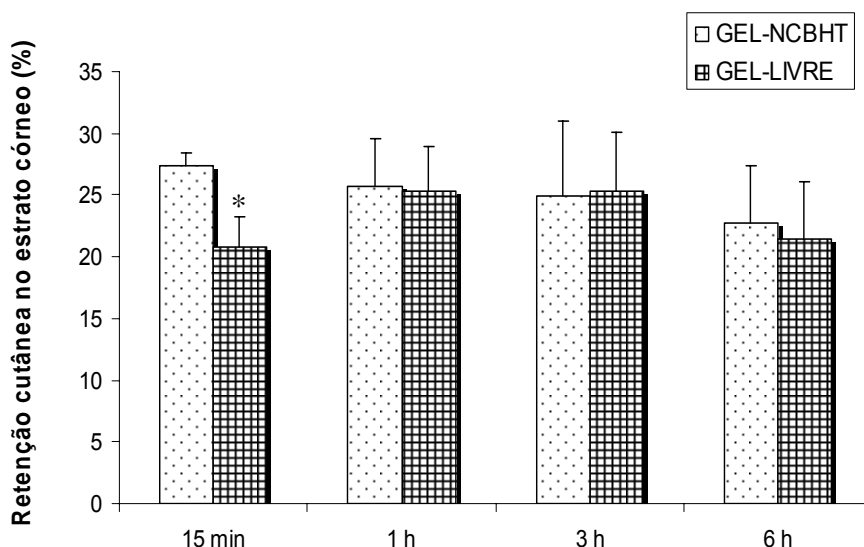


Figura 15. Penetração de isotretinoína no estrato córneo comparando GEL-NCBHT e GEL-LIVRE 15 min (n = 3), 1 h (n = 6), 3 h (n = 9) e 6 h (n = 5) após aplicação cutânea das formulações. *Diferença significativa ($\alpha = 0.05$).

O tamanho médio das partículas contidas na formulação LIVRE utilizada para o preparo do GEL-LIVRE foi determinado seguindo-se metodologia descrita no item 4.2.2.3, resultando em um diâmetro de $1775,7 \pm 105,9$ nm. Comparadas com o tamanho médio das partículas contidas na suspensão NC-BHT ($230,8 \pm 9,4$ nm) utilizada para preparo do GEL-NCBHT, as partículas contidas no GEL-LIVRE foram aproximadamente 7,7 vezes maiores. Portanto, a diferença observada na penetração de isotretinoína no tempo de 15 min pode ser explicada pelo fato do GEL-LIVRE conter o fármaco disperso em partículas com tamanhos maiores que os observados para o GEL-NCBHT, fazendo com que a isotretinoína livre demore mais tempo para permear, uma vez que as partículas de fármaco têm que dissolver para sofrer penetração.

Como a penetração da isotretinoína no estrato córneo foi mais rápida quando nanoencapsulada do que quando livre, atingindo níveis médios 31 % maiores em 15 min, pode-se inferir que a nanoencapsulação protege o fármaco da degradação tanto pela sua estrutura e componentes da formulação quanto pelo fato de retirar mais rapidamente o fármaco da superfície cutânea, onde está mais susceptível à degradação pela presença de luz, diminuindo a formação de produtos de

degradação como a tretinoína, a qual possui efeitos colaterais mais pronunciados sobre a pele que a isotretinoína (SAMPAIO *et al.*, 1997). Além disso, evitando que certa quantidade de isotretinoína degrade antes de penetrar, é possível obter o efeito desejável quase que total desse fármaco que atualmente é o melhor retinóide utilizado para o tratamento da acne (ZOUBOULIS, 2006).

6. Conclusões

❖ Foi possível obter nanocápsulas contendo isotretinoína nas concentrações de 0,5; 1,0 e 1,5 mg/mL através do método de nanoprecipitação e nanoemulsão na concentração de 0,5 mg/mL através do método de emulsificação espontânea, que apresentaram características físico-químicas adequadas para a utilização cutânea.

❖ A presença de BHT é importante para a estabilidade da isotretinoína nanoencapsulada e seu uso simultâneo com poli(ϵ -caprolactona) mostrou sinergismo, resultado em melhoria da estabilidade durante o armazenamento à temperatura ambiente e ao abrigo da luz e frente à luz UVA, em comparação com o fármaco livre.

❖ A degradação da isotretinoína nanoencapsulada mostrou um perfil compatível com modelo biexponencial de primeira ordem, sugerindo que apenas 50 % do fármaco encontra-se no núcleo oleoso da partícula, estando a outra parte associada à superfície da mesma.

❖ A utilização das suspensões de nanocápsulas contendo 0,5 mg/mL de isotretinoína em total substituição à água, na preparação dos hidrogéis de hidroxietilcelulose, não modificou o comportamento pseudoplástico original desse polímero, produzindo géis compatíveis para utilização cutânea.

❖ A avaliação da alergenicidade dos hidrogéis de hidroxietilcelulose contendo nanocápsulas de isotretinoína 0,05 %, através dos testes MEST e LLNA, mostrou que essas nanopartículas não são alergênicas.

❖ A técnica de *tape stripping* em humanos mostrou que a penetração no estrato córneo 15 min após a aplicação cutânea de hidrogel de hidroxietilcelulose contendo isotretinoína nanoencapsulada 0,05 % é, em média, 31 % maior do que a penetração da isotretinoína livre. Após esse tempo, penetração do fármaco não mostrou diferença significativa na forma livre ou nanoencapsulada.

7. Referências

ALBERTI, I.; KALIA, Y. N.; NAIK, A.; BONNY, J.; GUY, R. In vivo assessment of enhanced topical delivery of terbinafine to human stratum corneum. **Journal of Controlled Release**, v. 71, p. 319-327, 2001.

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.

ALMEIDA, I. F.; BAHIA, M. F. Reologia: Interesse e aplicações na área cosmético-farmacêutica. **Cosmetics & Toiletries**, v. 15, p. 96, 2003.

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, 2004a.

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

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

ALVES, M. P. **Formas farmacêuticas plásticas contendo nanocápsulas, nanoesferas e nanoemulsões de nimesulida: desenvolvimento, caracterização e avaliação da permeação cutânea *in vitro***. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, 2006)

AMICHAÏ, B.; SHEMER, A.; GRUNWALD, M. H. Low-dose isotretinoin in the treatment of acne vulgaris. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v.54, n.4, p. 644-646, 2006.

ANDERSE, K. E.; FRANKILD, S. Allergic contact dermatitis. **Clinics in Dermatology**, v.15, p.645-654, 1997.

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

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

BARATA, E. A. F. A **Cosmetologia: Princípios básicos**. São Paulo: Tecnopress, p.19, 2002.

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

BARRAT, G. M. Therapeutic applications of colloidal drug carriers. **Pharmaceutical Science e Technology Today**, v. 3, n. 5, p. 163-171, 2000.

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

BICKERS, D. R.; SAURAT, J.H. Isotretinoin : A state-of-the-art conference. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 45, n. 5, p. S125-S128, 2001.

BOUCHEMAL, K.; BRIANÇON, S.; PERRIER, E.; FESSI, H.; BONNET I.; ZYDOWICZ, N. Synthesis and characterization of polyurethane and poly(ether urethane) nanocapsules using a new technique of interfacial polycondensation combined to spontaneous emulsification. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 269, p. 89-100, 2004.

BRAUN, D. B.; ROSEN, M. R. **Rheology Modifiers Handbook: Practical use and application**. New York: William Andrew Publishing, 2000.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia para Avaliação da Segurança de Produtos Cosméticos**. Brasília, 2003a. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em 11/08/2008.

BRASIL. Resolução RDC n° 135, de 29 de maio de 2003b. **Regulamento técnico para medicamentos genéricos**. Diário Oficial [da República Federativa do Brasil], Brasília, DF. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em 11/08/2008.

BRASIL. Resolução – RE n° 899, de 20 de maio de 2003c. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Diário oficial [da República Federativa do Brasil], Brasília, DF, 11/08/2008.

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

CHAGAS, M. H. C.; FLORES, H.; CAMPOS, F. A. C. S.; SANTANA, R. A.; LINS, E. C. B. Teratogenia da vitamina A. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**, v. 3, n. 3, p. 247-252, 2003.

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

CHEN, C.; JENSEN, B. K.; MISTRY, G.; WYSS, R.; ZULTAK, M.; PATEL, I. H.; RAKHIT, A. K. Negligible systemic absorption of topical isotretinoin cream: implications for teratogenicity. **The Journal of Clinical Pharmacology**, v. 31, p. 279-284, 1997.

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

COUVREUR, P.; BARRAT, G.; FATTAL, E.; LEGRAND, P.; VAUTHIER, C. Nanocapsule Technology: A Review. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 19, n. 2, p. 99-134, 2002.

CRUZ, L.; SCHAFFAZICK, S. R.; DALLA COSTA, T. C. T.; SOARES, L. U.; MEZZALIRA, G.; DA SILVEIRA, N. P; SCHAPOVAL, E. E. S.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Physico-chemical characterization and in vivo evaluation of indomethacin ethyl ester-loaded nanocapsules by PCS, TEM, SAXS, interfacial alkaline hydrolysis and antiedematogenic activity. **Journal of nanoscience and nanotechnology**, v. 6, p. 3154-3162, 2006.

DEAN, J.; TWERDOK, L.; ANDERSEN, K. E. *et al.* **Protocol: Murine local lymph node assay (LLNA)**. Purpose: Assessment of allergic contact dermatitis potential, 2001.

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

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

FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J-P; AMMOURY, N.; BENITA, S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 55, p. r1-r4, 1989.

FRESTA, M.; CAVALLARO, G.; GIAMMONA, G.; WEHRLI, E.; PUGLISI, G. Preparation and characterization of polyethyl-2-cyanoacrylate nanocapsules containing antiepileptic drugs. **Biomaterials**, v. 17, p. 751-758, 1996.

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

GENDLER, E. C. A practical approach to the use of retinoids in aging skin. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 39, n. 2, 1998.

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

GLASS, B. D.; NOVÁK, Cs.; BROWN, M. E. The thermal and photostability of solid pharmaceuticals. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 77, p. 1013-1036, 2004.

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

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

HANS, M. L.; LOWMAN, A. M. Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. **Current Opinion in Solid State and Materials Science**, v. 6, p. 319-327, 2002.

HERKENNE, C.; ALBERTI, I.; NAIK, A.; KALIA, Y. N.; MATHY, F.; PRÉAT, V.; GUY, R. H. In vivo methods for the assessment of topical drug bioavailability. **Pharmaceutical Research**, v. 25, n. 1, p. 87- 103, 2008.

ICH Guideline. Validation of Analytical Procedures: Methodology. United States of America, 1996. Disponível em: <<http://www.ich.org/cache/compo/276-254-1.html>>. Acesso em: outubro, 2006.

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

JACOBI, U.; MEYKADEH, N.; STERRY, W.; LADEMANN, J. Effect of the vehicle on the amount of stratum corneum removed by tape stripping. **Journal of the German Society of Dermatology: JDDG**, v. 11, p. 884-889, 2003.

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

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

KLIVANOVÁ, J.; BRTKO. Selected retinoids: determination by isocratic normal-phase hplc. **Endocrine regulations**, v. 36, p. 133-137, 2002.

KOROLKOVAS, A.; FRANÇA, F. F. A. C. **Dicionário Terapêutico**. Ed 2004/2005.

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

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

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

LEMARCHAND, C.; COUVREUR, P.; BESNARD, M.; CONSTANTINI, D.; GREF, R. Novel polyester-polysaccharide nanoparticles. **Pharmaceutical Reserach**, v. 20, p. 1284-1292, 2003.

LEYDEN, J. J. The role of isotretinoin in the treatment of acne: personal observations. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 39, n. 2, p. S45-S49, 1998.

LIMA, E. M.; DINIZ, D. G. A.; ANTONIOSI-FILHO, N. R. Development of a gás chromatography method for the determination of isotretinoin and its degradation products in pharmaceuticals. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 38, p. 678-689, 2005.

LIU, J.; HU, W.; CHEN, H.; NI, Q.; XU, H.; YANG, X. Isotretinoin-loaded solid lipid nanoparticles with skin targeting for topical delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 328, p. 191-195, 2006.

MAIO, V. M. P.; FRÖEHLICH, P. E.; BERGOLD, A. M. Interconversão tretinoína/isotretinoína: Um problema no preparo de formulações farmacêuticas. **Acta Farmacêutica Bonaraense**, v. 22, n. 3, p. 249-254, 2003.

MARCUS, R.; COULSTON A.M. Vitaminas Lipossolúveis - Vitaminas A, K e E. In: GOODMAN & GILMAN. **As bases farmacológicas da terapêutica**. Rio de Janeiro: Mc Graw Hill, 10° ed., cap 64, 2003.

MARTIN, A.; WARBRICK, J.; CAMMARATA, A. **Rheology in physical pharmacy**. 4th. ed. Lea & Febiger: Philadelphia, p. 453- 671, 1993.

MENGUAL, M.; MEUNIER, G.; CAYRE, I.; PUECH, K.; SNABRE, P. Characterisation of instability of concentrated dispersions by a new optical analyzer: the Turbiscan MA 1000. **Colloids and Surface A: Physicochemical Engineering Aspects**, v. 152, p. 111-123, 1999.

MILÃO, D. **Desenvolvimento tecnológico e avaliação biológica de formas farmacêuticas plásticas contendo nanocápsulas de diclofenaco**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, 2003.

MIYAZAKI, S.; TAKAHASHI, A.; KUBO, W.; BACHYNSKY, J.; LÖBENBERG, R. Poly nbutylcyanoacrylate (PNBCA) nanocapsules as carrier for NSAIDs: in vitro release

and in vivo skin penetration. **Journal of Pharmacy e Pharmaceutical Science**, v. 6, n. 2, p. 238-245, 2003.

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

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

NAU, H. Teratogenicity of isotretinoin revisited: Species variation and the role of all-trans-*trans*-retinoic acid. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v.45, n. 5, p. S183-S187, 2001.

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

PERSHING, L. K.; NELSON, J. L.; CORLETT, J. L.; SHRIVASTAVA, S. P.; HARE D. B.; SHAH, V. P. Assessment of dermatopharmacokinetic approach in the bioequivalence determination of topical tretinoin gel products. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 48, n. 5, p. 740-751, 2003.

PIQUERO, J. Isotretinoína: su uso en el acné del adolescente. **Dermatología Pediátrica Latinoamericana**, v.2, n. 1, p. 72-81, 2004.

POLETTO, F. S.; JÄGER, E.; CRUZ, L.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. The effect of polymeric wall on the permeability of drug-loaded nanocapsules. **Materials Science and Engineering**, doi:10.1016/j.msec.2007.04.015.

QUINTANAR-GUERRERO, D.; ALLÉMANN, E.; FESSI, H.; DOELKER, E. Preparation techniques and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 24, n. 12, p. 1113-1128, 1998.

RHEIN, L.D.; PEOPLES, C.; WOLF, B. Skin, Hair and Nail Structure and Function. In: SCHLOSSMAN, M.L. **The chemistry and Manufacture of Cosmetics**. 3.ed. Carol Stream: Allured Publishing Corporation, v. I, p. 87-136, 2000.

SAMPAIO, S. A. P.; MURACO, H. C. B.; FREITAS, T. H. P.; TOTOLI, S. A. S. M.; MARTINS, M. R. F. C. Estudo multicêntrico comparando a eficácia e tolerância da isotretinoína gel 0,05 por cento e tretinoína creme 0,005 por cento no tratamento da acne vulgar / A multicenter trial comparing the efficacy and tolerance of isotretinoin gel 0,05 por cento and tretinoin cream 0,005 por cento in the treatment of acne vulgaris. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 54, p. 59-62, 1997.

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.; POHLMANN, A. R.; FREITAS, L. L. GUTERRES, S. S. Caracterização e estudo de estabilidade de suspensões de nanocápsulas e de nanoesferas poliméricas contendo diclofenaco. **Acta Farmacêutica Bonaraense**, v. 21, n. 2, p. 99-106, 2002.

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

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

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

SHIM, J.; KANG, H. S.; PARK, W.; HAN, S.; KIN, J.; CHANG, I. Transdermal delivery of minoxidil with block copolymer nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, v. 97, p. 477-482, 2004.

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

STIEFEL. Cuidados envolvidos na preparação de produtos tópicos contendo isotretinoína. International R&D Brasil. Informe técnico nº 16. 1997.

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

TASHTOUSH, B. M.; JACOBSON, E. L.; JACOBSON, M. K. UVA is the major contributor to the photodegradation of tretinoin and isotretinoin: Implications for development of improved pharmaceutical formulations. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 352, p. 123-128, 2008.

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

TØNNESEN, H. H. Formulation and stability testing of photolabile drugs **International Journal of Pharmaceutics**, v. 225, p.1-14, 2001.

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

TÖRMÄ, H. Interaction of isotretinoin with endogenous retinoids. **Journal of the American Academy of Dermatology**, doi: 10.1067/mjd.2001.113716.

U.S.FDA/CDER. Topical dermatological drug product NDAs and ANDAs – *in vivo* bioavailability, bioequivalence, *in vitro* release, and associated studies, 1998.

USP 31. The United States Pharmacopeia. 31 ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention Inc., 2007.

WAHLKVIST, H. **Predictive testing for contact allergy: comparison of some guinea pig and mouse protocols including dose-response designs**. 1999. 81p. Thesis. Department of Medicine, Unit of Dermatology and Venereology, Karolinska Hospital, Stockholm, Sweden.

WEISS-ANGELI, V.; POLETTO, F. S.; ZANCAN, L. R.; BALDASSO, F. POHLMANN A. R.; GUTERRES, S. S. Nanocapsules of Octyl Methoxycinnamate Containing Quercetin Delayed the Photodegradation of Both Components Under Ultraviolet A Radiation. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 4, p. 80-89, 2008.

WIEGAND, W.; CHOU, C. Pharmacokinetics of oral isotretinoin. **Journal on the American Academy of Dermatology**, v. 39, n. 2, p.S8-S12, 1998.

WILKINSON, J. B.; MOORE, R. J. **Cosmetologia de Harry** Madrid: Ediciones Diaz de Santos S.A. 1039 p., 1990.

WYATT, E. L.; SUTTER, S. H.; DRAKE L. A. Farmacologia Dermatológica. In: GOODMAN & GILMAN. **As bases farmacológicas da terapêutica**. Rio de Janeiro: Mc Graw Hill, 10° ed., cap. 65, 2003.

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

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

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

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

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

8. Anexos

Validação de metodologia analítica para quantificação da isotretinoína nas suspensões de nanopartículas

A validação analítica obedeceu aos critérios estabelecidos pela *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceutical for Human Use* (ICH, 1996) e da Resolução 899 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, que disponibiliza o Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos (BRASIL, 2003c). Os parâmetros avaliados foram linearidade, precisão intermediária, repetibilidade, exatidão, limites de detecção e quantificação.

A isotretinoína nas formulações foi quantificada utilizando CLAE. As condições cromatográficas utilizadas estão descritas na Tabela 1-A1.

Tabela 1-A1. Condições cromatográficas utilizadas para a quantificação da isotretinoína nas suspensões de nanopartículas

Característica	Descrição
Coluna	Nova-Pack C ₁₈ , (150 mm x 3,9 mm, 4 µm) (Waters [®])
Pré-coluna	SecurityGuard C ₁₈ , Phenomenex [®]
Fluxo	1,4 mL/min
Volume de injeção	50 µL
Detecção	Fluorescência, λ _{excitação} (350 nm), λ _{emissão} (520 nm) Sensibilidade média, ganho 16 vezes, resposta 4.
Fase móvel	Acetonitrila:etanol:ácido acético glacial 1 % (68:8:24, v/v/v), pH _{aparente} 4. Após a preparação, a fase móvel foi filtrada em membranas de polivinilideno (0,45 µm, 47 mm, Millipore [®]).
Equipamento	CLAE (Shimadzu [®]) composto de: bomba LC-10ADVP, controlador de sistema SCL-10AVP, autoinjeter SIL-10ADVP, detector de fluorescência RF-10AXL, software Shimadzu [®] CLASS-VP (versão 6.12)

1 Linearidade

A curva padrão foi preparada pela diluição de aproximadamente 0,01 g de isotretinoína em 50 mL de acetonitrila e, posteriormente, diluição de alíquotas dessa solução-mãe em acetonitrila, de modo a obter as concentrações de 1, 2, 4, 8, 16 e 20 µg/mL. Estas últimas foram filtradas em membrana de polivinilideno (0,45 µm, 13 mm, Millipore®) antes da injeção no cromatógrafo.

Para o estudo da linearidade, foram preparadas e avaliadas três curvas de calibração, uma por dia com leituras em triplicata, em três dias consecutivos, nos seis níveis de concentração conforme descrito acima. A partir de cada curva, foram determinados o coeficiente de correlação, intersecção com o eixo y, o coeficiente angular, a soma residual dos quadrados mínimos da regressão linear e coeficiente de variação percentual (CV %).

Nesses níveis de concentração a quantificação da isotretinoína foi linear, o que pode ser visualizado pela Figura 1-A1, sendo o coeficiente de correlação superior a 0,99, de acordo com os guias de validação vigentes (ICH, 1996; BRASIL, 2003). Segundo análise da variância, verificou-se regressão linear significativa e desvio da linearidade não significativo ($p < 0,05$).

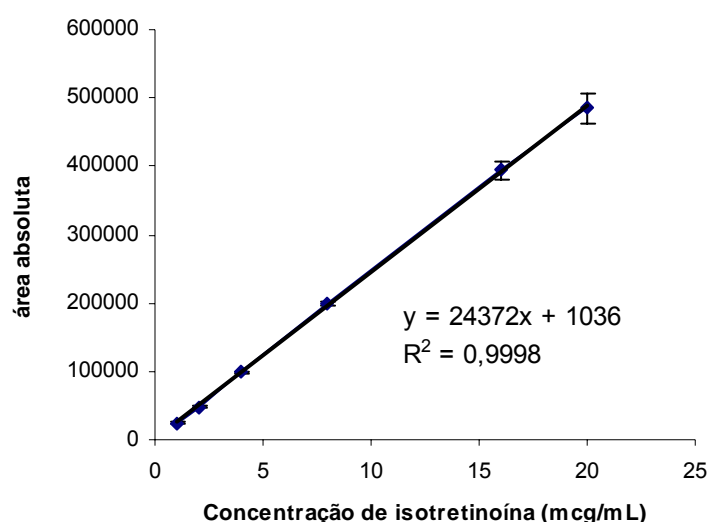


Figura 1-A1. Representação gráfica da curva de calibração média de isotretinoína, quantificada através de CLAE-fluorescência (Shimadzu®)

Os limites de detecção e quantificação foram calculados matematicamente através da relação entre o desvio padrão da curva de calibração e sua inclinação, usando o fator multiplicador sugerido pela norma ICH (1996), conforme demonstrado nas equações 1 e 2:

$$LD = 3,33 DP / B \quad (\text{Eq. 1-A1})$$

$$LQ = 10 DP / B \quad (\text{Eq. 2-A1})$$

onde LD é o limite de detecção; LQ é o limite de quantificação; DP é o desvio padrão da reta de calibração e B é o coeficiente angular da reta de calibração.

Os valores obtidos foram 0,147 µg/mL para o limite de detecção e 0,440 µg/mL para o limite de quantificação.

2 Repetibilidade e precisão intermediária

A precisão foi avaliada através da repetibilidade (precisão intra-dia ou intra-corrida) e precisão intermediária (precisão inter-dia ou inter-corridas) preparadas a partir da formulação NC-BHT. Para essas determinações, 6 soluções diferentes de uma mesma concentração (5 µg/mL) foram preparadas e injetadas, em triplicata, durante 3 dias consecutivos. Os resultados foram expressos em termos de desvio padrão relativo (DPR) e estão apresentados na Tabela 2-A1.

Para ambos os estudos os valores de desvios padrões relativos foram inferiores a 5 %, demonstrando repetibilidade e precisão intermediária adequadas para o método analítico em questão (BRASIL, 2003c).

Tabela 2-A1. Valores experimentais obtidos nos ensaios de repetibilidade e precisão intermediária em três dias diferentes.

Concentração	DPR Dia 1 (%)	DPR Dia 2 (%)	DPR Dia 3 (%)	Média (%)
Isotretinoína 5 µg/mL	0,57	1,17	1,71	1,15

3 Exatidão

A exatidão foi determinada através do teste de recuperação, adicionando-se uma quantidade conhecida de fármaco (2 µg/mL) à solução amostra (NC-BHT), resultando nas concentrações de 4, 8 e 16 µg/mL. Como observado na Tabela 3-A1, os valores percentuais de isotretinoína recuperados a partir das soluções-amostra encontram-se dentro dos intervalos permitidos (ICH, 1996).

Os cromatogramas apresentados mostram a especificidade do método para a avaliação da isotretinoína a partir das amostras de nanocápsulas, demonstrando que não há interferentes de outros componentes da formulação na quantificação do fármaco (Figura 2-A1).

Tabela 3-A1. Avaliação da exatidão do método analítico de doseamento da isotretinoína em nanocápsulas (n = 3)

Concentração de isotretinoína (µg/mL)	Concentração ± DP (exatidão %)
4,00	4,04 ± 0,01 (102,5)
8,00	7,98 ± 0,02 (100,8)
16,00	15,92 ± 0,05 (99,6)

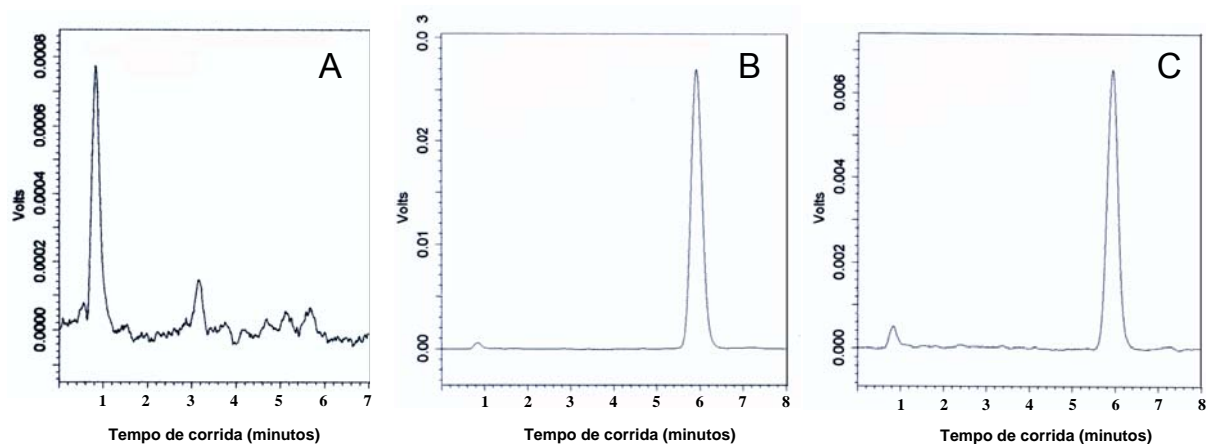


Figura 2-A1. Cromatogramas de CLAE para o método analítico de doseamento da isotretinoína em nanocápsulas. (A) Nanocápsulas brancas; (B) Amostra da curva padrão na concentração de 20 $\mu\text{g/mL}$; (C) Amostra de suspensão de nanocápsulas na concentração de 5 $\mu\text{g/mL}$.

Considerando que os resultados apresentados para linearidade, repetibilidade, precisão intermediária e exatidão encontram-se em concordância com as especificações oficiais, este método analítico é adequado para a quantificação da isotretinoína em suspensões de nanocápsulas.

Adaptação de metodologia analítica para quantificação da isotretinoína nas fitas adesivas e nos géis

A medida da concentração total de isotretinoína nas fitas adesivas e para o teor de fármaco nos géis foram realizadas por CLAE utilizando sistema Waters® com metodologia adaptada a partir de TASHTOUSH e colaboradores (2006). As condições cromatográficas utilizadas estão descritas na Tabela 1-A2.

Tabela 1-A2. Condições cromatográficas utilizadas para a quantificação da isotretinoína nas fitas do *tape stripping* e nos géis

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

1 Linearidade

A curva padrão foi preparada pela diluição de aproximadamente 0,01 g de isotretinoína em 20 mL de acetonitrila e a partir desta solução-mãe, a diluição de alíquotas em acetonitrila nas concentrações de 2,5, 5 e 10 µg/mL. A partir do ponto de 10 µg/mL obteve-se alíquotas de 0,2; 0,5 e 1 µg/mL. Obtendo-se assim uma

curva padrão de 0,2; 0,5; 1; 2,5; 5 e 10 µg/mL filtradas em membrana de polivinilideno (0,45 µm, 13 mm, Millipore®) antes da injeção de 50 µL no cromatógrafo.

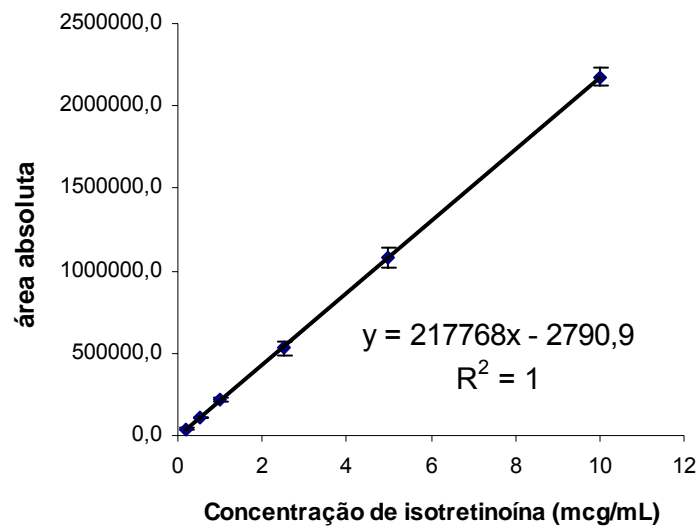


Figura 1-A2. Representação gráfica da curva média de isotretinoína, quantificada através de CLAE- UV (Waters®)

Nesses níveis de concentração a quantificação da isotretinoína foi linear, o que pode ser visualizado pela Figura 1-A2, sendo o coeficiente de correlação superior a 0,99, de acordo com os guias de validação vigentes (ICH, 1996; BRASIL, 2003c). Segundo análise da variância, verificou-se regressão linear significativa e desvio da linearidade não significativo ($p < 0,05$).

Os limites de detecção e quantificação foram calculados matematicamente através da relação entre o desvio padrão da curva de calibração e sua inclinação, usando o fator multiplicador sugerido pela norma ICH (1996), conforme demonstrado nas equações 1 e 2 do Anexo 1. Os valores obtidos foram 0,082 µg/mL para o limite de detecção e 0,245 µg/mL para o limite de quantificação.

2 Especificidade

A especificidade do método analítico para avaliação da isotretinoína nas fitas adesivas foi feita doseando-se apenas a fita adesiva em acetonitrila. Também foi feita um *tape stripping* de região do braço de cada voluntário que não recebeu gel. Desta forma, foi possível verificar que o método analítico foi específico para este tipo de análise.

Considerando que os resultados apresentados para linearidade e especificidade encontram-se em concordância com as especificações oficiais, este método analítico pode ser considerado adequado para a quantificação da isotretinoína nas fitas de *tape stripping* e nos hidrogéis contendo suspensão de nanocápsulas.



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
CARTA DE APROVAÇÃO



O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul analisou o projeto:

Número : 2007844

Título : AVALIAÇÃO DA PENETRAÇÃO CUTÂNEA DE NANOCÁPSULAS DE ISOTRETINOÍNA ATRAVÉS DE TAPE STRIPPING E MICRODIÁLISE EM HUMANOS

Pesquisador (es) :

<u>NOME</u>	<u>PARTICIPAÇÃO</u>	<u>EMAIL</u>	<u>FONE</u>
TERESA CRISTINA TAVARES DALLA COSTA	PESQ RESPONSÁVEL	00006743@ufrgs.br	33085218
CÂNDICE CAROLINE FELIPPI	PESQUISADOR	candicefelippi@yahoo.com.br	
LAURA KARSBURG OLIVEIRA	PESQUISADOR	laurakoliveira@hotmail.com	

O mesmo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS, reunião nº 27 ,
ata nº 107 , de 15/5/2008 , por estar adequado ética e metodologicamente e de acordo
com a Resolução 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde.

Porto Alegre, quarta-feira, 28 de maio de 2008


FILMA SIMONI BRUM DA SILVA
Coordenador do CEP-UFRGS

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Avaliação da penetração cutânea da isotretinoína pela técnica *tape stripping in vivo*.

Informações sobre a pesquisa

Esta pesquisa será realizada na Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre. O objetivo deste trabalho é verificar a penetração na pele da isotretinoína, que é um fármaco utilizado para o tratamento da acne, gel. Serão utilizados dois géis contendo isotretinoína, um contendo este fármaco na sua forma livre e outro encapsulado por um polímero biodegradável, visando aumentar a estabilidade do princípio ativo bem como podendo melhorar sua penetração na pele, proporcionando uma melhora no tratamento da acne. Para possível comparação da penetração desses dois produtos, será utilizada uma técnica chamada *tape stripping*, que consiste em uma única aplicação dos produtos na forma de gel no antebraço dos voluntários com posteriores remoções do estrato córneo com auxílio de uma fita adesiva semelhante a fita duréx. É uma técnica minimamente invasiva e indolor, pois são retiradas apenas as células mortas superficiais da pele. Este estudo faz parte da dissertação de Mestrado da Farmacêutica Cândice Felippi que está disponível para fornecer qualquer informação complementar em relação à pesquisa.

Informações sobre as avaliações a serem realizadas em mim

Será aplicado na pele dos dois antebraços gel contendo isotretinoína em 4 áreas de 16 cm² (4 x 4 cm) cada, ou seja, 2 locais em cada antebraço.

A quantidade de fármaco que penetra na pele será verificada através da técnica *tape stripping*, que consiste na remoção do estrato córneo com o auxílio de fitas adesivas. Primeiramente o produto será aplicado na pele e ficará por um período de 15 min, 1 hora, 3 horas ou 6 horas, dependendo do tempo que você se dispôr a participar do estudo. Após serão realizadas as remoções com as fitas, cortadas em tamanho de aproximadamente 5 x 5 cm, totalizando 14 remoções em cada local. Serão tiradas fotos do antebraço antes, durante e após os procedimentos.

Sua participação voluntária na pesquisa poderá contribuir para o desenvolvimento de produto contendo isotretinoína mais estável e eficaz para o tratamento da acne.

Riscos e Desconforto

Poderá ocorrer vermelhidão, coceira e dor em aproximadamente, 90 %, 30 % e 5 %, respectivamente, na região do antebraço estudada. Embora não sejam esperados outros desconfortos, se surgirem outras anormalidades, estas serão avaliadas de modo pertinente, com as despesas cobertas pelo projeto de pesquisa.

Informação de confidencialidade

Os valores obtidos nos resultados das avaliações desse estudo somente serão usados para divulgação e/ou publicação. Em hipótese alguma serão expostos os nomes ou qualquer outra informação a respeito dos participantes do estudo.

Liberdade de consentimento

A permissão para realizar as avaliações e a participação neste estudo é voluntária. Eu estou livre para este consentimento a qualquer momento, podendo desistir das avaliações ou do programa quando julgar conveniente.

Eu declaro que fui informado sobre todos os procedimentos da pesquisa, que recebi de forma clara e objetiva todas as explicações pertinentes ao projeto. Eu compreendo que neste estudo, as medições do experimento/procedimentos de tratamento serão feitas em mim. Estou de acordo em participar da pesquisa.

Nome por extenso: _____.

Assinatura: _____.

Cândice Felippi : _____ Fone: (51) 8471 4000

Teresa Dalla Costa: _____ Fone: (51) 33 08 54 18

POA ___/___/_____.