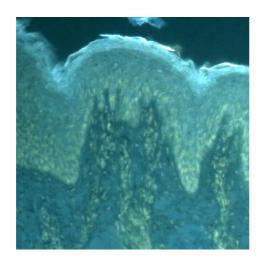
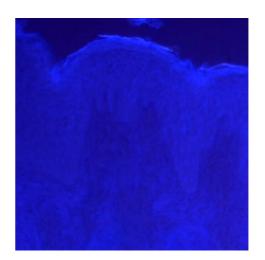
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto





Desenvolvimento, caracterização e avaliação de sistemas microestruturados para veiculação de ácido retinóico na pele

Ana Amélia Moreira Lira

Ribeirão Preto

2007

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto

Desenvolvimento, caracterização e avaliação de sistemas microestruturados para veiculação de ácido retinóico na pele

Ana Amélia Moreira Lira

Ribeirão Preto

2007

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto

Desenvolvimento, caracterização e avaliação de sistemas microestruturados para veiculação de ácido retinóico na pele

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para a obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas, área de concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Orientada: Ana Amélia Moreira Lira

Orientadora: Prof^a Dr^a Juliana Maldonado Marchetti

RIBEIRÃO PRETO

FICHA CATALOGRÁFICA

Lira, Ana Amélia Moreira

Desenvolvimento, caracterização e avaliação de sistemas microestruturados para veiculação de ácido retinóico na pele,

Ribeirão Preto-SP, 2007.

142 p.: il.; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Orientadora: Marchetti, Juliana Maldonado.

1. Ácido retinóico 2. Quitosana 3. Alginato 4. Micropartículas, 5. Liberação Sustentada, 6. Penetração Cutânea.

Ana Amélia Moreira Lira

Título: "Desenvolvimento, caracterização e avaliação de sistemas microestruturados para veiculação de ácido retinóico na pele"

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para a obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas, área de concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr.	
Instituição	Assinatura
Prof. Dr.	
Instituição	Assinatura
Prof. Dr.	
	Assinatura
Prof. Dr.	
	Assinatura
Prof. Dr.	
Instituição	Assinatura
Prof. Dr.	
Instituição	Assinatura_

"Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo, qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim".

Francisco Cândido Xavier

Este trabalho é dedicado primeiramente a Deus que me fortaleceu e amparou em todos os momentos difíceis dessa jornada e aos meus pais, que sempre me incentivaram e proporcionaram recursos afetivos e materiais para realização das minhas metas.

"Confia ao Senhor tuas obras e terão êxito os teus projetos."
(Provérbios. 16,3)

Agradecimentos

Aos meus pais, Zuleide e Rivaldo, pelo amor, carinho, compreensão e por todo incentivo diário apesar da distância que nos separava.

Aos meus familiares em Recife, por terem sempre e me apoiado e me incentivado, com muito amor.

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Juliana Maldonado Marchetti, que esteve sempre ao meu lado, me trazendo não só os ensinamentos e conhecimentos profissionais, mas também apoio, incentivo e carinho em cada etapa que vivenciei. Obrigada pelo seu exemplo como profissional, pessoa e mulher, pela sua competência e dignidade.

Ao meu namorado Fabrício, sempre companheiro e amigo, que mesmo neste momento conturbado de nossas vidas, trouxe alegria, vida e muito amor a minha vida.

Às minhas amigas, Paloma e Danny, pela amizade, carinho e por todos os momentos que desfrutamos juntos e que ficarão marcados em minha memória, tendo a certeza que jamais serão esquecidos.

Aos meus colegas do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica que me ajudaram na conclusão deste trabalho, em especial a Daniel, Paulo, Luciana, Guilherme, Fabiana, Eduardo e Vilma.

Aos bons amigos que fiz aqui em Ribeirão Preto, Juliana Saraiva, Rejane, Mônica, Celso, Quintino, Aline, Carlos, Ricardo e Ana Claudia pelo carinho e pelos momentos que desfrutamos juntos.

Aos amigos de Recife, Dani e Fernando, que conviveram comigo aqui, por toda amizade e carinho.

Aos amigos, Júnior, Ana Flávia e Gorete, que mais do que companheiros foram como uma família para mim, onde encontrei apoio, amizade e incentivo para seguir em busca dos meus ideais.

À Janeide e toda sua família, por terem me recebido com tanta atenção e generosidade e pela amizade que se formou entre nós.

Às amigas e primas de Recife, Sabrina, Juliana, Andreza, Carina, Monalisa, Emanuela, Jussara, Roberta, Sueli e todas as outras que me mostraram que "verdadeiras amizades continuam a crescer mesmo a longas distâncias. E o que importa não é o que você tem na vida, mas quem você tem na vida. E que bons amigos são a família que nos permitiram escolher" (William Shakespear).

À minha prima Marta que me recebeu com especial atenção e disponibilidade quando estive no exterior, pelo seu exemplo como pessoa, solidária e profissional competente.

À todos os amigos do Centro Espírita Amor e Caridade, em especial ao Ricardo, a Érika e a todos do grupo que faço parte, por todo aprendizado, trabalho, amor, dedicação e compreensão durante o tempo que passamos juntos.

Ao orientador do meu mestrado em Recife Prof^o Dr. Davi Pereira de Santana, que me inspirou a lutar pelos meus ideais e a ir atrás dos meus sonhos, pela amizade e consideração.

À todos aqueles que colaboraram direta ou indiretamente para realização deste trabalho, em especial:

À Prof^a Dr^a Maria Vitória L. Badra Bentley, pela orientação e atenção durante os experimentos de permeação cutânea e outras fases do projeto.

Ao Prof^o Dr. Alberto Federman Neto, pela atenção e colaboração na execução deste trabalho.

À minha amiga Fábia, presente em todos os momentos, tornando-se não só a colega de trabalho, mas a amiga e a irmã que não tive. Obrigada pela sua amizade, companheirismo e incentivo.

À aluna de iniciação científica, Denise, que se empenhou bastante para a realização deste trabalho.

Aos técnicos do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da FCFRP-USP, Henrique e José Orestes, pela colaboração, amizade e apoio durante todas as fases do meu doutorado.

Aos funcionários da seção de pós-graduação pelo excelente serviço prestado.

A Faculdade de Ciências Farmacêuticas e todos que dela fazem parte.

Ao CNPq pelo apoio financeiro para o desenvolvimento deste projeto (processo n. 141677/2005-8).

SUMÁRIO

Lista de tabelas	iv
Lista de figuras	v
Lista de esquemas	ix
Resumo	x
Abstract	xi
1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA	1
1.1. A via tópica	2
1.2. O ácido retinóico	12
1.3. Sistemas de liberação microparticulados	27
2. OBJETIVOS	53
3. MATERIAL E MÉTODOS	55
3.1. Materials	56
3.2. Métodos	57
3.2.1. Padronização e validação da metodologia analítica do ácido retinóico utilizando CLAE	57
3.2.2. Preparação das micropartículas de quitosana	61
3.2.3. Preparação das micropartículas de alginato/quitosana	69
3.2.4. Caracterização das micropartículas	72
3.2.5. Estudo de interação fármaco-polímero	75
3.2.6. Estudo <i>in vitro</i> do perfil de liberação	76
3.2.7. Determinação da solubilidade do fármaco em tampão de fosfatos pH 7,4	77
3.2.8. Estudos <i>in vitro</i> de permeação e retenção cutânea	78

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	82
4.1.Desenvolvimento da metodologia analítica para quantificação de ácido retinóico por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	83
4.1.1. Obtenção do espectro de absorção do ácido retinóico na região do UV	
4.1.3. Validação da metodologia analítica	88
4.2. MICROPARTÍCULAS DE QUITOSANA	90
4.2.1. Micropartículas de Quitosana Obtidas por Emulsão Múltipla	90
4.2.1.1. Desenvolvimento do Método	90
4.2.1.2 Caracterização Físico-Química	91
4.2.2. Micropartículas de Quitosana Obtidas por Geleificação Ionotrópica	94
4.2.2.1. Desenvolvimento do Método	94
4.2.2.2. Caracterização Físico-Química	94
4.2.2.3. Estudo de interação fármaco-polímero utilizando DSC e FTIV	101
4.2.2.4. Determinação <i>in vitro</i> do perfil de liberação do ácido retinóico a partir das micropartículas estudadas	107
4.3. MICROPARTÍCULAS DE ALGINATO REVESTIDAS COM QUITOSANA.	111
4.3.1. Desenvolvimento do Método	111
4.3.2. Caracterização Físico-Química	112
4.3.3. Estudo de interação fármaco-polímero utilizando DSC e espectroscopia de FTIV	116
4.3.4. Estudo <i>in vitro</i> do perfil de liberação	119
4.3.5. Permeação e retenção cutânea in vitro	120
5. CONCLUSÕES	126

REFERÊNCIAS	128
ANEXOS	143

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Constituintes utilizados na preparação das micropartículas de quitosana pelo método de emulsão múltipla	61
Tabela 2. Parâmetros variados na preparação das micropartículas obtidas a partir do método da emulsão múltipla.	64
Tabela 3. Parâmetros avaliados na preparação das micropartículas de quitosana pelo método de geleificação ionotrópica.	68
Tabela 4. Parâmetros modificados na preparação das micropartículas de alginato/quitosana	71
Tabela 5. Quantidades de solução metanólica de ATRA adicionadas nas fitas adesivas contendo o EC ou na pele sem o EC para estudo de recuperação do fármaco	79
Tabela 6. Parâmetros utilizados para a elaboração da curva analítica do ácido retinóico.	85
Tabela 7. Valores obtidos na avaliação da precisão e exatidão intra-ensaio.	88
Tabela 8. Valores obtidos na avaliação da precisão e exatidão inter-ensaio.	88
Tabela 9. Valores do rendimento do processo e eficiência de encapsulação das micropartículas de quitosana-TTP preparadas por geleificação ionotrópica	100
Tabela 10. Soluções de tampão de fosfatos pH 7,4 que foram utilizadas, solubilidade e coeficientes de solubilidade do ácido retinóico.	108
Tabela 11. Valores do rendimento do processo e eficiência de encapsulação das micropartículas de alginato/quitosana	115
Tabela 12. Valores obtidos nos ensaios de recuperação do ácido retinóico a partir de três (3) concentrações diferentes (25, 10 e 1μg/mL), extraído das amostras da pele	121

τ

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama simplificado da estrutura da pele	3
Figura 2. Representação esquemática da bicamada lipídica do corneócito	4
Figura 3. Representação esquemática dos mecanismos de penetração de substâncias (vias intercelular e transcelular) através do estrato córneo	8
Figura 4. Representação esquemática dos mecanismos de penetração de substâncias (via transepidémica e via apêndice) através da pele humana, 1 = glândula sebácea, 2 = via transepidérmica e 3 = folículo piloso	10
Figura 5. Estrutura química do ácido retinóico	22
Figura 6. (a) Estrutura da quitosana [poli(□1-4-D-glicosamina)]. (b) Estrutura da quitosana após crosslinking	31
Figura 7. Representação esquemática da preparação de microparticulas de quitosana pelo método da emulsão crosslinking	32
Figura 8. Representação esquemática da preparação de microparticulas de quitosana pelo método da emulsão múltipla	33
Figura 9. Representação esquemática da preparação de micropartículas de quitosana pelo método coacervação/precipitação	35
Figura 10. Representação esquemática da preparação de micropartículas de quitosana pelo método spray-drying	36
Figura 11. Representação esquemática da preparação de micropartículas de quitosana pelo método de geleificação ionotrópica	37
Figura 12. Mecanismo de liberação de fármacos a partir de sistemas particulados	45
Figura 13. Representação esquemática da influência do tamanho das micropartículas nas vias de penetração cutânea.	50

Figura 14. Estruturas alvo do folículo piloso (FP) e seus	
níveis correspondentes. BEE, bainha epitelial externa; BEI,	
bainha epitelial interna; GS, glândula sebácea, MPM,	
músculo pilomotor	51
Figura 15. Fotografia do spray atomizador desenvolvido no	
laboratório de Tecnologia Farmacêutica	66
assitutorio de recinciogia rarmaceatica:	00
Figura 16. Representação esquemática do princípio do	
método utilizado para a determinação do tamanho das	
micropartículas utilizando o analisador de tamanho de	
partícula por difração de lazer, modelo LSTM 13 320, Beckman	
Coulter.	73
Figura 17. Espectro de absorção do ácido retinóico na região	
de 250-500 nm em solução metanólica de 5 µg/mL, cela de	
quartzo de 1 cm de caminho óptico; temperatura de 25°C +	
2°C; Espectrofotômetro UV visível – BECKMAN – DU-70	83
2 c, Especialistanica e visiva Escimin. Ec ve illimin	00
Figura 18. Representação da curva analítica do ácido	
retinóico obtido por CLAE (1,0 – 25,0 μg/mL). Os resultados	
_ , , , , , , , , , , , , , , , , , , ,	
apresentados representam a média ± desvio padrão de três	
determinações (n = 3). Equação da reta: y =133836x - 12029;	0.0
coeficiente de correlação linear: (r) = 0,9999	86
Figura 19. Representação do cromatograma do ácido	
retinóico obtido por CLAE. As análises foram realizadas em	
cromatógrafo modelo SPD 10 AVP, equipado com detector	
UV-VIS (348 nm), bomba LC-10 AD e computador com	
programa LC-10. Coluna C ₁₈ fase reversa Lichrocart® (Merck,	
$185 \times 5 \text{ mm}$, 5µm) e pré-coluna 4 x 4 mm (5µm) (25 ± 1°C).	
Fase móvel: água acidificada com 1,2% (v/v) de ácido acético	
glacial, acetonitrila, isopropanol e metanol; fluxo de	
	07
1,2mL/minuto e volume injetado correspondente a 20μL	87
T'. 00 D. C. 1 '	
Figura 20: Fotografia das micropartículas preparadas a	
partir do método da emulsão múltipla, obtidas por M.O.	
(aumento de 360X).	91
Figura 21: Fotografias das micropartículas de quitosana	
preparadas a partir do método de geleificação ionotrópica,	
obtidas por M.O. (aumento de 360X)	95
Figura 22. Fotomicrografias das micropartículas (A) -	
preparadas com quitosana HCMF e (B) – preparadas com	
quitosana DCMF (aumento de 15000X)	96
· /	

Figura 23. Fotomicrografias das micropartículas (A)	
preparadas com diclorometano (aumento de 15000X) e (B)	
preparadas com clorofórmio (aumento de 5000X)	97
Figura 24. Fotomicrografias das micropartículas (A)	
preparadas com solução de TTP pH 5,0 e (B) preparadas com	
solução de TTP pH 8,5 (aumento de 15000X)	99
Figure 25. Curvas termoanalíticas obtidas por DSC do	
fármaco puro (A), da quitosana isolada (B), das	
micropartículas de quitosana (C) e da mistura física	
fármaco:polímero (1:1) (D)	102
Figura 26. Espectro de FTIV da quitosana isolado	103
5.	104
Figura 27. Espectro de FTIV do ácido retinóico isolado	104
T'	
Figura 28. Espectro de FTIV da mistura física	
fármaco:polímero (1:1).	104
Figure 20 Fancetre de ETIV des missenantiques estudades	105
Figura 29. Espectro de FTIV das micropartículas estudadas	103
Figura 30. Perfil de liberação in vitro do ácido retinóico a	
partir das micropartículas de quitosana preparadas pelo	
método de geleificação ionotrópica (spray de 0,7 mm de	100
diâmetro, vazão do ar de 20ml/min e quitosana HCMF) (n=5)	109
Figura 31. Fotografias das micropartículas de	
alginato/quitosana preparadas pelo método de geleificação	
ionotrópica, obtidas por M.O. (aumento de 360x)	112
ionocropica, escidas por inier (admente de econ).	
Figura 32. Fotomicrografia das micropartículas de	
alginato/quitosana utilizando 0,1% ácido retinóico obtidas	
por MEV (aumento de 15000X).	113
r (
Figura 33. Fotomicrografia das micropartículas de	
alginato/quitosana utilizando 0,5% ácido retinóico obtidas	
por MEV (aumento de 4000X).	113
Figure 34. Curvas termoanalíticas obtida por DSC do	
fármaco puro (A), micropartículas de alginato/quitosana (B)	
alginato de sódio (C), e mistura física fármaco:polímero (1:1)	
(D)	116
Figura 35. Espectro de FTIV do alginato de sódio isolado	117
Figura 36. Espectro de FTIV da mistura física	
alginato/quitosana (1:1)	118

Figura 37. Espectro de FTIV das micropartículas de	110
alginato/quitosana estudadas	118
Figura 38. Perfil de liberação in vitro do ácido retinóico a partir das micropartículas de alginato preparadas utilizando	110
soluções de quitosana a 0,2% e 0,4% (n=5)	119
Figura 39. Distribuição do ácido retinóico nas camadas da pele de orelha de porco após 12h (*estrato córneo)	123

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Mecanismo de ação do ácido retinóico na pele mostrando a entrada do ácido retinóico nas células epidérmicas, a conversão dos retinóides em ácido retinóico, a	
interação com receptores RAR/RXR nucleares e a ativação da transcrição gênica que resultará em resposta retinóide	15
Esquema 2. Vias metabólicas do ácido retinóico	18
Esquema 3 . Métodos para a preparação de micropartículas de quitosana	30
Esquema 4. Representação esquemática da preparação das micropartículas de quitosana pelo método de emulsão múltipla descrito anteriormente por GENTA et al. (1997)	63
Esquema 5. Representação esquemática da preparação das micropartículas de quitosana por geleificação ionotrópica através da técnica descrita anteriormente por KO et al. (2002).	67
Esquema 6. Representação esquemática da preparação das micropartículas de alginato/quitosana por geleificação ionotrópica através da técnica descrita anteriormente por SEZER; AKBUGA (1999).	70

RESUMO

Este trabalho propõe o desenvolvimento de micropartículas para veiculação deste fármaco na pele, aumentando a estabilidade da molécula e proporcionando uma liberação sustentada, o que resulta na otimização da terapia, visto que ocorre a redução dos efeitos colaterais.

As micropartículas foram produzidas por três métodos diferentes, os dois primeiros utilizando a quitosana como polímero e o último utilizando uma associação de alginato com quitosana. As micropartículas de quitosana resultaram em interação do fármaco veiculado com o polímero e desta forma a sua utilização como sistema de liberação para veiculação do fármaco estudado foi descartada.

As micropartículas de alginato/quitosana encapsularam efetivamente o fármaco, resultando em partículas irregulares com diâmetro médio de 148µm. Elas apresentaram liberação sustentada do ácido retinóico por um período compatível com sua utilização tópica e por isso, parecem ser adequados para garantir estabilidade ao fármaco. Além disso, elas diminuíram a retenção do fármaco no estrato córneo quando comparado ao fármaco livre, mantendo seus níveis nas outras camadas mais profundas da pele. Esse direcionamento sítio-específico poderia diminuir a sua irritação dérmica, possibilitando, dessa forma, juntamente com o aumento de sua estabilidade, a obtenção de efeitos terapêuticos com a utilização de doses menores.

Também não foram observadas interações entre o fármaco e o polímero demonstrando que a matriz de alginato foi capaz de proteger o fármaco do contato e da interação com a quitosana. Além disso, o método utilizado mostrou ser simples e rápido, realizado em condições amenas, sem o inconveniente da utilização de agentes cross-linking químicos tóxicos, como o glutaraldeído.

ABSTRACT

This study proposes the development of microparticles for drug delivery into the skin, thus increasing molecule stability and providing sustained release that results in therapy optimization as a result of reduction in side-effects.

The microparticles were produced by three different methods. The two first methods used chitosan as a polymer, and the third utilized a chitosan-alginate association. The chitosan microparticles resulted in the interaction of the delivered drug with the polymer; hence, its use as a release system for delivery of the studied drug was disregarded.

The alginate/chitosan microparticles effectively encapsulated the drug, resulting in irregular particles with a mean diameter of 148µm. They exhibited sustained release of retinoic acid for a period of time that was compatible with topical application and, therefore, seem to be suitable to ensure drug stability. Additionally, the microparticles decreased drug retention in the stratum corneum as compared to the free drug, thus keeping its levels in other deeper layers of the skin. Such site-specific direction could reduce dermal irritation, consequently enabling, conjointly with stability increase, the achievement of therapeutic effects with the use of smaller doses.

Drug-polymer interactions were also not observed, showing that the alginate matrix was capable of protecting the drug from the contact and interaction with chitosan. Besides, the applied method proved to be simple and fast. It can be performed in mild conditions without the inconvenience of using toxic cross-linking chemical agents, such as glutaraldehyde.

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

1.1. A VIA TÓPICA

1.1.1. Anatomia e fisiologia da pele

pele constitui uma via potencial de administração de fármacos devido ao fácil acesso e à sua grande superfície. Representa um dos órgãos mais extensos do corpo, cobrindo uma superfície de aproximadamente 1,73m² sendo banhada por 1/3 do sangue, correspondendo a 5% da massa corporal (BARRY,1983; CHIEN, 1992).

Está localizada na superficie corporal, separando órgãos vitais do meio exterior, protegendo o organismo de substâncias estranhas de natureza química, física e microbiológica e impedindo a saída de compostos fisiológicos como a água. Ela desempenha também um importante papel na manutenção da temperatura corporal e na regulação da pressão sangüínea (JEANMOUGIN, 1984).

Possui alta resistência, fator essencial para sua função de proteção e é constituída por três camadas, do exterior para o interior: a epiderme, a derme e o tecido subcutâneo ou hipoderme (Figura 1).

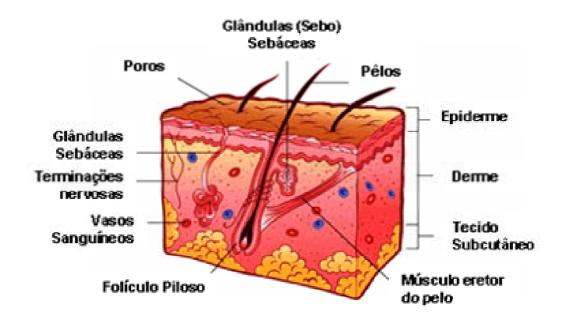


Figura 1. Diagrama simplificado da estrutura da pele (disponível em http://kidshealth.org/kid/body/images_45364/skin325.gif – acesso em 06/03/2007).

A epiderme é recoberta pela camada córnea e possui espessura entre 0,1 a 0,2 mm. Representa a principal barreira à penetração, não contém vasos sangüíneos e é formada basicamente por tecido epitelial estratificado, queratinizado ou não. Possui uma película de material emulsificado composto por complexo de sebo, suor e lâmina córnea descamativa, além de uma capa gasosa chamada manto gasoso, constituída principalmente por vapores de água provenientes da volatilização corporal (MOSER et al., 2001).

A epiderme é dividida em duas camadas: o estrato córneo e a epiderme viável. O estrato córneo constitui a camada mais superficial da pele e possui uma estrutura estratificada, hidrófila-lipófila, formada por células sem vitalidade chamadas corneócitos (WILLIAMS; BARRY, 1992).

Essas células achatadas de formato hexagonal são compostas por queratina e água envolvidas por um envelope protéico e bicamadas lipídicas sobrepostas, que incorporam água em sua estrutura, como mostra a Figura 2 (BUCK, 2004).

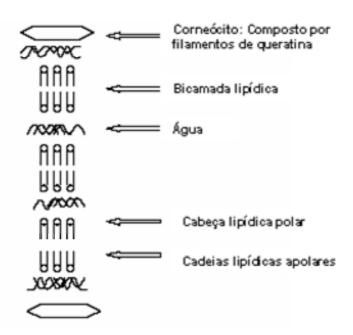


Figura 2. Representação esquemática da bicamada lipídica do corneócito (adaptado de BUCK, 2004).

A epiderme viável é subdividida em quatro partes: estrato lúcido, estrato granuloso, estrato espinoso e estrato germinativo. Contém queratinócitos em vários estágios de diferenciação, melanócitos, células de Langerhans (importante no reconhecimento de antígenos e resposta imune) e células Merkel (envolvidas na percepção sensorial) (ASBILL; MICHNIAK, 2000). É separada da derme pela junção dermo-epidérmica e suas quatro camadas, do interior para a superfície, representam a transformação de um queratinócito basal ou germinativo em um queratinócito córneo ou

corneócito (ASBILL; MICHNIAK, 2000, BUCK, 2004, WILLIAMS; BARRY, 1992).

A derme, segunda camada da pele, possui espessura entre 2 a 4mm, sendo constituída de uma matriz de proteínas fibrosas imersas num tecido coloidal amorfo. Apresenta-se rica em capilares sangüíneos, canais linfáticos e terminações nervosas, além de conter os segmentos inferiores das glândulas sebáceas e folículos pilosos. A elasticidade da derme é atribuída às fibras protéicas presentes, incluindo colágeno (tipo I e III) e elastina. A derme contém também fibroblastos, macrófagos, mastócitos e leucócitos. Ela executa assim, papel de sustentação e de nutrição e divide-se em duas partes: derme papilar ou tecido conjuntivo frouxo e derme reticular ou tecido conjuntivo denso (WILLIAMS; BARRY, 1992; FOLDVARI, 2000, MOSER et al., 2001).

A hipoderme é formada por tecido conjuntivo frouxo e contém células adiposas que fabricam e estocam lipídeos, sendo responsável pelo isolamento térmico e proteção mecânica (WILLIAMS; BARRY, 1992).

A pele contém ainda, dois tipos de órgãos anexos: as glândulas sudoríparas, constituídas por um longo tubo que penetra na hipoderme, e o aparelho pilossebáceo, constituído por uma depressão cutânea (o folículo piloso ou FP), no qual o pêlo insere-se, e por uma bainha que o circunda, por onde escoa o sebo secretado pela glândula sebácea, preenchendo os espaços livres da bainha.

1.1.2. A função barreira da pele

função barreira da pele é principalmente atribuída ao estrato córneo que apresenta permeabilidade à água 1000 vezes menor que a maioria das outras membranas biológicas. Essa camada superficial possui espessura entre 10-20µm e é altamente hidrofóbica, formada por 10 a 15 camadas de corneócitos interligados por ligações chamadas desmossomos que constituem uma barreira para prevenir a perda de fluidos do corpo e a absorção de compostos estranhos (FOLDVARI, 2000). O estrato córneo, ao contrário das outras membranas biológicas, não é composto por fosfolipídios, mas é rico em ceramidas e lipídios neutros que estão arranjados em uma bicamada lipídica (conforme mostrado na Figura 2). Assim, a função barreira da pele parece também depender do teor e da composição dos lipídios e, em particular, do arranjo estrutural das matrizes lipídicas intercelulares e da bicamada lipídica que envolve as células do estrato córneo (SUHONEN; BOWSTRA; URTTI, 1999). Os principais lipídios intercelulares são as ceramidas (41%), o colesterol (27%) e seus ésteres (10%), os ácidos graxos (9%) e uma pequena fração de sulfato de colesterol (2%). Estudos em que lipídios relativamente polares e não polares foram seletivamente extraídos com éter de petróleo e acetona, respectivamente, indicaram que os lipídios mais polares são mais importantes para a (FOLDVARI, barreira da pele integridade da 2000). Um estruturalmente heterogêneo contendo sete ceramidas diferentes representa os lipídios mais polares presentes no estrato córneo e, devido às suas cadeias alifáticas saturadas e longas, parecem ser adequados para a formação das membranas impermeáveis altamente ordenadas que promovem resistência às variações na temperatura, exposição à radiação UV e à oxidação pelo ar (SUHONEN; BOWSTRA; URTTI, 1999).

Embora o estrato córneo represente a principal barreira da pele, sabese que na ausência de integridade desta camada, uma outra barreira a permeação de fármacos permanece em outra camada da pele, a epiderme viável. A função de barreira desta está principalmente relacionada aos canais lipídicos intercelulares e aos vários fenômenos de partição (FOLDVARI, 2000, ASBILL; MICHNIAK, 2000).

1.1.3. Penetração de fármacos através da pele

pele, conforme exposto anteriormente, tem a função essencial de proteger o organismo da desidratação e das agressões exteriores. Ela pode ser, desta forma, mais ou menos permeável às substâncias químicas e permitir a passagem de fármacos em certas condições, podendo ser considerada uma interface terapêutica. A permeação das camadas que formam a pele ocorre por difusão passiva através de duas vias: a via transepidérmica, que compreende a penetração transcelular (através das células) e a penetração intercelular (entre as células), e via apêndice (através dos folículos pilosos e glândulas sudoríparas) (Figuras 3 e 4).

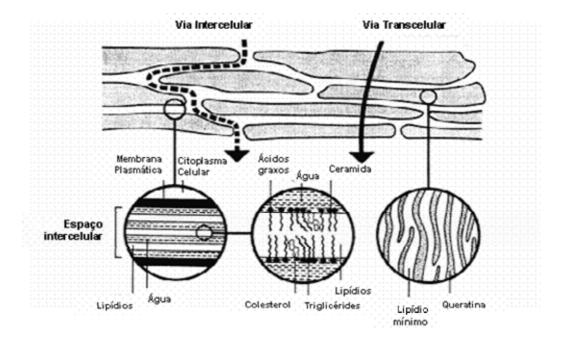


Figura 3. Representação esquemática dos mecanismos de penetração de substâncias (vias intercelular e transcelular) através do estrato córneo (adaptado de BARRY, 2001).

Tem havido grande discussão nas últimas décadas sobre qual via apresentaria ação predominante na penetração de substâncias na pele, mas evidências experimentais sugerem que sob condições normais a via predominante é a intercelular, ou seja, difundindo-se pela bicamada lipídica entre as células (HADGRAFT, 2004). Entretanto, de uma forma geral, substâncias polares e não polares podem se difundir através dos variados mecanismos.

A bicamada lípidica forma uma fase contínua dentro do estrato córneo e constitui a principal via para moléculas pequenas e não carregadas atravessarem esta barreira (BUCK, 2004). A distância difusional percorrida por essas moléculas nesta via é muito maior que a espessura do estrato córneo (10-20µm) e têm sido estimada em aproximadamente 500µm. Além

disso, esse espaço intercelular contém lipídios estruturados, por isso o fármaco permeante tem que atravessar uma variedade de domínios hidrofílicos e lipofílicos antes de alcançar a epiderme viável (HADGRAFT, 2004).

A via intracelular é geralmente a via predominante para moléculas mais polares (hidrofílicas), já que os componentes celulares são predominantemente de natureza aquosa (BUCK, 2004). Nesta via, as moléculas atravessam diretamente o estrato córneo e a barreira limitante são as bicamadas lipídicas que também devem ser atravessadas.

A via apêndice (Figura 4) possui área superficial bastante pequena, correspondendo a aproximadamente 0,1% da superfície da pele e, segundo alguns autores, contribui, de forma insignificante para a penetração das substâncias na pele (SUHONEN; BOWSTRA; URTTI, 1999, BARRY, 2001). Contudo, ela sido utilizada para o transporte rápido de várias moléculas, incluindo principalmente algumas macromoléculas e íons, já que os apêndices oferecem poros criando um desvio à barreira do estrato córneo (SUHONEN; BOWSTRA; URTTI, 1999, BARRY, 2002).

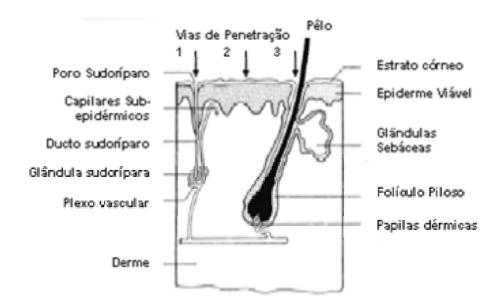


Figura 4. Representação esquemática dos mecanismos de penetração de substâncias (via transepidémica e via apêndice) através da pele humana, 1 = glândula sebácea, 2 = via transepidérmica e 3 = folículo piloso (adaptado de BARRY, 2002).

Desta forma, as três vias não são utilizadas exclusivamente e, a maioria das moléculas, atravessará o estrato córneo utilizando uma combinação delas (WILLIAMS, 2003, BUCK, 2004).

Então, embora a pele constitua uma barreira muito eficaz, ela pode ser atravessada por pequenas quantidades de substâncias capazes de penetrar nas camadas córneas e, em alguns casos, chegar a uma absorção sistêmica. Nesse processo, o estrato córneo constitui a principal barreira, enquanto a epiderme e a derme se comportam como um gel aquoso, apresentando assim, efeito reservatório. As doses diárias passíveis de absorção pela pele são bastante baixas, o que requer a administração de fármacos de grande potência para obtenção do efeito desejado. Além disso,

um bom fármaco para administração cutânea deve possuir baixa massa molecular, boa solubilidade em água e em óleo e não deve ser irritante ou sensibilizante cutâneo (SANTI, 1999). É importante conhecer exatamente o grau de penetração, pois para determinados princípios ativos, uma penetração profunda pode provocar intoxicações (BONNABRY,1999).

1.2. O ÁCIDO RETINÓICO

1.2.1. Aspectos farmacológicos do ácido retinóico tópico

s vitaminas e os antioxidantes têm sido bastante utilizados topicamente, pois atuam protegendo e possibilitando a neutralização de radicais livres, moléculas altamente reativas, que causam danos significativos nas biomembranas e no DNA. Algumas vitaminas são ainda benéficas à pele devido a outras ações como, supressão da pigmentação, estimulação da produção do colágeno, refinamento da queratinização e ação antiinflamatória (LUPO, 2001).

A vitamina A e seus derivados apresentam aplicações terapêuticas principalmente devido à capacidade de regular o crescimento e a diferenciação de células epiteliais. Apresentam ação antioxidante, conferindo assim, fotoproteção e restauração da pele pela neutralização de radicais livres. O ácido retinóico é considerado o mais bioativo dos retinóides para modulação das funções da pele, além de que, todos os outros retinóides convertem-se neste produto para exercerem os seus efeitos benéficos na pele (LUPO, 2001).

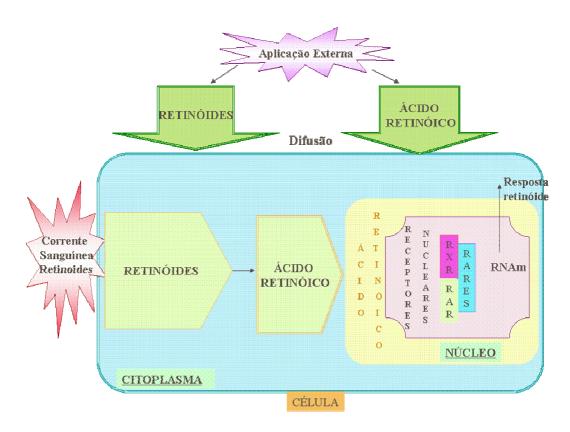
Radicais livres são os principais causadores do envelhecimento prematuro da pele, responsável pelo aparecimento de rugas, aspereza ou falta de pigmentação. Eles atacam as células na parte superficial da epiderme (os queratinócitos) e degradam os fibroblastos (colágeno e elastina) da derme, podendo inclusive lesar as cadeias de DNA, proteínas,

carboidratos, lipídios e as membranas celulares na parte mais profunda da epiderme, o que pode ocasionar, em casos mais graves, câncer. A principal fonte destas moléculas produzidas no organismo é o próprio metabolismo normal do oxigênio. Elas são produzidas a partir da energia recebida por um átomo de oxigênio extremamente reativo que perdeu um elétron de sua camada mais externa. Essas moléculas podem ser formadas também pelos efeitos do sol, da contaminação por tabaco e da ingestão de bebida alcoólica, acelerando o processo de envelhecimento devido à morte ou ao mau funcionamento das células (BUCHLI, 2002).

Os retinóides, em geral, atuam na reparação de danos na pele causados principalmente por raios solares através de mecanismos restaurativos e pela limitação do dano existente. O ácido retinóico bloqueia a indução UV na matriz das metaloproteínas, família de enzimas responsáveis pela quebra do colágeno, o maior constituinte da derme. Atua também através da estimulação dos queratinócitos e da proliferação de fibroblastos, que resulta em pele mais lisa e em uma maior produção de colágeno, tornando-a, assim, mais espessa e resistente a traumas (WEINSTEIN et al., 1991; GRIFFITHS; VOORHEES, 1995). Este efeito promotor na síntese de colágeno pode explicar também o desaparecimento progressivo de linhas finas e rugas.

A ação do ácido retinóico e dos retinóides é mediada pela ação de seis (6) receptores nucleares conhecidos, os receptores do ácido retinóico (RAR α , β e γ) e os receptores X dos retinóides (também chamados rexinoides, RXR α , β e γ) (NJAR et al. 2006). Cada um desses receptores é codificado por genes distintos mediando funções biológicas únicas em células e tecidos, e são

membros da família de receptores nucleares hormonais esteróides/tireóides (SHAPIRO; SALIOU, 2001). O ácido trans-retinóico, também chamado tretinoína ou simplesmente ácido retinóico (ATRA), atua apenas nos sítios de receptores RARs presente nos heterodímeros RAR/RXR enquanto seu isômero o ácido cis-retinóico (estereoisômeros: ácido 9-cis, 11-cis e 13-cisretinóico) é o ligante dos receptores RXR presente nos homodímeros RXR/RXR. A maioria das atividades ocorre pela ligação do ácido retinóico ao sítio RAR presente nos heterodímeros RAR/RXR já que os receptores RXR sozinhos são incapazes de ativá-los e os retinóides presentes na pele normalmente convertem-se neste fármaco para exercerem suas atividades (NJAR et al. 2006). Esses heterodímeros funcionam como proteínas reguladoras da transcrição por se ligarem a regiões do DNA chamadas "elementos responsáveis pelo ácido retinóico" (RAREs) e promoverem a ativação da transcrição gênica. Assim, sob condições fisiológicas, o ácido retinóico é o ligante primário dos receptores RAR regulando a expressão gênica na pele humana (SHAPIRO; SALIOU, 2001). O mecanismo de ação do ácido retinóico na pele está apresentado no Esquema 1.



Esquema 1. Mecanismo de ação do ácido retinóico na pele mostrando a entrada do ácido retinóico nas células epidérmicas, a conversão dos retinóides em ácido retinóico, a interação com receptores RAR/RXR nucleares e a ativação da transcrição gênica que resultará em resposta retinóide.

KLIGMAN et al. (1986) relataram o primeiro estudo para verificação da eficácia de um creme contendo ácido retinóico na reversão dos danos solares sobre a pele facial. Foram observadas alterações clínicas discretas, embora, fragmentos de biópsia da pele apresentassem muitos efeitos histológicos como: espessamento da epiderme previamente atrófica, eliminação de displasia e atipia, dispersão mais uniforme da melanina e a formação de colágeno dérmico e novos vasos sanguíneos.

Vários estudos subseqüentes, duplo-cego, utilizando creme contendo este fármaco confirmaram, de maneira geral, os efeitos observados por KLIGMAN et al., e também resultaram em melhoria clínica estatisticamente significativa (WEISS et al., 1988; LEYDEN et al., 1989; LEVER et al., 1990).

O ácido retinóico apresentou também ação no tratamento de estrias, onde uma diminuição da extensão e da amplitude das marcas em 80% das pacientes foi verificada (FISHER et al., 1997; ELSON, 1994; KANG et al., 1996). Sua utilização tópica demonstrou ainda, efeitos benéficos no tratamento de lesões hiperpigmentadas de vários tipos tais como aquelas associadas com dano solar em pacientes brancos e aquelas causadas por inflamação ou melasma em pacientes negros e também no tratamento de celulite (SHAPIRO; SALIOU, 2001; RAFAL et al., 1992; BULENGO-RANSBY et al., 1993; KIMBROUGH-GREEN et al., 1994).

Há ainda um grande interesse na utilização do ácido retinóico para o tratamento de doenças dermatológicas como acne e psoríase. Ele tem sido utilizado como primeira linha de tratamento tópico para acne inflamatória e não-inflamatória há 3 décadas, atuando nos três dos quatro fatores patogênicos da acne (SUARAT, 1985; LUPO, 2001).

A acne é a doença de pele mais comum em humanos e afeta mais de 80% da população em diferentes graus (SHAPIRO; SALIOU, 2001). A etiologia da acne é multifatorial apresentando principalmente seborréia, hiperqueratinização folicular, colonização bacteriana pela *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*) e inflamação na patogênese (YONKOSKY; POCHI, 1986). O ácido retinóico atua normalizando a descamação folicular resultante da hiperqueratinização anormal do epitélio folicular promovendo o fluxo do

sebo dos comedões pré-existentes, inibindo a formação de novos comedões e reduzindo assim o crescimento da *P. acnes*. Acredita-se que esses efeitos promovidos pelo ácido retinóico são mediados pelo seu receptor na pele, o RAR-α (LEYDEN; SHALITA, 1986).

1.2.2. Metabolização do ácido retinóico

ácido retinóico é rapidamente metabolizado pelas enzimas do citocromo P450 levando a uma variedade de metabólitos polares. O citocromo P450 (CYP), principalmente do tipo CYP26, é facilmente induzido por este fármaco e as suas enzimas eficientemente o convertem nos seus derivados hidroxilados (Esquema 2). Essas enzimas apresentam alta especificidade pelo ácido retinóico e podem funcionar como reguladores importantes da diferenciação e como possíveis moduladores de doenças mediante controle das concentrações dos retinóides e da homeostase (NJAR, 2002; NJAR et al., 2006). Isso enfatiza a importância de manter os níveis fisiologicamente normais de ácido retinóico.

Esquema 2. Vias metabólicas do ácido retinóico (NJAR, 2002).

Embora seu potencial terapêutico seja bastante conhecido, um dos grandes inconvenientes na aplicação clínica é a resistência obtida, que é atribuída a indução do catabolismo das CYPs, principalmente CYP26 (NJAR et al., 2006). Em adição, o metabolismo deficiente de ácido retinóico pelos CYP pode gerar uma condição de deficiência de retinóides, caracterizada pela hiperqueratinização e descamação ou piora do quadro apresentado em doenças dermatológicas como acne, psoríase e ictiose (NJAR et al., 2006).

Atualmente, a percepção de que o metabolismo do ácido retinóico pode ser responsável pela sua limitada eficácia tem levado os pesquisadores a desenvolver inibidores da ação da CYP e assim elevar a concentração de ácido retinóico aos níveis normais ou terapêuticos. Os primeiros inibidores testados foram os antimicóticos com conhecida atividade potencial na inibição da CYP, tais como cetoconazol, miconazol e clotrimazol (NJAR et al., 2006). Ainda assim, os estudos com esses inibidores são bem escassos e o único inibidor avaliado clinicamente em humanos foi o liarozol, produzido

pela Janssen Research Foundantion (atualmente Jonhson; Jonhson Pharmaceutical Reasearch and Development), que descontinuou o estudo devido à baixa eficácia e aos efeitos adversos obtidos (NJAR et al., 2006).

Outras estratégias para minimizar a resistência causada pela ativação do sistema metabólico da CYP incluem a administração de doses intermitentes, a combinação com alfa-interferon e a administração de ácido retinóico encapsulado em lipossomas (REGAZZI et al., 1997). PARTHASARATHY; MEHTA (1998) utilizaram ácido retinóico veiculado em lipossomas e compararam a sua metabolização com o fármaco livre, verificando que os lipossomas resultaram em diminuição significativa da velocidade de metabolização do fármaco quando comparado com sua forma livre.

1.2.3. Aspectos toxicológicos do ácido retinóico tópico

1.2.3.1. A dermatite retinóide:

omo efeitos adversos da utilização tópica do ácido retinóico, a dermatite retinóide é relatada em grande parte dos pacientes submetidos à terapia convencional com ácido retinóico, evento caracterizado por eritema macular, inflamação localizada, xerose e discreta descamação, sinais que correspondem histologicamente as alterações na camada córnea e hiperplasia epidérmica (KANG; VOORHEES, 1998). Essas alterações histológicas resultam, em princípio, na proliferação aumentada de queratinócitos e levam à descamação, ocorrendo também a supressão da atividade das glândulas sebáceas com conseqüente diminuição da produção

do sebo, que resultaria na xerose. Uma vez que esses efeitos acompanham a aplicação tópica do ácido retinóico, muitos autores têm acreditado que este tipo de irritação dérmica seria o responsável por alguns dos efeitos dos retinóides. Atualmente, alguns estudos tratamentos nos fotoenvelhecimento têm mostrado a ação específica deste fármaco sob receptores endógenos. Em 1995, GRIFFITHS; VOORHEES demonstraram que não houve diferença significativa na eficácia clínica no tratamento do fotoenvelhecimento utilizando concentrações de 0,025% e 0,1%. Contudo o grau de irritação diferiu bastante entre os dois grupos, mostrando que não há qualquer correlação entre a eficácia clínica e o nível de irritação. Desta forma, seria totalmente desnecessário forçar o uso do ácido retinóico a ponto de desenvolver dermatite retinóide ativa para alcançar máxima melhora clínica da pele envelhecida. Alguns estudos realizados têm demonstrado que a hiperplasia epidérmica e a descamação têm ação mediada por receptores, mas a ativação destes receptores RARs não parece estar associada com o eritema e o desconforto (queimação, ardor, prurido etc.) da dermatite retinóide (GRIFFITHS; VOORHEES, 1993; FENG et al., 1997; KANG; VOORHEES, 1998). Em 1997, THACHER et al. observaram em seu estudo que o aparecimento de citotoxidade em cultura de células não estava relacionado com o aparecimento de hiperplasia epidérmica. Este fato pode levar a acreditar que a melhora clínica pode ser alcançada sem o uso excessivo do fármaco, minimizando desta maneira a ocorrência de irritação na pele. Apesar de algum grau de descamação ser inevitável devido à ativação de receptores, o efeito associado ao eritema pode ser evitado,

melhorando a segurança da utilização do ácido retinóico tópico e a aceitação pelo paciente.

1.2.3.2. A absorção sistêmica:

om relação aos efeitos adversos sistêmicos, a aplicação tópica não apresentou absorção percutânea capaz de alterar significativamente os níveis endógenos desta substância e de seus metabólitos (LATRIANO et al., 1997). Entretanto, vários relatos de casos individuais de defeitos congênitos associados com a utilização de ácido retinóico tópico durante o primeiro trimestre de gestação foram descritos na literatura (LIPSON et al., 1993; CAMERA; PEGLIASCO, 1992). Contudo, estudos realizados em pacientes utilizando veículos tópicos contendo este fármaco não mostraram o aparecimento de malformações congênitas atribuídas ao produto (JOHNSON et al., 1994; JICK et al., 1993; WALS et al., 1991).

1.2.4. Estabilidade do ácido retinóico

evido à presença de ligações duplas conjugadas, retinóides em geral são compostos instáveis, facilmente oxidados ou isomerizados especialmente na presença de oxidantes (incluindo o ar), luz e calor excessivo (Figura 5). Eles são também sensíveis a ácidos fortes e solventes que possuam oxigênio ou peróxido dissolvido (GATTI et al., 2000). Solventes anidros contendo traços de ácido provocam modificações estruturais nos retinóides e por isso a utilização de ácidos

fortes deve ser evitada. Soluções alcalinas geralmente não promovem alterações estruturais desses compostos (GATTI et al., 2000).

Figura 5. Estrutura química do ácido retinóico.

O ácido retinóico sofre extensa degradação quando exposto a luz para produzir diferentes isômeros principalmente em soluções alcoólicas (HUANG et al., 2004; LIM et al., 2004; IOELE et al., 2005). Uma degradação menor, mas também bastante significativa deste fármaco é encontrada em outros meios como solução de polissorbato 80 a 1% e óleos (BRISAERT et al., 2001; HUANG et al., 2004; LIM et al., 2004).

Estudos de estabilidade de várias formulações comerciais contendo ácido retinóico foram também realizados. Os efeitos da temperatura e da exposição à luz foram avaliados sendo encontrada notável degradação (SISCO et al., 1996; GATTI et al., 2000; NYIRADY et al., 2002). Uma loção deste fármaco contém somente 30% da concentração inicial após 10 minutos de irradiação (BRISAERT; PLAIZIER-VERCAMMEN, 2000; BRISAERT et al., 2001). Cremes e soluções contendo ácido retinóico e conservadas sob proteção da luz em temperatura de 2-8 °C apresentam aproximadamente 86-87% da concentração inicial deste fármaco após 90 dias, enquanto que nas temperaturas de 37 e 50 °C apresentam 57-72% da

concentração inicial (GATTI et al., 2000). A fotoestabilidade do gel contendo 0,1% ácido retinóico encapsulado em micropartículas (Retin-A micro®) e do gel de ácido retinóico 0,025% (Retin-A®), isolado ou em combinação com eritromicina-peróxido de benzoíla, foi avaliada por NYIRADY et al. (2002) que recuperaram 87% do ácido retinóico veiculado em micropartículas e apenas 41% dele no gel 0,025% após 24 horas. Na presença de eritromicina-peróxido de benzoíla, o gel de ácido retinóico 0,025% apresentou valores ainda mais baixos, correspondente a 11% da concentração inicial após 24horas.

Por isso, muitos autores têm sugerido sua veiculação em sistemas de liberação tais como lipossomas, microemulsões, niossomas, micropartículas entre outros.

Sistemas de liberação do tipo lipossomas para veiculação do ácido retinóico têm sido desenvolvidos por diversos autores até o momento (MONTENEGRO et al., 1996; BRISAERT et al., 2001; MANCONI et al., 2002; SHIMIZU et al., 2003; CONTRERAS et al., 2005; SINICO et al., 2005). Lipossomas contendo ácido retinóico foram estudados por MONTENEGRO et al. (1996), que avaliaram o perfil de liberação e a permeação a partir destas preparações, mostrando-se favoráveis à utilização tópica. Lipossomas foram também utilizados por BRISAERT et al. (2001) para encapsulação deste fármaco obtendo-se boa estabilidade química uma com menor fotodegradação e alta liberação. SHIMIZU et al. (2003) incorporaram glicosídeos derivados da soja na composição de lipossomas de ácido retinóico e constataram um aumento da estabilidade do fármaco. CONTRERAS et al. (2005) utilizaram hidrogéis de ácido retinóico

encapsulados em lipossomas e obtiveram um perfil de liberação mais controlado, resultando na diminuição dos efeitos colaterais da aplicação tópica. SINICO et al. (2005) compararam lipossomas com carga positiva e negativa. Os estudos *in vitro* demonstraram que os lipossomas carregados negativamente proporcionaram melhor retenção do fármaco nas camadas da pele. Alternativamente aos lipossomas, os niossomas também tem sido utilizados para controlar a liberação do fármaco e conferir estabilidade de maneira similar aos lipossomas, mas com menor custo e maior estabilidade (MANCONI et al., 2002; DESAI; FINLAY, 2002).

Microemulsões tem sido o veículo de escolha utilizado por alguns autores (TROTTA et al., 2003; HUANG et al., 2004). TROTTA et al. (2003) avaliaram as microemulsões contendo ácido retinóico através da realização de ensaios de permeação e de retenção *in vitro* considerando-as como uma boa alternativa para administração tópica.

1.2.5. Porque microencapsular o ácido retinóico

pesar da comprovada eficácia do ácido retinóico, ele apresenta algumas desvantagens que limitam fortemente a sua utilização, tais como a baixa solubilidade em água, a instabilidade na presença de luz e oxigênio e a ocorrência de reações de irritação local (LEHMAN et al., 1988).

Os sistemas de liberação têm mostrado conferir melhor segurança e eficácia para administração de fármacos, promovendo uma liberação adequada, a diminuição dos efeitos colaterais e possibilitando a obtenção de

efeitos terapêuticos a partir de doses menores, tornando-o viável clinicamente e economicamente. As micropartículas são sistemas de liberação que têm se destacado por proporcionarem proteção aos materiais instáveis, liberação lenta ou sustentada de princípios ativos e ainda a liberação sítio-específico (FREITAS; MARCHETTI, 2005; RICCI; MARCHETTI, 2006; ALENCASTRE et al., 2006). Estas podem ser alternativas viáveis para veicular ácido retinóico na pele e minimizar a irritação produzida devido a sua liberação mais prolongada gerando níveis endógenos menores, além de conferir maior estabilidade e possibilitar a associação deste com outros fármacos incompatíveis (MAGDASSI et al., 1996; BAKAN, 1986). A liberação sustentada ou prolongada do fármaco a partir das micropartículas, pode ser utilizado ainda, para diminuir a resistência ao ácido retinóico criada pelo aumento da atividade do sistema enzimático da CYP em contato com o fármaco (REGAZZI et al., 1997; PARTHASARATHY; MEHTA, 1998).

Alguns trabalhos são encontrados na literatura utilizando sistemas microparticulados para veiculação de vitaminas e derivados da vitamina A retinóico. ALENCASTRE como ácido at al. (2006) prepararam micropartículas de carboximetilcelulose/quitosana contendo vitamina E e avaliaram o potencial destas, como um sistema de liberação tópico. Eles encontraram que as micropartículas obtidas foram eficazes em proteger o fármaco da degradação além de promoverem uma liberação sustentada e perfil penetração na pele adequado, considerando um sistema promissor para liberação tópica. Em um estudo comparativo entre microesferas de ácido retinóico 0,1% veiculadas em gel e um creme contendo 0,025% deste fármaco, observou-se redução significativa do brilho facial nos pacientes que

utilizaram o gel contendo as microesferas além de ausência de efeitos adversos seis horas após o tratamento (NYIRADY et al., 2000). Microesferas de ácido retinóico 0,1% veiculadas em gel (Retin-A micro®) também apresentaram proteção contra fotodegradação mesmo na presença de agente oxidante forte, o peróxido de benzoíla, quando comparado a um gel contendo 0,025% deste fármaco (Retin-A®) (NYIRADY et al., 2002). Micropartículas de PLGA foram usadas para veicular ácido retinóico por CIRPANLI et al. (2005) que verificaram que 90% do fármaco permaneceu estável por 4 meses a temperatura de 4 °C e por 2 meses a temperatura de 25 °C, enquanto que emulsões contendo o estabilizador α-tocoferol conferiram apenas 2 meses de estabilidade a temperatura de 4 °C (SELEK et al., 2000). CORDO (2006) veicularam micropartículas de PLGA contendo ácido retinóico em um gel e obtiveram penetração na pele semelhante à forma livre do fármaco veiculada em base gel similar. Outros trabalhos utilizando micropartículas e nanopartículas obtidas por diferentes métodos (emulsão e evaporação de solvente, geleificação ionotrópica e coacervação) e polímeros (PLGA, gelatina e Gliadina) têm mostrado aumentar a estabilidade desse fármaco, conferindo proteção as agressões do meio ambiente, e liberação prolongada (EZPELETA et al., 1995; ROSSLER et al., 1995; CHOI et al., 2001; DINARVAND et al., 2003; JEONG et al., 2003).

Apesar dos estudos realizados de microencapsulação do fármaco, poucos se apresentam viáveis economicamente para utilização tópica por utilizar polímeros e métodos de preparo de alto custo ou intransponíveis em larga escala (CHOI et al., 2001; JEONG et al., 2003, CIRPANLI et al., 2005).

1.3. SISTEMAS DE LIBERAÇÃO MICROPARTICULADOS

1.3.1. Considerações gerais

onforme mencionado, os sistemas de liberação têm sido bastante empregados como forma de melhorar a segurança e eficácia de medicamentos, promovendo uma liberação eficiente e diminuição de efeitos colaterais (GOMES et al., 2005; FREITAS; MARCHETTI, 2005; RICCI; MARCHETTI, 2006; ALENCASTRE et al., 2006; LOPES et al., 2005).

As micropartículas são sistemas de liberação que têm se destacado por conferirem proteção de materiais sensíveis ao meio ambiente, conversão de líquidos a pós, liberação lenta ou sustentada de princípios ativos e também uma liberação sítio-específico (MAGDASSI et al., 1996; BAKAN, 1986; GOMES et al., 2005; FREITAS; MARCHETTI, 2005; RICCI; MARCHETTI, 2006; ALENCASTRE et al., 2006). Estes sistemas se destacam ainda em relação a outros sistemas como os lipossomas por possuírem uma maior estabilidade físico-química e menor limitação tecnológica.

Mesmo assim, algumas dificuldades são relatadas com a aplicação desta técnica como: a cobertura inadequada ou descontínua, a estabilidade inadequada de produtos sensíveis, as características de liberação não reprodutíveis e instáveis, e a limitação econômica (BAKAN, 1986).

De acordo com FINCH (1993), as micropartículas, em geral, têm sido produzidas por mais de 200 métodos que podem ser divididos em químicos, físico-químicos e físicos.

A escolha do material de revestimento apropriado é responsável, em grande parte, pelas propriedades físicas e químicas resultantes das micropartículas e, conseqüentemente, esta seleção deve ser levada em consideração. O material de revestimento deve ser capaz de formar um filme coesivo com o material a ser encapsulado, ser quimicamente compatível e não reativo com o mesmo, e fornecer as características de revestimento desejadas, como resistência, flexibilidade, impermeabilidade e estabilidade.

Diversos materiais de revestimento têm sido desenvolvidos nos últimos anos procurando atender as características desejadas para cada produto a ser obtido. A quitosana é um carboidrato insolúvel em água, mas que pode ser solubilizado em ácido acético diluído através de formação do seu acetato (THANOO et al., 1992). Quimicamente é o β(1→4)-2-amino-2-deoxi-D-glicose, obtido pela hidrólise dos grupos aminoacetil da quitina, um polissacarídeo abundante, componente estrutural das cutículas protetoras de crustáceos (JAMEELA; JAYAKRISHNAN, 1995; KAS, 1997). Entre suas vantagens estão: o baixo custo, a atoxicidade e a biocompatibilidade (WANG et al., 1996). Além dessas propriedades, a excelente capacidade em formar filme e a disponibilidade em grande quantidade torna-o um material muito interessante para utilização em sistemas de liberação modificada.

Devido à presença de grupos aminos livres na sua estrutura, ela possui uma carga positiva que pode reagir com muitas superficies e polímeros carregados negativamente (FUKUDA et al., 1980). Essa característica estrutural também é responsável por suas propriedades mucoadesivas já que sua carga positiva pode interagir com as superfícies mucosas carregadas negativamente (LEHR et al., 1992; NEEDLEMAN;

SMALES, 1995; RILLOSI; BUCKTON, 1995; HE et al., 1998; SHIMODA et al., 2001; KOCKISCH et al., 2003).

Comercialmente, a quitosana está disponível na forma de pós e solução com massa molecular variando entre 3.800 e 2.000.000Da e grau de deacetilação entre 66 e 95% (KAS, 1997). O tamanho de partícula, a densidade, a viscosidade, o grau de deacetilação e a massa molecular constituem importantes características da quitosana que podem influenciar as propriedades das formulações farmacêuticas.

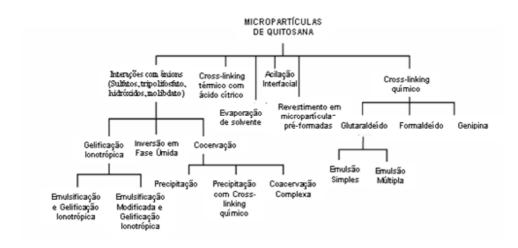
1.3.2. Micropartículas de quitosana

uso de micropartículas na terapia permite a liberação sítioespecífica através da escolha da formulação e de várias combinações polímero-fármaco. A dose total e a cinética de liberação são variáveis que podem ser utilizadas para se alcançar um resultado desejado. Utilizando as técnicas de microencapsulação e variandose a proporção de polímeros, a massa molecular do polímero e outros fatores, micropartículas podem ser desenvolvidas em um sistema de liberação ótimo que promoverá o perfil de liberação desejado. Esses sistemas podem aumentar o tempo de residência dos fármacos no sítio de ação e modular a liberação destes. Pesquisas intensivas estão sendo realizadas para explorar a quitosana como um carreador de fármacos para atingir o perfil de liberação desejado. As micropartículas de quitosana têm sido estudadas para veiculação de muitos princípios ativos tais como

anticancerígenos, antiinflamatórios, antibióticos, antitrombolíticos, esteróides, proteínas, aminoácidos e antidiabéticos.

Diferentes métodos têm sido empregados para preparar sistemas microparticulados utilizando quitosana. A seleção do método depende de fatores como o tamanho da partícula desejado, a estabilidade química e térmica do fármaco, a reprodutibilidade do perfil de liberação, a estabilidade do produto final e a toxicidade residual associada ao produto final.

Os processos usados para na preparação dessas micropartículas estão apresentados no Esquema 3.



Esquema 3. Métodos para a preparação de micropartículas de quitosana (adaptado de SINHA et al., 2004).

1.3.3. Principais métodos para obtenção das micropartículas de quitosana:

1.3.3.1. Emulsão Crosslinking:

sse método utiliza o grupo amina funcional reativo da quitosana para reagir com o grupo aldeído de um agente crosslinking (Figuras 6a e b).

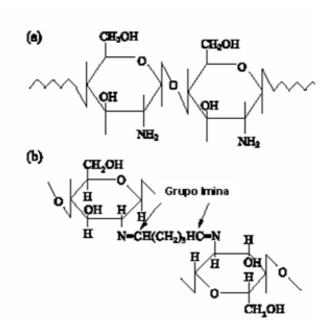


Figura 6. (a) Estrutura da quitosana [poli(β1-4-D-glicosamina)]. (b) Estrutura da quitosana após crosslinking (AGNIHOTRI et al., 2004).

Nesse método, uma emulsão água em óleo (A/O) é preparada pela emulsificação de uma solução aquosa de quitosana numa fase oleosa. As gotículas aquosas são estabilizadas usando um tensoativo adequado. Um agente crosslinking apropriado como glutaraldeído é então adicionado à emulsão estável para enrijecer as gotículas. As micropartículas formadas são filtradas e lavadas repetidamente com solvente apropriado e então secas

(AKBUGA; DURMAZ, 1994). O tamanho das partículas formadas por esse método pode ser controlado pelo tamanho das gotículas formadas, que por sua vez vai depender da quantidade de agente crosslinking adicionado e parâmetros relacionados à formação da emulsão como velocidade e tipo da agitação e proporção dos constituintes adicionados. Esse método está representado de forma esquemática na Figura 7.

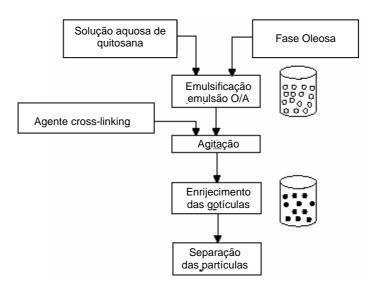


Figura 7. Representação esquemática da preparação de microparticulas de quitosana pelo método da emulsão crosslinking (AGNIHOTRI et al., 2004).

Apesar das variadas técnicas empregadas no preparo de micropartículas de quitosana, muitas dificuldades existem ainda na encapsulação de fármacos hidrofóbicos. O método de emulsão múltipla O/A/O utilizado por PAVANETO et al. (1996) e posteriormente GENTA et al. (1997), tem mostrado resultados satisfatórios, além de ser realizado em condições amenas, o que favorece a encapsulação de fármacos sensíveis. Esta técnica que foi utilizada para encapsular cetoprofeno consistiu no preparo de uma emulsão múltipla O/A/O seguido de evaporação de solvente

e, embora as partículas também sejam obtidas mesmo sem adição de agente cross-linking, a adição de glutaraldeído tem mostrado ser adequada para modular a liberação do fármaco (PAVANETTO et al., 1996; GENTA et al., 1997). Um esquema do método está apresentado na Figura 8.



Figura 8. Representação esquemática da preparação de microparticulas de quitosana pelo método da emulsão múltipla (PAVANETTO et al., 1996; GENTA et al., 1997).

Em geral, o método emulsão crosslinking apresenta algumas desvantagens já que ele envolve um procedimento exaustivo e também o uso de agentes crosslinking fortes, que podem possivelmente induzir reações químicas com os compostos ativos. Além disso, a remoção completa do excedente desse agente pode ser dificil de ser obtida.

1.3.3.2. Coacervação/precipitação:

sse método utiliza as propriedades físico-químicas da quitosana, já que ela é solúvel em pH ácido, mas precipita quando entra em contato com soluções alcalinas. Partículas são formadas nebulizando uma solução de quitosana em uma solução alcalina contendo hidróxido de sódio, NaOH-metanol ou dietanolamina (NISHIMURA et al., 1986). A separação e purificação das partículas obtidas podem ser feitas por filtração ou centrifugação seguida por lavagens sucessivas com água quente e fria. O método está esquematizado na Figura 9. Variações na pressão do ar comprimido ou no diâmetro do orificio do spray controlam o tamanho das partículas. O uso de um agente crosslinking para enrijecer as partículas pode modular a liberação do fármaco.

Em outra técnica proposta por BERTHOLD et al., 1996, uma solução de sulfato de sódio foi adicionada por gotejamento a uma solução aquosa acidificada de quitosana contendo um tensoativo sob agitação e ultra-som por 30 minutos. As micropartículas foram purificadas por centrifugação, resuspendidas em água e o agente crosss-linking glutaraldeído foi então adicionado. Este método foi utilizado por LOURENÇO (2006) para o preparo de micropartículas de quitosana para a veiculação de Dimetilaminoetanol (DMAE) na pele.

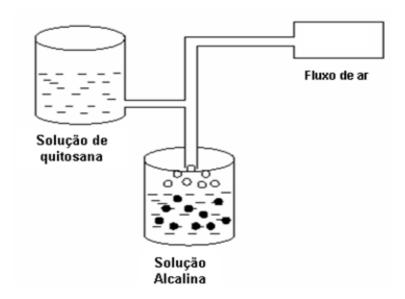


Figura 9. Representação esquemática da preparação de micropartículas de quitosana pelo método coacervação/precipitação (AGNIHOTRI et al., 2004).

1.3.3.3. Spray-drying:

pray-drying é uma técnica bem conhecida para produzir pós, grânulos ou aglomerados da mistura de fármacos e excipientes em solução ou suspensão. O método é baseado na secagem das gotículas atomizadas pelo um jato de ar quente. Nesse método a quitosana é primeiramente dissolvida em solução de ácido acético e o fármaco é então, dissolvido, disperso ou emulsificado nessa solução. Então, o agente croslinking é também adicionado. A atomização leva a formação de gotículas pequenas, cujo solvente é evaporado instantaneamente quando entra em contato com o jato de ar quente, levando a formação das partículas livres (HE et al., 1999a). O método está representado na Figura 10. Vários parâmetros podem ser controlados para obter o tamanho desejado das partículas, como o diâmetro do orifício, a velocidade de fluxo, a pressão de

atomização, a temperatura do ar de entrada e a quantidade de agente crosslinking.

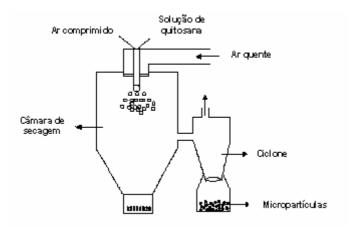


Figura 10. Representação esquemática da preparação de micropartículas de quitosana pelo método spray-drying (AGNIHOTRI et al., 2004).

Posteriormente, HE et al. (1999b) utilizaram um modelo em que cimetidina e famotidina foram encapsulados em micropartículas preparadas por spray-drying de emulsões múltiplas (O/A/O ou A/O/A). Eles verificaram que a liberação dos fármacos a partir das micropartículas obtidas por esse método foi significativamente sustentada quando comparada àquelas preparadas por spray-drying convencional ou pelo método da emulsão O/A.

1.3.3.4. Geleificação ionotrópica:

uso de complexação entre macromoléculas com cargas opostas para preparar micropartículas de quitosana tem atraído muita atenção devido a simplicidade do processo e as condições amenas. O crosslinking físico reversível ao invés de crosslinking químico tem sido aplicado, devido a possível toxicidade desses reagentes e outros efeitos indesejados. Tripolifosfato (TTP) é um poliânion, que pode interagir com a

quitosana catiônica através de forças eletrostáticas (KAWASHIMA et al., 1985). O TTP, ao contrário do glutaraldeído, que pode causar irritações às membranas mucosas devido a sua toxicidade, não é tóxico e forma gel por interação iônica entre os grupos aminos carregados positivamente da quitosana e os contra-íons do TTP (ARAL; AKBUGA, 1998; MI et al., 1999; SHU; ZHU, 2000, 2001). BODMEIER et al. (1989) relataram inicialmente a formação de complexos TTP-quitosana através do gotejamento da solução de quitosana numa solução de TTP. Após este estudo, vários outros pesquisadores investigaram o potencial desta técnica na utilização farmacêutica (SHIRASHI et al., 1993; SEZER; AKBUGA, 1995; AYIDIN; AKBUGA, 1996; CALVO et al., 1997a e b; SHU; ZHU, 2000). No método da geleificação ionotrópica, a quitosana é dissolvida numa solução de ácido acético diluída e então adicionada por gotejamento a uma solução de TTP sob agitação. Devido a complexação entre as espécies com cargas opostas, a quitosana submete-se a geleificação ionotrópica e precipita para formar partículas esféricas. O método está representado na Figura 11.

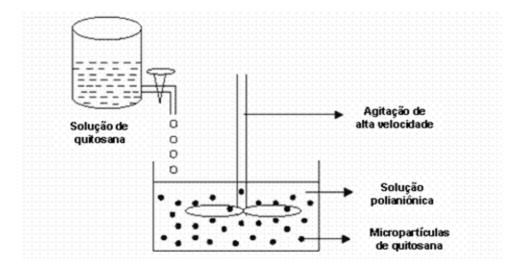


Figura 11. Representação esquemática da preparação de micropartículas de quitosana pelo método de geleificação ionotrópica (AGNIHOTRI et al., 2004).

Uma outra técnica de geleificação ionotrópica que utilizou TTP como agente cross-linking iônico no preparo de micropartículas, mostrou também que este constitui um sistema de liberação com potencial para a veiculação de fármacos hidrofóbicos (KO et al., 2002). Nesta técnica, a felodipina foi utilizada como fármaco modelo e a eficiência de encapsulação foi superior a 90%. A técnica consistiu da preparação de uma emulsão O/A que foi nebulizada utilizando uma bomba de spray sob uma solução de TTP. Variáveis como o pH da solução de TTP, a concentração de agente cross-linking, o tempo de reação, a massa molecular e a concentração de quitosana representaram papéis da maior importância na densidade da matriz quitosana/TTP e conseqüentemente nas características morfológicas e de liberação obtidas.

Polímeros naturais que apresentam contra-ions hidrofóbicos como o alginato também têm sido extensivamente utilizado em associação com a quitosana na obtenção de micropartículas. Apesar de serem extensivamente utilizados, os "beads" de alginato de sódio apresentam inconvenientes quanto a sua utilização devido a um problema de erosão do gel com consequente liberação rápida do fármaco (MURATA et al., 1993a). A utilização da quitosana como agente superficial de revestimento (agente cross-linking) tem mostrado suprimir esta erosão resultando em uma liberação mais prolongada das moléculas encapsuladas (CHANDY; SHARMA, 1993; BODMEIER et al., 1989, KIM; LEE, 1992; MURATA et al., 1993a e b; SEZER; AKBUGA, 1995, 1999a e b). A utilização desta associação apresenta ainda outras vantagens que foram visualizadas por HARI et al. (1996) e SEZER; AKBUGA (1999 a e b), como o aumento da eficiência de encapsulação e um perfil de liberação mais sustentado.

1.3.4. Micropartículas de alginato/quitosana

pesar de todas as vantagens descritas na utilização de micropartículas de quitosana, existem algumas limitações na sua utilização. A quitosana é um polímero catiônico que apresenta grupos hidroxila e aminas livres tornando-o um composto altamente reativo (DON et al., 2001, 2002a e b; 2005). Vários relatos na literatura utilizam interações entre os grupos amina da quitosana e os grupos carboxilatos de vários ácidos carboxílicos e seus anidridos para obter compostos com características diferentes da molécula de quitosana original, particularmente para aumentar a solubilidade, melhorar propriedades mucoadesivas e preparar micro/nanopartículas (DON et al., 2005; BODNAR et al., 2005; SHIMIZU et al., 2005; KAST et al., 2001; ROGOVINA et al., 2000; SASHIWA et al., 2003).

Por ser um polissacarídeo catiônico é esperado que a quitosana interaja mais com fármacos ácidos do que com fármacos básicos. Em 1991, IMAI et al. verificaram que ocorria uma interação da quitosana com indometacina (fármaco ácido). Posteriormente, PUTTIPIPATKHACHORN et al. (2001) observaram que ocorria uma interação do ácido salícilico (fármaco ácido) com a quitosana, e que esta não foi verificada utilizando-se a teofilina (fármaco básico).

O alginato é um biopolímero extraído primariamente de três (3) espécies de algas marrons, Laminaria hyperborea, Ascophyllum nodosum e Macrocystis pyrifera.

Esse polímero tem sido usado por muitos anos na indústria de alimentos e de bebidas como espessante e estabilizador coloidal. Ele também tem encontrado aplicações crescentes na indústria de biotecnologia e possui propriedades únicas que viabilizam como matriz em sistemas de liberação. Essas propriedades incluem: 1 – formação de ambiente matricial relativamente inerte, 2 – processo de encapsulação a temperatura ambiente livre de solventes orgânicos, 3 – alta porosidade do gel que permite alta velocidade de liberação de macromoléculas, 4 – capacidade de controlar essa porosidade com procedimentos de revestimento simples, 5 – dissolução e biodegradação do sistema sob condições fisiológicas normais.

O alginato também possui propriedade mucoadesiva que poderia servir como uma vantagem na liberação de fármacos em superficies mucosas. Vários estudos têm mostrado que polímeros com carga constituem bons agentes mucoadesivos (PARK; ROBINSON, 1984; CHIKENING; JACOB; MATHIOWITZ, 1992; CHIKENING; MATHIOWITZ, 1995; CH'NG et al., 1985). Tem sido relatado que polímeros polianiônicos são bioadesivos mais efetivos que polímeros policatiônicos ou não-iônicos. Alginato com o seu grupo carboxílico é classificado como um polímero mucoadesivo aniônico e, em particular, as micropartículas de alginato tem apresentado essas propriedades (CRAIG; TAMBURIC, 1997; GOMEZ; WEE, 1998).

Em estudos de mucoadesão conduzidos por CHICKERING et al., a força adesiva entre vários polímeros diferentes e o epitélio intestinal foram

avaliados e mostraram que o alginato tem maior força adesiva quando comparado com outros polímeros tais como poliestireno, quitosana, carboximetilcelulose ácido poli-(láctico) (CHIKENING: JACOB: MATHIOWITZ, 1992; CHIKENING; MATHIOWITZ, 1995). Posteriormente, WITTAYA-AREEKUL, KRUENATE. PRAHSARN (2006)testaram а mucoadesividade de micropartículas de alginato e alginato revestido com micropartículas o revestimento quitosana. As sem de quitosana 43% apresentaram mucoadesão de (número de partículas permaneceram ligadas à superfície mucosa) enquanto as micropartículas revestidas com 0,5, 1,0 e 1,5% de guitosana promoveram a mucoadesão para 52, 82 e 88%, respectivamente.

Desta forma, pode-se dizer que as micropartículas de alginato revestidas com quitosana poderiam ser uma alternativa para encapsulação de fármacos, especialmente aqueles com caráter ácido, já que o fármaco disperso na matriz formada por alginato ficaria protegido do contato com a quitosana, que atuaria apenas superficialmente diminuindo a erosão, modulando a liberação e promovendo a mucoadesão dessas partículas.

1.3.5. Principais métodos para obtenção das micropartículas de alginato/quitosana:

s micropartículas de alginato/quitosana podem ser preparadas gotejando ou nebulizando uma solução de alginato contendo o fármaco sobre uma solução de quitosana. Em geral, partículas maiores que 1mm podem ser preparadas pelo uso de uma seringa com

agulha ou pipeta (WEE; GOMBOTZ, 1994; AUSTIN; BOWER, MULDOON, 1996; ELGIN, 1995). O tamanho das partículas formadas é dependente do diâmetro da agulha e da viscosidade da solução de alginato. Agulhas de diâmetro maiores e soluções mais viscosas produzem partículas com diâmetro maior. A viscosidade pode influenciar também a morfologia das partículas que se tornam mais esféricas com o aumento da viscosidade (BADWAN et al., 1985). As partículas formadas são deixadas em contato com a solução cross-linking por um curto período de tempo, geralmente alguns minutos, antes de serem lavadas com água destilada.

Há três métodos bem conhecidos para preparar micropartículas de alginato menores que 0,2mm de diâmetro: atomização, emulsificação e coacervação. O mais comumente usado é o método de atomização ou spray sobre uma solução de cross-linking usando um sistema de extrusão e um pequeno orificio. Há inúmeras variações desse método, que tem sido relatadas por diferentes grupos (KU et al., 1995; WEE; GOMBOTZ; FANSLOW, 1995; BOWERSOCK et al., 1996; KUARK; GROVES; BURGES, 1991). O tamanho dessas micropartículas pode ser controlado pela pressão do sistema de extrusão, pelo fluxo que bombeia a solução de alginato de sódio que vai ser nebulizado e pela distância entre o orificio e a superfície da solução de cross-linking. As microgotas da solução de alginato contendo o fármaco originarão as micropartículas após cross-linking com agente apropriado.

O segundo método de preparação das micropartículas é a técnica de emulsificação O/A. Esta técnica possui a desvantagem da utilização de solventes como o éter de etila para remover o óleo no final do processo. O

tamanho das micropartículas formadas é altamente dependente da velocidade de agitação e da porcentagem da solução cross-linking.

O terceiro método de preparação de micropartículas é o de coacervação complexa entre polieletrólitos com cargas opostas. Sob condições específicas de concentração de poli-íon, pH e força iônica, a mistura polieletrolítica pode se separar em duas fases distintas, uma fase coacervato densa, que contém as micropartículas, e uma fase diluída. Coacervação complexa entre ácido algínico, gelatina, quitosana e albumina têm sido relatadas (GOMBOTZ; WEE, 1998). No sistema alginato/quitosana, o complexo é formado pela nebulização de solução de alginato de sódio sobre uma solução de quitosana. As micropartículas formadas são resistentes mecanicamente e estáveis sob ampla faixa de pH (GOMBOTZ; WEE, 1998).

1.3.6. Eficiência de encapsulação das micropartículas

encapsulação de fármacos em sistemas microparticulados pode ser realizada por dois métodos: durante a preparação das partículas (incubação). Nesses sistemas o fármaco é embebido numa matriz ou adsorvido na sua superficie. Vários métodos de encapsulação têm sido desenvolvidos para melhorar a eficiência de encapsulação, que dependerá largamente do método de preparo e das propriedades físico-químicas do fármaco. Uma encapsulação máxima pode ser alcançada incorporando o fármaco durante a formação das partículas, mas este processo pode ser afetado pelos parâmetros do processo tais como método de preparo, a presença de excipientes e outros.

Tanto fármacos solúveis e insolúveis em água podem ser veiculados em micropartículas de quitosana e de alginato. Fármacos solúveis em água são misturados à solução polimérica para formar uma mistura homogênea e então as partículas podem ser produzidas por algum dos métodos discutidos anetriormente (SEZER; AKBUGA, 1999a e b, PARK et al., 2004, ANAL; STEVENS, 2005). Fármacos insolúveis podem ser encapsulados também usando a técnica de emulsão múltipla, onde uma emulsão O/A/O é formada e as gotículas resultantes enrijecidas pelo uso de um agente crosslinking adequado, conforme já mencionado anteriormente em algumas técnicas (PAVANETO et al., 1996, GENTA et al., 1997, RIBEIRO et al., 1999). Fármacos insolúveis podem também ser encapsulados por dispersão em solução polimérica (WITTAYA-AREEKUL, KRUENATE, PRAHSARN, 2006) ou por formação de emulsão O/A (KO et al., 2002; LEE et al., 2003)

1.3.7. Cinética de liberação de fármacos

liberação de fármacos a partir dos sistemas microparticulados constituídos de alginato e quitosana depende da quantidade de agente crosslinking, da morfologia, do tamanho e da densidade das partículas, bem como das propriedades físico-químicas do fármaco e da presença de adjuvantes. A liberação *in vitro* também depende do pH, da polaridade e da presença de enzimas no meio dissolutor. A liberação do fármaco a partir das micropartículas envolve três mecanismos diferentes (AGNIHOTRI et al., 2004, WITTAYA-AREEKUL, KRUENATE, PRAHSARN, 2006):

- a) liberação a partir da superfície das partículas;
- b) difusão através da matriz polimérica;
- c) liberação devido à erosão polimérica.

Esses mecanismos estão mostrados na Figura 12.

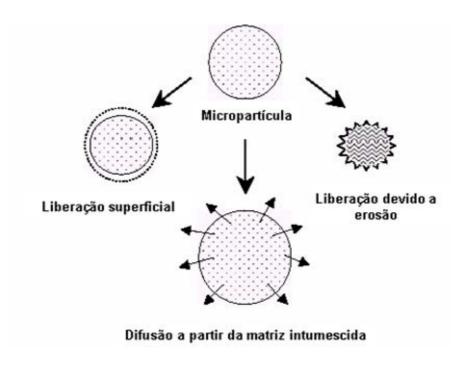


Figura 12. Mecanismo de liberação de fármacos a partir de sistemas particulados (AGNIHOTRI et al., 2004).

Na maioria dos casos, a liberação dos fármacos obedece mais de um tipo de mecanismo. No caso da liberação a partir da superficie, o fármaco adsorvido instantaneamente dissolve quando entra em contato com o meio dissolutor. Fármacos encapsulados nas camadas superficiais das partículas também obedecem a esse mecanismo. Esse tipo de liberação leva ao efeito "burst". O aumento da densidade de agente crosslinking pode diminuir a liberação "burst". Este efeito também pode ser evitado pela lavagem das

micropartículas com solvente adequado, mas ele pode levar a uma baixa eficiência de encapsulação (AGNIHOTRI et al., 2004).

A liberação por difusão envolve 3 passos: primeiro a água penetra no sistema microparticulado causando intumescimento da matriz, então ocorre conversão da matriz polimérica considerada "glassy" em uma matriz esponjosa denominada "rubbery" e, o terceiro passo, é a difusão do fármaco através dessa matriz. Neste caso, a liberação é lenta inicialmente e depois se torna mais rápida.

Com relação as micropartículas de quitosana, JAMEELA et al. (1998) liberação foi dependente do demonstraram que tamanho das а micropartículas. Partículas de tamanho menor, que apresentam área superficial aumentada, liberaram mais rapidamente que aquelas de tamanho maior. ORIENTI et al. (1996) estudaram a correlação entre a erosão da matriz de quitosana e a cinética de liberação de indometacina a partir de micropartículas de quitosana. A cinética de liberação foi correlacionada com a concentração da quitosana e com o pH do meio. Em altas concentrações de quitosana e pH 7,4, desvios na cinética de ordem zero tem sido observada. As variações induzidas por esses parâmetros na difusão de fármacos e na solubilidade, levando a erosão, tem sido analisado.

Com relação as micropartículas de alginato, a difusão de pequenas moléculas, em geral, não é afetada pela massa molecular do alginato, enquanto a difusão de macromoléculas como proteína tem mostrado ser dependente deste fator. O aumento da concentração de alginato diminui a velocidade de difusão de moléculas e o tipo de alginato utilizado também pode interferir na velocidade de difusão. Moléculas carregadas positivamente

podem também influenciar a difusão a partir de uma matriz de alginato, pois podem interagir com o alginato carregado negativamente, inibindo a sua difusão (MUMPER et al., 1994). O maleato de clorfeniramina apresentou menor velocidade de liberação que o fármaco aniônico, salicilato de metila (STOCKWELL; DAVIS; WALKER, 1986). Em alguns casos, interações podem causar modificações drásticas na morfologia da micropartícula formada (SEIGI; YATSUYANGI; IKEDA, 1989).

Conforme já mencionado, micropartículas de alginato sofrem erosão e liberação rápida do fármaco quando expostas ao meio dissolutor. A utilização da quitosana para revestir a parede das partículas tem minimizado esse efeito e resultado em uma liberação mais sustentada e também maior eficiência de encapsulação (CHANDY; SHARMA, 1993; BODMEIER et al., 1989, KIM; LEE, 1992; MURATA et al., 1993a e b; SEZER; AKBUGA, 1995, 1999a e b).

1.3.8. Direcionamento sítio-específico de fármacos na pele usando micropartículas poliméricas

pários sistemas de liberação de fármacos têm mostrado utilizar a via apêndice, penetrando a pele mais rapidamente e criando altas concentrações do composto utilizado dentro do ducto folicular. Entre os sistemas de liberação que tem estado sob investigação atualmente, os lipossomas e as micropartículas tem sido os mais amplamente utilizados (VOGT et al., 2005).

Para o tratamento de patologias (ex: acne, alopecia e outras disfunções das glândulas sebáceas) associadas à estrutura pilossebácea, pode ser importante aumentar a concentração de certos fármacos nos FP. Embora alguns fármacos possam se difundir passivamente pelas unidades pilossebáceas, a maioria penetra a pele utilizando a via transepidérmica. Mas, há vários objetivos para tentar o direcionamento folicular de fármacos (ROLLAND et al., 1993):

- reduzir ou contornar a via transepidérmica;
- diminuir a toxicidade;
- aumentar a concentração do fármaco dentro da unidade pilossebácea;
- diminuir a dose aplicada e/ou freqüência de sua administração.

As micropartículas apresentam muitas vantagens como sistemas de liberação para direcionamento sítio-específico na pele:

- elas apresentam boa estabilidade quando aplicados na pele;
- podem ser obtidas com tamanho médio definido e distribuição de tamanho estreito;
- protegem o fármaco incorporado contra a degradação na formulação ou inativação prematura na pele;
- podem liberar o fármaco dentro do folículo piloso com velocidade controlada ou sustentada;
- possibilitam a incorporação de fármacos tanto lipofilicos quanto hidrofilicos.

O tamanho das micropartículas apresenta grande importância no direcionamento folicular conforme está apresentado na Figura 13 (SHAEFER et al., 1990; ROLLAND et al., 1993). Micropartículas menores (<3μm) penetram nos apêndices da pele com facilidade, e foram também observadas nas camadas superficiais do EC, mas não na epiderme viável (ROLLAND et al., 1993). Estas micro/nanopartículas promovem a penetração de fármacos gerando níveis na pele maiores que a sua forma livre (MAIA et al., 2000; JENNING et al., 2000; MEI et al., 2003; SHIM et al., 2004; CHEN et al., 2006).

Micropartículas de aproximadamente 5μm apresentam alta concentração nos folículos pilosos, mas sem penetrar o EC (ROLLAND et al., 1993; TOLL et al., 2004). Estas micropartículas também têm otimizado a terapia por apresentar aumento dos níveis do fármaco retido nas camadas da pele (JALÓN et al., 2001a e b; SANTOYO et al., 2002; MORDON et al., 2003)

Todavia, partículas maiores (>10µm) nem penetram o orificio folicular nem a camada córnea, mas podem se concentrar ao redor da aberturas dos folículos sem maior penetração disponibilizando o fármaco livre no interior do folículo (TOLL et al., 2004).

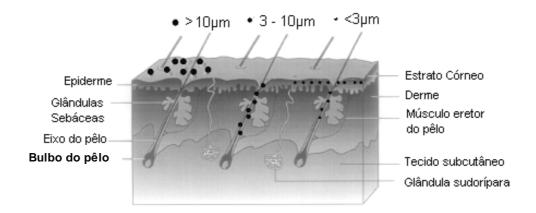


Figura 13. Representação esquemática da influência do tamanho das micropatículas nas vias de penetração cutânea (adaptado de ROLLAND et al., 1993).

Áreas de interesse farmacêutico nos FP são: o infundíbulo pilar (na parte mais externa), as glândulas sebáceas e a bulbo piloso, conforme apresentado na Figura 14. Dependendo da localização e tamanho da estrutura alvo os protocolos de aplicação devem ser convenientemente modificados.

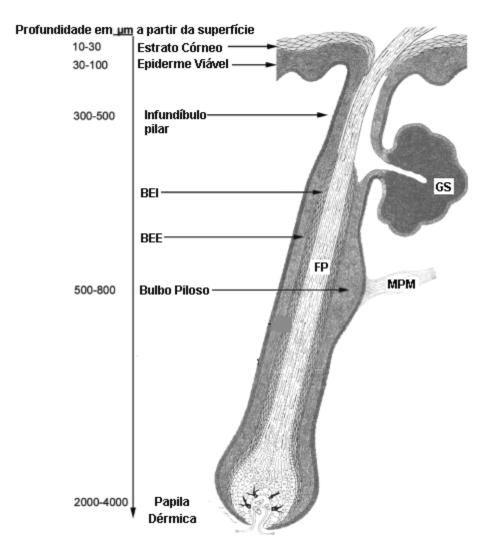


Figura 14. Estruturas alvo do folículo piloso (FP) e seus níveis correspondentes. BEE, bainha epitelial externa; BEI, bainha epitelial interna; GS, glândula sebácea, MPM, músculo pilomotor (adaptado de TOLL et al., 2004).

As glândulas sebáceas, por exemplo, estão localizadas a uma profundidade de 100 - 500µm da superfície da pele. O direcionamento folicular para essa região pode ser uma ferramenta promissora para terapia de acne tópica (VOGT et al., 2005).

O bulbo piloso, localizada a 500 - 800µm da superfície da pele, apresenta-se como reservatório de células epiteliais e germinativas que são

capazes de promover o crescimento do folículo piloso e da epiderme interfolicular (TAYLOR et al., 2000). Dessa forma, ela pode regular a renovação epidérmica e juntamente com a papila dérmica, o ciclo de crescimento do pêlo. (JAHODA; REYNOLDS, 1996). Precursores de mastócitos e melanócitos também foram recentemente encontrados nesta região (NISHIMURA et al., 2002; SHAROV et al., 2003). Desta forma, esta região constitui um alvo para o tratamento de perdas ou disfunções no crescimento do pêlo e doenças de pele. A recente localização dos melanócitos nesta porção do folículo oferece ainda a oportunidade de tratar desordens de pigmentação (NISHIMURA et al., 2002).

Face ao exposto, o direcionamento folicular de micropartículas de ácido retinóico pode promover uma terapia eficiente contra as várias desordens epidérmicas já colocadas (item 1.2), uma vez que podem minimizar a irritação produzida devido a sua liberação mais prolongada gerando níveis endógenos menores, pode conferir maior estabilidade e possibilitar a associação deste com outros fármacos incompatíveis. Desta forma, a utilização das micropartículas poderiam levar a obtenção de efeitos terapêuticos melhores com a utilização de doses menores.

2. OBJETIVOS

Objetivos 54

2.1. OBJETIVO GERAL

 Desenvolvimento, caracterização e avaliação de sistemas microestruturados a base de quitosana para veiculação de ácido retinóico na pele.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- seleção de um método adequado para a obtenção de micropartículas de quitosana para veiculação de ácido retinóico na pele;
- otimização do método selecionado para alcançar um perfil de liberação sustentado, tamanho e eficiência de encapsulação adequados à via de administração pretendida e ao fármaco veiculado;
- caracterização morfológica dos sistemas obtidos mediante a utilização de técnicas de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e de espalhamento de luz e determinação da eficiência de encapsulação;
- avaliação da interação fármaco/excipientes através das técnicas de calorimetria exploratória diferencial e de espectrofotometria de FTIV;
- estudos in vitro do perfil de liberação;
- realização de ensaios in vitro para avaliação da permeação e retenção cutânea;

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MATERIAIS:

3.1.1. Matérias-primas e solventes:

- Acetonitrila, grau cromatográfico, Merck
- Ácido Acético, grau cromatográfico, Merck
- Ácido clorídrico, PA, Merck
- Ácido Retinóico grau farmacêutico, lote 030610, RJR Nutrientes e Farmoquímicos LTDA;
- Alginato de sódio, grau farmacêutico, Vetec
- Clorofórmio, PA, Merck
- Diclorometano, PA, Merck
- Etanol, PA, Merck
- Éter de Petróleo, PA, Quimex
- Fosfato de sódio bibásico anidro, PA, Merck
- Fosfato de sódio monobásico monohidratado, PA, Sinth
- Glutaraldeído, grau farmacêutico, Vetec
- Hidróxido de sódio, PA, Merck
- Isopropanol, grau cromatográfico, Merck
- Metanol, grau cromatográfico, Merck
- Monolaurato de sorbitano, grau farmacêutico, BERACA
- Monooleato de sorbitano, grau farmacêutico, Oxiteno
- Óleo mineral, grau farmacêutico, Ely Martins
- Polissorbato 80, grau farmacêutico, Viafarma
- Quitosana Hydagen® HCMF MM 50.000 1.000.000 g/mol com grau de deacetilação min. 80% grau farmacêutico, Cognis
- Quitosana Hydagen® DCMF MM 300.000 2.000.000 g/mol com grau de deacetilação min. 80% grau farmacêutico, Cognis
- Tripolifosfato, grau farmacêutico, Synth

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Padronização e validação da metodologia analítica do ácido retinóico utilizando CLAE

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é um dos métodos analíticos mais utilizados na separação, identificação e quantificação de fármacos. A técnica é baseada em princípios físico-químicos de separação de componentes de uma mistura, que se realiza pela distribuição destes componentes em duas fases, uma móvel que é líquida e formada por uma mistura de solventes e outra estacionária que é sólida e está contida em uma coluna. A fase móvel solubiliza os fármacos e tem a função de arrastá-los pela fase estacionária. A afinidade distinta dos fármacos pela fase estacionária permite a separação. O equipamento possui uma bomba que impulsiona a fase móvel. Após os fármacos eluírem da coluna passam por um detector que envia um sinal elétrico para um registrador que fornece o cromatograma.

Possui a característica de apresentar alta sensibilidade, pequeno volume de amostra e ainda alta seletividade para resolução de misturas complexas.

Os métodos por CLAE podem ser divididos em dois tipos: a CLAE em fase normal, que é realizada mediante a eluição de uma coluna empacotada com sílica hidrofílica, com fase móvel apolar e a CLAE em fase reversa, quando o soluto é eluído em fase móvel polar.

O desenvolvimento do método analítico envolve otimização de vários estágios como a preparação da amostra, a separação cromatográfica e a quantificação. Parâmetros como a fase móvel, o fluxo, a coluna cromatográfica e o comprimento de onda de detecção devem que ser préestabelecidos com critério. A metodologia pode ter padronização interna ou externa. A validação do método analítico é importante porque garante o sucesso da utilização da metodologia desenvolvida (CAUSON, 1997).

As análises foram realizadas em cromatógrafo modelo SPD 10 AVP, equipado com detector UV-VIS operando a 348 nm, bomba LC-10 AD, e computador com programa LC-10. A separação foi realizada em coluna C₁₈ de fase reversa Lichrocart® (Merck, 125 x 5 mm, 5μm) e pré-coluna 4 x 4 mm (5μm), a temperatura ambiente controlada (25 ± 1°C). Os parâmetros cromatográficos selecionados foram: fase móvel constituída de água acidificada com 1,2% de ácido acético glacial, acetonitrila, isopropanol e metanol (30:30:30:10 – v/v); fluxo de 1,2 mL/minuto e volume injetado correspondente a 20μL. Foi utilizada padronização externa.

3.2.1.1. Determinação do espectro de absorção na região do UV do ácido retinóico:

Para determinar o comprimento de onda (λ) onde ocorre maior absorção para o ácido retinóico, foi realizada a varredura, na região UV de 200 a 500nm. A leitura foi realizada em um Espectofotômetro Beckman DU-70, utilizando uma solução metanólica de ácido retinóico na concentração correspondente a 5 μg/mL. Metanol foi usado como branco.

3.2.1.2. Obtenção da curva analítica do ácido retinóico na região UV:

Para a construção da curva analítica, foram utilizadas soluções de ácido retinóico em metanol nas concentrações correspondentes a 1,0; 2,5; 5,0; 10,0; 25,0 μg/mL. Os experimentos foram realizados a temperatura ambiente controlada de 25°C Estas amostras foram analisadas por CLAE e os resultados obtidos relacionados em um gráfico da concentração da solução pela área do pico. A curva foi obtida em triplicata (n=3).

3.2.1.3. Determinação da linearidade da curva analítica:

A avaliação da linearidade do método analítico, ou seja, a proporcionalidade entre a concentração e a resposta foi realizada mediante a obtenção de uma curva analíticae do cálculo do coeficiente de variação (CV%) entre os pontos da curva, do coeficiente de correlação linear (R) e da equação da reta.

3.2.1.4. Validação do método analítico:

A validação da metodologia analítica foi baseada no método de padronização externa. A precisão (CV %) e a exatidão (E %) do método analítico foram testadas por análises intra-dia e inter-dia. A precisão está relacionada com a dispersão das medidas ao redor do seu valor médio, sendo expressa matematicamente através do coeficiente de variação (CV %), calculado pela seguinte fórmula:

A exatidão (E %) corresponde à diferença entre o valor obtido após a análise e o valor teórico da amostra, sendo calculada pela fórmula:

E% = [(valor obtido – valor teórico)/valor teórico x 100

Equação 2

Para determinação da precisão e exatidão intra-dia, a curva analítica foi injetada em triplicata. Dois pontos da curva padrão, correspondentes às concentrações de 2,5 e 5,0 μg/mL foram injetados cinco vezes em um mesmo dia (n=5). A precisão intra-dia foi calculada a partir do coeficiente de variação (CV%) entre os pontos injetados. A exatidão (E %) intra-dia foi calculada a partir dos erros relativos entre as concentrações obtida e teórica. Para a determinação da precisão e da exatidão inter-dia a curva analíticae os dois pontos escolhidos foram analisados durante cinco dias consecutivos (n=5).

3.2.1.5. Seletividade:

A seletividade do método foi verificada pela análise de possíveis interferentes experimentais. Dessa forma, foram analisadas as soluções obtidas a partir do homogenado da pele e do EC (obtenção descrita no item 3.2.8.4). Além disso, soluções dos excipientes e das micropartículas inertes foram analisadas por CLAE.

3.2.2. Preparação das micropartículas de quitosana

3.2.2.1. Micropartículas de Quitosana obtidas por Emulsão Múltipla:

As micropartículas de ácido retinóico foram preparadas inicialmente pelo método de emulsão múltipla O/A/O descrito anteriormente por GENTA et al. (1997).

<u>Método de preparo:</u> As matérias-primas utilizadas com suas respectivas quantidades estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Constituintes utilizados na preparação das micropartículas de quitosana pelo método de emulsão múltipla (GENTA et al.; 1997).

Constituintes	Quantidade (%)	
ácido retinóico	0,015	
metanol	1,400	
ácido acético 1%	5,500	
quitosana	0,160	
polissorbato 80	0,180	
diclorometano	2,900	
óleo mineral	88,200	
monolaurato de sorbitan	1,800	
glutaraldeído 2,5%	1,200	

A técnica foi divida em 3 etapas:

1) Formação de uma emulsão primária O/A:

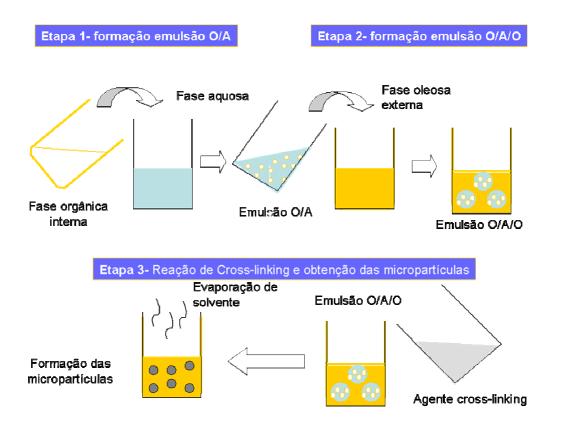
Inicialmente, a fase aquosa constituída por polissorbato 80, quitosana e metanol foi previamente dispersa em solução de ácido acético 1,0% (v/v). Em seguida, a fase orgânica, solução de ácido retinóico em diclorometano, foi lentamente gotejada na fase aquosa utilizando um ultraturrax a velocidade de 11000rpm por 10 minutos.

2) Formação da emulsão múltipla O/A/O:

A emulsão primária formada na etapa anterior foi gotejada em solução de óleo mineral e monolaurato de sorbitano estabilizado a temperatura de 50 °C sob agitação magnética.

3) Reação de cross-linking e obtenção das micropartículas:

Solução de glutaraldeído à 2,5% (v/v) foi gotejada na emulsão múltipla obtida anteriormente e deixada por 2 horas para reação de crosslinking e formação das micropartículas. A preparação foi colocada em becker aberto sob agitação magnética de 500rpm por mais dezenove (19) horas para evaporação do solvente. Em seguida foi centrifugada a 1370g por 15 minutos, filtrada em membrana de diâmetro de poro de 0,45µm e lavada três (3) vezes com éter de petróleo. A representação esquemática do método de preparo pode ser visualizado no Esquema 4.



Esquema 4. Representação esquemática da preparação das micropartículas de quitosana pelo método de emulsão múltipla descrito anteriormente por GENTA et al. (1997).

Vários parâmetros foram variados para se obter micropartículas com boa eficiência de encapsulação e liberação sustentada e estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Parâmetros variados na preparação das micropartículas obtidas a partir do método da emulsão múltipla.

Etapa do	Variáveis			
Primeira	quitosana utilizada: HCMF (baixa massa molecular) ou			
	- · · · · · · · · · · · · · · · · · · ·			
Emulsificação	DCMF (alta massa molecular) e suas quantidades (0,08%,			
(óleo/ água)	0,12%, 0,16%),			
	clorofórmio ou diclorometano;			
	■concentração do tensoativo (0,18%, 0,2%, 0,3%, 0,4%).			
	concentração da solução de ácido acético (2%, 1%, 0,6%).			
	tipo e tempo de agitação (magnética, mecânica, ultraturrax			
	5, 10 e 15 minutos).			
Segunda	■tensoativo utilizado, (monolaurato de sorbitan, monooleato			
emulsificação	de sorbitan);			
(óleo/ água/ óleo)	■adição de 0,05% de ácido retinóico à fase oleosa externa			
Cross – link	■concentração da solução de glutaraldeído (2,5 %, 1,25%).			
	■tempo (1h, 2h).			
Evaporação do solvente	■temperatura (25 °c, 40 °c, 50 °c).			
	■utilização de rotaevaporador (40 – 45 °c, pressão reduzida).			
Separação das	■tempo de centrifugação (10, 15 minutos).			
micropartículas	■velocidade de centrifugação (250, 700 e 1370g).			
	utilização de ultracentrifuga.			

3.2.2.2. Micropartículas de quitosana obtidas por geleificação ionotrópica:

As micropartículas de quitosana para veiculação de ácido retinóico foram preparadas por cross-linking iônico utilizando tripolifosfato (TTP) através da técnica descrita anteriormente por KO et al. (2002).

Método de Preparo: A técnica foi divida em 2 etapas:

1) Formação de uma emulsão primária O/A:

Inicialmente uma emulsão O/A foi preparada pelo gotejamento de uma fase orgânica constituída por 1,5mL de solvente orgânico (clorofórmio ou diclorometano) e 0,015g de ácido retinóico, em solução de ácido acético 1% contendo quitosana (0,15g) e polissorbato 80 (0,3g). A proporção de fase aquosa e orgânica foi de 9:1, totalizando 15mL de emulsão. A dispersão foi realizada com o auxílio de um ultraturrax, à uma velocidade de 16000 rpm por 20 minutos.

2) Atomização, cross-linking e obtenção das micropartículas:

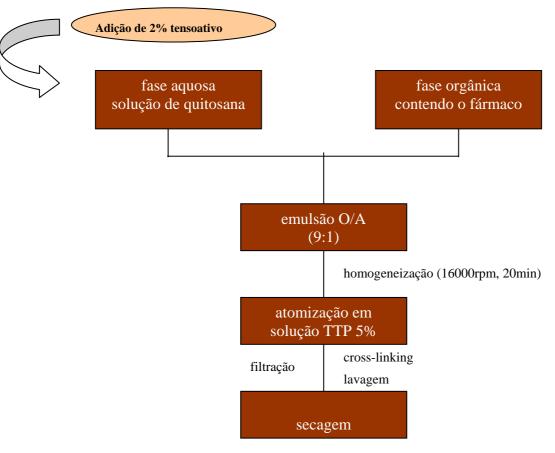
A emulsão foi nebulizada em 150mL de solução de TTP 5% (m/v), pH 2,0, 5,0 e 8,5, utilizando um spray atomizador desenvolvido no laboratório de pesquisa e apresentado na Figura 15.



Figura 15. Fotografia do spray atomizador desenvolvido no laboratório de Tecnologia Farmacêutica.

A vazão do ar foi de 20mL/min e a pressão do sistema e o fluxo foram 3KgF/cm² e 5mL/min, respectivamente. Os bicos atomizadores testados possuiam diâmetro de 1,0 e 0,7mm. As partículas formadas após nebulização sobre a solução de TTP permaneceram em suspensão durante 60 minutos sob agitação magnética, para reação de cross-linking. Em seguida, foram filtradas utilizando sistema de filtração com membrana de poro 0,45μm de diâmetro e lavadas três (3) vezes com água destilada. As partículas obtidas foram re-suspendidas em água e liofilizadas.

O método de preparo com suas etapas definidas está ilustrado no Esquema 5.



Esquema 5. Representação esquemática da preparação das micropartículas de quitosana por geleificação ionotrópica através da técnica descrita anteriormente por KO et al. (2002).

As micropartículas de quitosana contendo ácido retinóico obtidas a partir deste método foram preparadas sob condições experimentais diferentes conforme apresentado na Tabela 3.

Tabela 3. Parâmetros avaliados na preparação das micropartículas de quitosana pelo método de geleificação ionotrópica.

Parâmetros	Modificações		
quitosana	■ Hydagen® HCMF (baixa massa molecular)		
diâmetro do bico	■ Hydagen® DCMF (alta massa molecular)		
	■ 1,0mm		
	■ 0,7mm		
pH da solução de TTP	2 ,0		
	■ 5,0		
	■ 8,5		
solvente orgânico	■ diclorometano		
	■ clorofórmio		

3.2.3. Preparação das micropartículas de alginato/quitosana

As micropartículas de alginato de sódio contendo ácido retinóico foram revestidas com quitosana através da modificação da técnica descrita por SEZER; AKBUGA (1999a e b).

<u>Método de Preparo:</u> A técnica foi divida em 2 etapas e foi similar ao método de preparo das micropartículas de quitosana descrito anteriormente:

1) Formação de uma emulsão primária O/A:

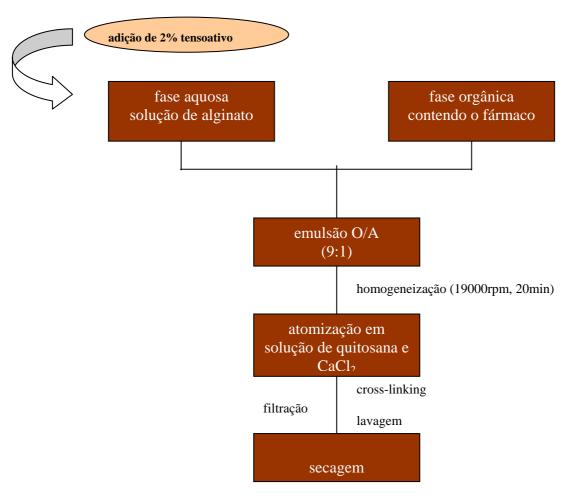
Inicialmente uma emulsão O/A foi preparada pelo gotejamento de uma fase orgânica constituída por 1,5mL de solvente orgânico (clorofórmio ou diclorometano) e ácido retinóico (0,1 ou 0,5%), em solução de alginato de sódio (proporções variáveis) e polissorbato 80 (0,3g). A proporção de fase aquosa e orgânica foi de 9:1 (v/v), totalizando 15mL de emulsão. A dispersão foi realizada com o auxílio de um ultraturrax, a 19000rpm por 20 minutos.

2) Atomização, cross-linking e obtenção das micropartículas:

A emulsão foi nebulizada em 150mL de solução acidificada de quitosana á 0,2% ou 0,4% (m/v) e cloreto de cálcio 0,5%(m/v), utilizando um spray atomizador. A vazão do ar e a pressão do sistema foram variadas para otimização do método. O fluxo foi de 2,5 mL/min. O bico atomizador utilizado possuía diâmetro de 0,7mm. As partículas formadas após nebulização na solução de quitosana permaneceram em suspensão durante 5 minutos sob agitação, para reação de cross-linking. Em seguida, foram

filtradas e lavadas 3 vezes com água destilada. As partículas obtidas foram re-suspendidas em água e liofilizadas.

O método de preparo com suas etapas definidas está ilustrado no Esquema 6.



Esquema 6. Representação esquemática da preparação das micropartículas de alginato/quitosana por geleificação ionotrópica através da técnica descrita anteriormente por SEZER; AKBUGA (1999).

As partículas obtidas a partir deste método foram preparadas sob condições experimentais diferentes conforme apresentado na Tabela 4.

Tabela 4. Parâmetros modificados na preparação das micropartículas de alginato/quitosana.

Parâmetros	Modificações
	■ 3,25%
concentração de alginato	3 ,0%
	2 ,0%
	1 ,0%
concentração de ácido retinóico	• 0,1%
	0 ,5%
	• 0,2%
concentração de quitosana	• 0,4%
	diclorometano
solvente orgânico	 clorofórmio

3.2.4. Caracterização das micropartículas

3.2.4.1. Microscopia Ótica:

A formação da emulsão múltipla e das micropartículas foi acompanhada pela observação através de microscópio ótico da marca Zeiss, modelo Axioplan 2, acoplado a um analisador de imagens Axiovision 3.1.

3.2.4.2. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV):

Os estudos de morfologia das micropartículas foram efetuados em microscópio eletrônico de varredura Leica Stereoscan 440 onde as amostras das micropartículas foram recobertas com ouro, utilizando-se um Spulter Balzers SCD-050 Coater antes da visualização. A voltagem utilizada foi de 15KV.

3.2.4.2. Análise da distribuição do tamanho das partículas:

Para a determinação do tamanho e distribuição de tamanho das micropartículas foi utilizado o analisador de tamanho de partícula por difração de lazer, modelo LSTM 13 320, Beckman Coulter.

A técnica utilizada foi a "Polarization Intensity Differential Scattering" (PIDS) patenteada pela Beckman Coulter que consiste em incidir sobre determinada amostra um feixe de luz laser em três comprimentos de onda (450 nm, 600 nm e 900 nm), primeiramente com um feixe de luz polarizado vertical seguido de um horizontal, de modo que as micropartículas em suspensão espalhem a luz. Essa luz espalhada é captada por células fotomultiplicadoras que transformam a luz captada em sinal, o qual é enviado para o correlator onde é feito o processamento dos dados. A

diferença da luz irradiada verticalmente e horizontalmente nos comprimentos de onda utilizados fornece informações a respeito da distribuição de tamanho das partículas da amostra. Estes dados são enviados para um computador que fornece valores de diâmetro médio em nanômetros (nm) e de porcentagem de distribuição granulométrica conforme mostrado na Figura 16.

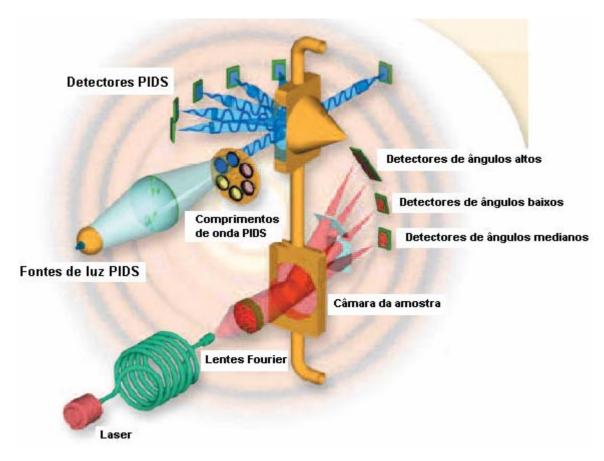


Figura 16. Representação esquemática do princípio do método utilizado para a determinação do tamanho das micropartículas utilizando o analisador de tamanho de partícula por difração de lazer, modelo LS™ 13 320, Beckman Coulter (disponível em: http://www.hanasc.co.kr/beckman/image/ls13320_pids_1.gif - acesso em 07/03/2007).

3.2.4.3. Rendimento e eficiência de encapsulação:

As micropartículas obtidas após liofolização foram pesadas para calcular o rendimento do processo através da fórmula abaixo:

Para calcular a eficiência de encapsulação, as micropartículas de quitosana foram solubilizadas em 10mL de solução de HCl 0,1N, agitadas em vortex por 1 minuto e então submetidas a banho de ultra-som por 30 minutos. Em seguida, o volume foi completado com etanol para 25mL, precipitando o polímero e solubilizando o fármaco.

As micropartículas de alginato/quitosana foram solubilizadas em solução tampão pH 7,4, agitadas em vortex por 1 minuto e submetidas a banho de ultra-som por 30 minutos. Em seguida, o volume também foi completado com etanol para 25mL, precipitando o polímero e solubilizando o fármaco. As amostras obtidas foram convenientemente diluídas, filtradas e analisadas por CLAE. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

A eficiência de encapsulação foi obtida através da fórmula abaixo:

3.2.5. Estudo de interação fármaco-polímero

3.2.5.1 Estudo de interação fármaco-polímero utilizando Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC):

Curvas termoanalíticas das micropartículas contendo ácido retinóico, do fármaco livre, da mistura física fármaco:polímero (1:1) e do polímero isolado foram obtidos utilizando módulos de DSC Netzsch, modelo 200, sob fluxo de nitrogênio de 50mL/min e velocidade de aquecimento de 10 °C até atingir 300 °C. Amostras de 20mg foram pesadas e colocadas em recipientes de alumínio abertos.

3.2.5.2. Estudo de interação fármaco-polímero utilizando espectroscopia no IV com transformada de Fourier (FTIV)

Espectros FTIV das micropartículas contendo ácido retinóico, do fármaco livre, da mistura física fármaco:polímero (1:1) e do polímero isolado foram obtidas utilizando um espetrofotômetro Nicolet FTIV Modelo PROTEGÉ TM 460 pelo método KBr.

3.2.6. Estudo in vitro do perfil de liberação

Este estudo tem como objetivo avaliar a quantidade de fármaco liberada por unidade de tempo e constitui um controle qualitativo do sistema de liberação, uma vez que fornece informações para os estudos *in vivo* (GORDON et al., 1995). A liberação foi realizada em um aparelho de dissolução utilizando o dispositivo de pás. O meio de dissolução utilizado foi o sistema tampão fosfato de sódio isotonizado pH 7,4 e etanol na proporção 7:3 (v/v), na temperatura de 37 °C (± 0,5°C). Primeiramente, 5mg das micropartículas estudadas e 400μL de meio receptor foram inseridas em uma membrana de diálise de 5cm de comprimento que, em seguida, teve suas extremidades fechadas. Essas membranas foram colocadas em cubas contendo 100mL de meio receptor com velocidade de agitação de 100rpm. Amostras da solução (1mL) foram coletadas em intervalos de tempos correspondentes à 1, 2, 4, 8, 12, 24 e 48h, e o volume coletado reposto com meio inicial. A concentração do fármaco liberado na fase receptora foi determinada por CLAE utilizando as condições descritas no item 3.2.1.

Considerando que o sistema utilizado é estático e a necessidade de se trabalhar em condições de *sink*, fez-se necessária à determinação do coeficiente de solubilidade.

3.2.7. Determinação da solubilidade do fármaco em tampão de fosfatos pH 7,4

O coeficiente de solubilidade do ácido retinóico foi determinado mediante o preparo de dispersões contendo excesso de ácido retinóico (1 mg/mL). Nesse procedimento, realizado em triplicata, 5mg de ácido retinóico foram transferidos para frascos âmbar com tampa. Em cada frasco foram adicionados 5mL de diferentes soluções de tampão fosfato, obtidas variando a concentração dos solventes: etanol (20% e 30%) e DMSO (5% e 10%). Essas dispersões foram homogeneizadas por meio de agitação magnética em banho termostatizado a 37±0,5°C por um período de 24 horas. Em seguida, foram filtradas em filtro Milipore ®, com auxílio de uma bomba a vácuo e cada filtrado foi analisado por CLAE (CORDO, 2006).

3.2.8. Estudos in vitro de permeação e retenção cutânea

3.2.8.1 Preparação das formulações

Os géis foram compostos por 10% de propilenoglicol, 0,025% de ácido retinóico veiculado nas micropartículas de alginato/quitosana (conforme descrito no item 3.2.2) e 0,4% de hidroxietilcelulose. A água e a hidroxietilcelulose foram pesados em becker e agitados magneticamente a velocidade de 5000rpm por 20 minutos com ligeiro aquecimento. Finalmente, as micropartículas previamente dispersas em propilenoglicol foram adicionadas ao gel sob agitação contínua. Um gel contendo 0,025% de fármaco livre e preparado de forma similar foi utilizado como controle.

3.2.8.2. Obtenção da pele

A pele da orelha de porco foi utilizada como modelo nos estudos preliminares de permeação/retenção *in vitro*. Para tal, a pele da parte externa das orelhas provenientes de animais recentemente sacrificados foi retirada da cartilagem com auxílio de pinça e bisturi, seguindo-se a remoção do tecido gorduroso remanescente na pele. As secções de pele foram então congeladas por até um mês antes de serem utilizadas nos ensaios.

3.2.8.3. Avaliação da recuperação do ácido retinóico extraído das amostras da pele

Para avaliar a recuperação do ácido retinóico nas amostras da pele, primeiramente o estrato córneo (EC) foi retirado de uma área de 1,77cm² da pele de orelha de porco com o uso de 15 fitas adesivas (tape stripping). As

fitas contendo o EC foram colocadas em um tubo de ensaio onde se adicionou concentrações conhecidas de uma solução metanólica do fármaco (Tabela 5).

Tabela 5. Quantidades de solução metanólica de ATRA adicionadas nas fitas adesivas contendo o EC ou na pele sem o EC para estudo de recuperação do fármaço.

Fármaco	Concentração de ATRA na solução metanólica (µg/mL)	Volume de solução metanólica adicionada à pele (μL)	Quantidade teórica de ATRA adicionado (μg)
ATRA	1000	100	100
ATRA	400	100	40
ATRA	40	100	4

O solvente foi evaporado e em seguida adicionou-se 4 mL de metanol, utilizado como solvente extrator, para a extração do ATRA das fitas contendo o EC. O tubo foi agitado por 2 min, submetido a banho de ultra-som por 30 minutos, seguido de filtração e quantificação por CLAE.

O pedaço de pele sem o EC foi picotado e transferido para um tubo Falcon. A este tubo foram adicionados volumes conhecidos da solução metanólica de ATRA (Tabela 5). O metanol foi evaporado e em seguida adicionou-se 4 mL do solvente extrator para a extração do fármaco. O tubo foi colocado no homogeneizador de tecidos por 1 min e em banho de ultrasom por mais 30 min, seguido de centrifugação, filtração utilizando membranas com poro de diâmetro 0,45μm e quantificação por CLAE (n=5).

A recuperação (R) foi determinada pela seguinte fórmula:

R = (concentração obtida / concentração real) x 100 $$\rm Equação\ 5$

3.2.8.4. Estudo in vitro de permeação e retenção cutânea

realizados experimentos de permeação in vitro (n=5)empregando células de difusão vertical tipo Franz com área difusional de 1,77 cm² (Hanson Instruments, Chatsworth, CA). O compartimento receptor (7mL) foi preenchido com tampão fosfato 100mmol/L pH 7,4 contendo 30% de etanol. A pele de orelha de porco foi colocada na célula de difusão, com o lado da derme em contato com a solução receptora. Cerca de 400 mg do gel contendo 0,025% ácido retinóico veiculado em micropartículas foram colocados sobre a área da pele e o sistema foi fechado. Os experimentos foram conduzidos a 37 °C e a solução receptora foi constantemente agitada a 300rpm por meio de um agitador magnético. Uma formulação na forma de gel, contendo 0,025% de ácido retinóico livre (não encapsulado), foi utilizado como controle. Em intervalos de tempo estabelecidos de 2, 4, 6, 8, 10 e 12 horas, as soluções receptoras foram coletadas para quantificação do fármaco permeado por CLAE (LOPES et al., 2005, LIRA et al., 2004 e 2007a).

Ao fim do experimento, as peles foram retiradas da célula de difusão e o excesso de formulação presente na pele foi delicadamente removido com auxílio de água destilada e estas foram, posteriormente, secas com papel absorvente. As peles foram então fixadas em uma superfície lisa com o estrato córneo (EC) voltado para cima, presas com alfinetes e cobertas por fita adesiva, deixando exposta apenas a área de permeação. Foram aplicadas

15 fitas adesivas (Adere®), sendo a primeira fita desprezada, até total remoção do EC que foi indicado pelo brilho na face exposta da pele, ou seja, atingiu-se a epiderme viável (LOPES et al., 2005, LIRA et al., 2007a). As fitas foram unidas e colocadas em tubos de extração contendo 4,0 mL de metanol e agitadas em "vortex" por 2 minutos. Em seguida, foram deixadas por 30 minutos em banho ultra-som e filtradas em membranas com diâmetro de poro de 0,45μm. O tecido cutâneo restante, epiderme viável + derme (E + D) foi picotado e homogeneizado em 4mL de metanol por 1 minuto, e em seguida, deixado por 30 minutos em banho de ultra-som para rompimento das células. A suspensão obtida foi centrifugada e também filtrada em membranas de poro 0,45μm. As concentrações do fármaco presentes no EC e na E + D foram quantificadas no filtrado por CLAE.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Desenvolvimento da metodologia analítica para quantificação de ácido retinóico por cromatografia líquida de alta eficiência (clae).

4.1.1. Obtenção do espectro de absorção do ácido retinóico na região do UV

A Figura 17 mostra o espectro de varredura do ácido retinóico na faixa de 250-500 nm.

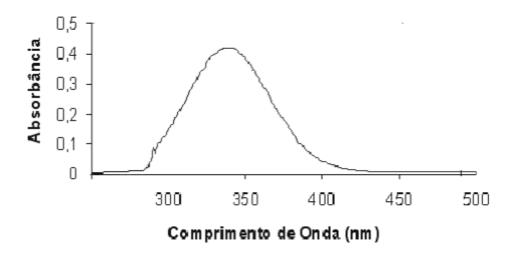


Figura 17. Espectro de absorção do ácido retinóico na região de 250-500 nm em solução metanólica de 5 μg/mL, cela de quartzo de 1 cm de caminho óptico; temperatura de 25°C <u>+</u> 2°C; Espectrofotômetro UV visível – BECKMAN – DU-70

O pico de absorção máximo encontrado para o ácido retinóico ocorreu em 348 nm, valor próximo ao encontrado na literatura (λ=352nm) (Index Merck, 1996). Valores ligeiramente diferentes podem ocorrer, decorrentes de dissolução, solvatação, clivagem de retículo cristalino, conformações moleculares, pontes de hidrogênio, interação com o solvente e temperatura (BERBENNI et al., 2001).

IOELE et al, (2005) analisaram o espectro de absorção na região UV do ácido retinóico em uma solução etanólica, registrado em um gráfico de calibração entre 190 e 500 nm obtendo uma absorbância máxima em 349 nm para o ácido retinóico.

4.1.2. Obtenção da curva analítica do ácido retinóico

A Tabela 6 apresenta os parâmetros utilizados na elaboração da curva analítica do ácido retinóico.

As condições de análise para a padronização do método analítico foram baseadas em dados da literatura (MOTTO et al., 1989) e nos estudos realizados por CORDO (2006). A obtenção do espectro na região do UV para o ácido retinóico determinou o comprimento de onda a ser utilizado para a análise.

A determinação da linearidade da curva analítica foi realizada empregando a equação da reta (y=bx + a), o coeficiente de correlação linear (r) e o coeficiente de variação entre os pontos da curva (CV%). A metodologia para a análise do ácido retinóico mostrou linearidade na faixa de 1,0 a 25 μg/mL, com coeficiente de correlação linear de 0,9999. Segundo a ANVISA

(Resolução-RE número 475, 19/03/2002) o coeficiente de correlação linear deve ser igual ou superior a 0,95. Sendo assim, o valor de r obtido para a análise do ácido retinóico está dentro dos limites estabelecidos.

Tabela 6. Parâmetros utilizados para a elaboração da curva analítica do ácido retinóico.

Área	K
131979,6	7,57693. 10 ⁻⁶
340610,8	7,33976. 10 ⁻⁶
632282,8	7,90785.10-6
1316131,0	7,59803.10-6
3340703,0	7,48345. 10 ⁻⁶
	131979,6 340610,8 632282,8 1316131,0

Média= 7,5812. 10-6

Desvio Padrão=2,09078. 10⁻⁷

K= concentração/área

A Figura 18 mostra a curva analítica obtida para o ácido retinóico em metanol. As padronizações foram realizadas partindo-se de quantidades conhecidas de ácido retinóico obtidas a partir de uma solução estoque na concentração de 50 μg/mL (padronização externa).

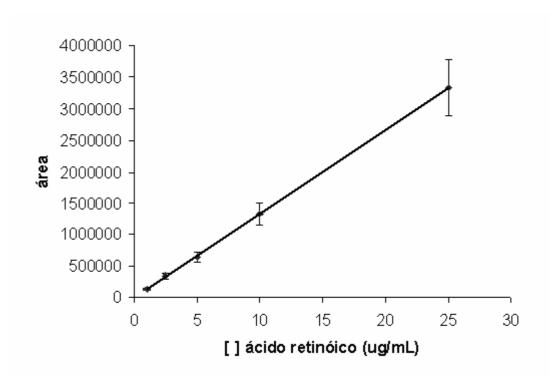


Figura 18. Representação da curva analítica do ácido retinóico obtido por CLAE (1,0 – 25,0 μg/mL). Os resultados apresentados representam a média ± desvio padrão de três determinações (n = 3). Equação da reta: y =133836x – 12029; coeficiente de correlação linear: (r) = 0,9999.

O cromatograma obtido a partir das condições de análise de quantificação do ácido retinóico está representado na Figura 19. O tempo de retenção obtido variou de 9,8 a 10,3 minutos para o ácido retinóico.

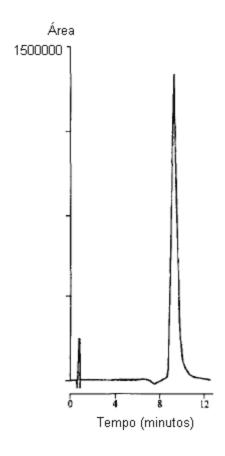


Figura 19. Representação do cromatograma do ácido retinóico obtido por CLAE. As análises foram realizadas em cromatógrafo modelo SPD 10 AVP, equipado com detector UV-VIS (348 nm), bomba LC-10 AD e computador com programa LC-10. Coluna C₁₈ fase reversa Lichrocart® (Merck, 185 x 5 mm, 5μm) e pré-coluna 4 x 4 mm (5μm) (25 ± 1°C). Fase móvel: água acidificada com 1,2% (v/v) de ácido acético glacial, acetonitrila, isopropanol e metanol; fluxo de 1,2mL/minuto e volume injetado correspondente a 20μL.

4.1.3. Validação da metodologia analítica

Os resultados referentes à avaliação da precisão e da exatidão inter e intra-ensaio foram baseados na determinação de CV% e E% obtidos empregando as equações 1 e 2 do item 3.2.1.4. Os valores obtidos estão relacionados nas Tabelas 7 e 8.

Tabela 7. Valores obtidos na avaliação da precisão e exatidão intra-ensaio.

Concentração	Concentração	%CV	%E intra-ensaio	
teórica	obtida (μg/mL)	Precisão		
(µg/mL)		intra-ensaio		
2,50	2,73	0,97	0,06	
5,00	5,03	1,23	-0,01	
n=5				

Tabela 8. Valores obtidos na avaliação da precisão e exatidão inter-ensaio.

Concentração	Concentração	%CV	%E	
teórica	obtida (μg/mL)	Precisão	inter-ensaio	
$(\mu g/mL)$		inter-ensaio		
2,50	2,70	5,54	0,08	
5,00	4,95	1,95	-0,01	
n=5				

O processo de validação é importante para detectar erros de procedimento analítico e oferecer evidências comprovadas que o método

realiza o que se pretende, Inicialmente é necessário validar o método analítico em termos de precisão e exatidão, curva de calibração e linearidade.

A precisão de um método analítico é uma medida do erro aleatório entre as medidas efetuadas com a mesma amostra e pode ser expressa como a porcentagem do coeficiente de variação (% CV). A exatidão é uma medida do erro sistemático e é definida como a relação entre o valor medido e o valor teórico. A ANVISA (Resolução-RE número 475, 19/03/2002) e Causon et al (1997), recomendam que a % CV e % E não devem exceder 15%. Assim, os valores encontrados (Tabelas 7 e 8) atendem os limites estabelecidos.

Com relação à seletividade do método, não foram observados interferentes em nenhuma das amostras analisadas a partir da pele e dos excipientes no comprimento de onda utilizado.

4.2. MICROPARTÍCULAS DE QUITOSANA

4.2.1. Micropartículas de quitosana obtidas por emulsão múltipla

4.2.1.1. Desenvolvimento do método

O método de emulsão múltipla para obtenção de micropartículas de quitosana representa uma técnica alternativa para encapsulação de fármacos hidrofóbicos. Ela foi usada primeiramente por PAVANETO et al. (1996) que constataram vários parâmetros importantes na obtenção dessas partículas. A princípio, esses autores avaliaram condições que interferem na formação de emulsões simples e múltiplas, como proporção da fase oleosa/aquosa, velocidade e tipo de agitação, concentração e tipo de emulsificante entre outras, para padronizar o método. Em seguida, alguns parâmetros relacionados ao fármaco, ao polímero e ao agente cross-linking foram testados, demonstrando a grande influência deles na morfologia, na eficiência de encapsulação e no perfil de liberação dessas partículas. Essas mesmas variáveis foram posteriormente estudadas por GENTA et al. (1997), que confirmaram a importância destes na formação das micropatículas.

Desta forma, neste estudo, primeiramente, procurou-se variar alguns parâmetros na preparação das micropartículas, visando a obtenção de uma emulsão primária estável, com viscosidade que permitisse sua adição na fase oleosa externa para formação de uma emulsão múltipla. Esta emulsão formada deveria ser capaz de favorecer o cross-linking e enrijecimento da parede das gotículas, formando micropartículas com boa eficiência de

encapsulação e com potencial para a liberação sustentada do fármaco veiculado.

4.2.1.2. Caracterização Físico-Química

As fotografias das micropartículas obtidas na análise por microscopia óptica (M.O.) podem ser visualizadas na figura 20.

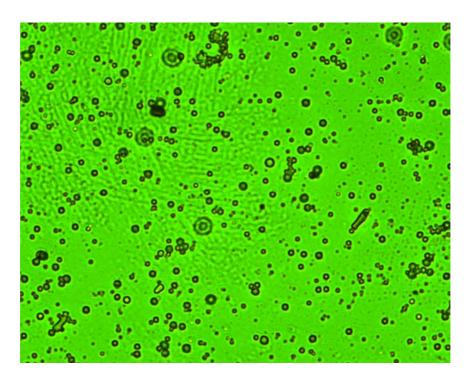


Figura 20: Fotografia das micropartículas preparadas a partir do método da emulsão múltipla, obtidas por M.O. (aumento de 360X).

Apesar das modificações realizadas na preparação dessas micropartículas, a eficiência de encapsulação do ácido retinóico foi muito baixa, inferior a 5%, demonstrando que o método utilizado na preparação parece não ser adequado.

GENTA et al., (1997) afirmaram que a preparação das micropartículas pelo método da emulsão múltipla resultaria em uma boa eficiência de encapsulação para fármacos hidrofóbicos, como o cetoprofeno, mas o mesmo não ocorreu com o ácido retinóico.

A emulsão múltipla O/A/O foi devidamente formada. No entanto, acredita-se que quando se procedia à etapa de evaporação dos solventes (água e diclorometano) havia uma tendência de que o fármaco, que estava na fase orgânica interna, migrasse para a fase oleosa externa de óleo mineral, devido à sua baixa polaridade. Isso poderia explicar a baixa eficiência do processo de encapsulação.

Em ensaios posteriores, tentou-se reduzir esta tendência de migração do ácido retinóico para a fase externa. Para tanto, foi adicionado 0,05% do fármaco ao óleo mineral, entretanto, mais uma vez a eficiência de encapsulação não ultrapassou os 5%. Quantidades maiores de ácido retinóico adicionadas à fase oleosa externa poderiam aumentar a taxa de encapsulação, no entanto, a quantidade de fármaco utilizada para aumentar a eficiência de encapsulação inviabilizou o procedimento. Dessa forma, as análises de caracterização físico-química destas micropartículas foram interrompidas.

Além dos fatores citados, verificamos que o método consiste em um procedimento demorado, exaustivo e de difícil transposição de escala, além da utilização de agentes de cross-linking tóxicos, fatores que constituem fortes limitações do método.

A partir destes resultados, optou-se por outra técnica de preparação das micropartículas, utilizando-se ainda o mesmo polímero, a quitosana. A

nova técnica a ser utilizada foi baseada no método de geleificação ionotrópica proposto por KO et al. (2002) que consistiu na preparação de uma emulsão simples óleo/água, seguida do cross-link iônico com tripolifosfato de sódio (TTP) e da evaporação do solvente.

4.2.2. Micropartículas de quitosana obtidas por geleificação ionotrópica

4.2.2.1. Desenvolvimento do método

As micropartículas foram preparadas por interação iônica entre o grupo amino carregado positivamente da quitosana e o contra-íon carregado negativamente do tripolifosfato (TTP), um ânion multi-valente que não apresenta toxicidade. Essa interação pode ser controlada pela densidade da carga do TTP e da quitosana, que é dependente do pH da solução. PUTTIPIPATKHACHORN et al. (2001) relataram ainda que a matriz da quitosana pode ainda ser modificada pela massa molecular (MM) e pelo grau de deacetilação da quitosana, onde se observou que quanto maior a MM e o grau de deacetilação, menor a velocidade de liberação do fármaco a partir das micropartículas obtidas. KO et al. (2002) confirmaram a importância da MM da quitosana no comportamento de liberação, além de verificar a influência de outros parâmetros como a concentração da solução de quitosana, o tempo de cross-linking e a concentração e o pH da solução de TTP nas características das micropartículas formadas.

4.2.2.2. Caracterização físico-química

4.2.2.2.1. Análise morfológica das micropartículas:

A fotografias das micropartículas antes da liofilização obtidas por microscopia ótica (M.O.) estão apresentadas na figura 21, onde podem ser visualizados os cristais do fármaco disperso na matriz das micropartículas.



Figura 21: Fotografias das micropartículas de quitosana preparadas a partir do método de geleificação ionotrópica, obtidas por M.O. (aumento de 360X).

A micrografias das micropartículas após liofilização obtidas por microscopia eletrônica de varredura estão apresentadas nas Figuras 22, 23 e 24, onde se pode observar a sua superfície irregular.

A Figura 22 mostra as fotomicrografias das micropartículas de quitosana-TTP preparadas com quitosana de diferentes MM. A MM alterou discretamente a morfologia das micropartículas, onde é visto que aquelas produzidas com quitosana de maior MM (quitosana DCMF) apresentaram superfície mais densa que a de menor MM (quitosana HCMF). Com o aumento da MM da quitosana, a viscosidade da solução de quitosana aumenta o que resulta em micropartículas com parede relativamente mais espessa após interação com TTP (KO et al., 2002). Estes resultados estão de acordo com KO et al. (2002) que verificaram que aumento da MM da

quitosana empregada resultou na obtenção de microparticulas mais esféricas.

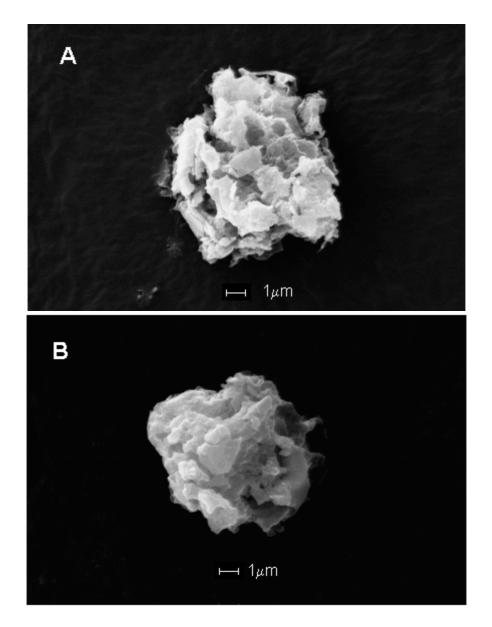


Figura 22. Fotomicrografias das micropartículas (A) – preparadas com quitosana HCMF e (B) – preparadas com quitosana DCMF (aumento de 15000X).

A Figura 23 mostra as fotomicrografias das micropartículas de quitosana-TTP preparadas com a adição de diferentes solventes orgânicos na emulsão O/A.

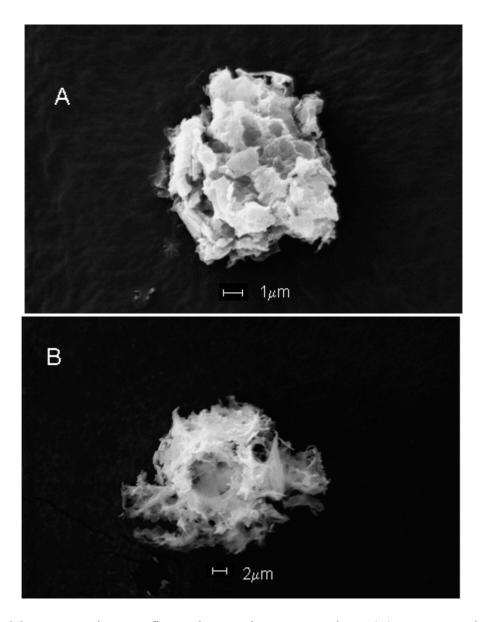


Figura 23. Fotomicrografias das micropartículas (A) preparadas com diclorometano (aumento de 15000X) e (B) preparadas com clorofórmio (aumento de 5000X).

O clorofórmio é mais volátil que o diclorometano e poderia causar alterações na morfologia das micropartículas após sua evaporação. De fato, as micropartículas preparadas com clorofórmio foram diferentes daquelas preparadas com diclorometano, onde a primeira apresentou superficie mais porosa que a última.

O grau de ionização do TTP é dependente do pH da sua solução. Em solução original (pH 8,5), TTP é dissociado em OH- e ions TTP (HP₃O₁₀-4 e P₃O₁₀-5) enquanto em pH mais baixo apenas ânions P₃O₁₀-5 estão presentes. Todavia, quitosana é uma polibase fraca que tem a ionização do seu grupo amina aumentada com a diminuição do pH. Dessa forma, micropartículas de quitosana preparadas em sua solução original apresentam apenas uma reação de cross-linking leve, enquanto aquelas preparadas em solução acidificada resultariam em máximo cross-linking superficial (MI et al., 1999; SHU; ZHU 2000, 2001; LEE et al., 2001).

As micropartículas de quitosana obtidas em pH 2,0 apresentaram superfície mais lisa e menos porosa que àquelas obtidas com pH 5,0 (Figura 24). Estes resultados mais uma vez estão de acordo com KO et al. (2002), que observaram a formação de partículas mais lisas e esféricas utilizando pH 2,5 quando comparado ao pH 5,0 e 8,5. Não foi possível a obtenção de micropartículas com pH 8,5, onde foi observado apenas a dispersão polimérica, sem encapsulação do fármaco.

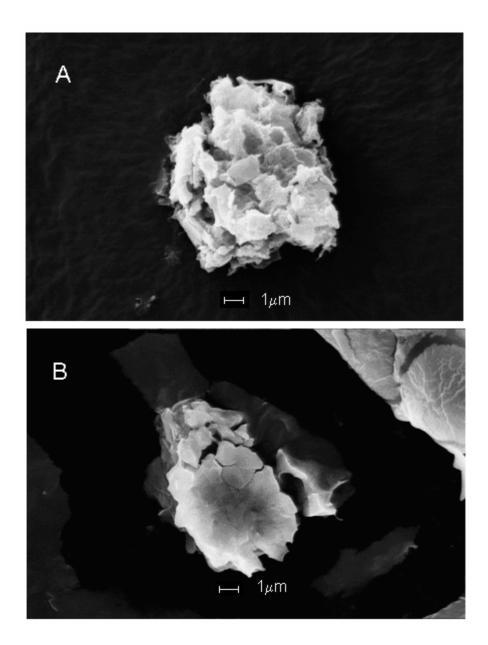


Figura 24. Fotomicrografias das micropartículas (A) preparadas com solução de TTP pH 5,0 e (B) preparadas com solução de TTP pH 2,0 (aumento de 15000X).

4.2.2.2. Determinação do rendimento do processo e da eficiência de encapsulação do ácido retinóico:

Os valores relativos aos cálculos do rendimento do processo estão apresentados na Tabela 9 onde uma variação entre 54 e 63% foi observada para os processos que utilizaram pH 2,5 e 5,0, com exceção daquele que utilizou pH 8,5, onde não se verificou a formação das micropartículas.

Tabela 9. Valores do rendimento do processo e eficiência de encapsulação das micropartículas de quitosana-TTP preparadas por geleificação ionotrópica.

PARÂMETROS					
		TTP	Diâmetro do	Rendimento	Eficiência de
Quitosana	Solvente	рН	orifício	(%)	encapsulação (%)
HCMF	Diclorometano	5,0	1,0mm	63,27	46,83 ± 2,91
HCMF	Diclorometano	5,0	0,7mm	55,94	$34,65 \pm 2,71$
HCMF	Clorofórmio	5,0	0,7mm	60,24	$35,79 \pm 2,83$
DCMF	Diclorometano	5,0	0,7mm	54,12	$43,\!89\pm3,\!66$
HCMF	Diclorometano	2,0	0,7mm	54,48	$30,4 \pm 8,88$
DCMF	Diclorometano	8,5	0,7mm	37,45	0.83 ± 0.60

A eficiência de encapsulação máxima, correspondente a 46%, foi obtida para as micropartículas preparadas com diâmetro do bico atomizador de 1,0mm. Para as micropartículas preparadas com quitosana de alta MM (quitosana DCMF) a eficiência de encapsulação foi de 43%. Micropartículas preparadas com pH 5,0 aumentaram a eficiência de encapsulação quando comparadas àquelas preparadas em pH 2,0. Não houve diferença na

eficiência de encapsulação entre as micropartículas produzidas com clorofórmio e diclorometano.

KO et al. (2002) encontraram valores de eficiência de encapsulação superiores a 90% para as micropartículas contendo felodipina e não houve diferença significativa entre as quitosanas de MM diferentes que foram testadas. A explicação dada pelos autores para a alta eficiência de encapsulação obtida foi a baixa solubilidade da felodipina que impedia sua migração para fase externa das micropartículas durante o processo.

O ácido retinóico é um fármaco de baixa solubilidade em meio aquoso o que dificultaria sua migração do interior das micropartículas para a solução de TTP ou a sua remoção durante a filtração e a lavagem, mostrando que existem outros fenômenos associados à eficiência de encapsulação mais baixa obtida.

4.2.2.3. Estudo de interação fármaco-polímero utilizando DSC e FTIV

A avaliação de incompatibilidades entre o composto ativo e os diferentes excipientes utilizados são importantes para verificar a estabilidade térmica antes da obtenção de um produto final (LIRA et al, 2007b e c) Para examinar a interação da quitosana com o ácido retinóico, técnicas de DSC e FTIV foram empregadas.

A figura 25 mostra as curvas termoanalíticas obtidas para o fármaco, o polímero, a mistura física e para as micropartículas.

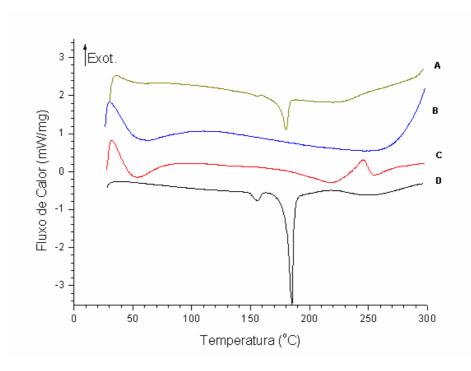


Figure 25. Curvas termoanalíticas obtidas por DSC do fármaco puro (A), da quitosana isolada (B), das micropartículas de quitosana (C) e da mistura física fármaco:polímero (1:1) (D).

A quitosana não exibiu pico endotérmico devido a sua forma amorfa. No caso do ácido retinóico e da mistura física, um pico endotérmico correspondente a fusão do fármaco foi observado em 185°C e 180°C, respectivamente. Esse pequeno desvio observado na mistura física pode corresponder tanto a uma interação fármaco:polímero quanto à sua solubilização no polímero. Para elucidação, técnicas complementares como espectrofotometria FTIV devem ser utilizadas.

Por outro lado, a curva de DSC das micropartículas apresentou um pico endotérmico largo aproximadamente em 219°C que pode corresponder a um desvio do pico de fusão do ácido retinóico, sugerindo a formação de um

par iônico ou interação entre o ácido carboxílico do fármaco e o grupo amina da quitosana (LIRA et al., 2007c).

Os espectros de FTIV obtidos a partir da análise da quitosana e ácido retinóico estão de acordo com os espectros citados na literatura (CHIHARA; WADELL, 1980; RODSLY et al., 1983; 1986) e estão apresentados nas Figuras 26 e 27. Os espectros de FTIV obtidos a partir da mistura física e das micropartículas estão apresentados nas Figuras 28 e 29 e foram comparados aos primeiros para análise de possíveis interações entre os excipientes. As bandas de interesse foram indicadas com setas.

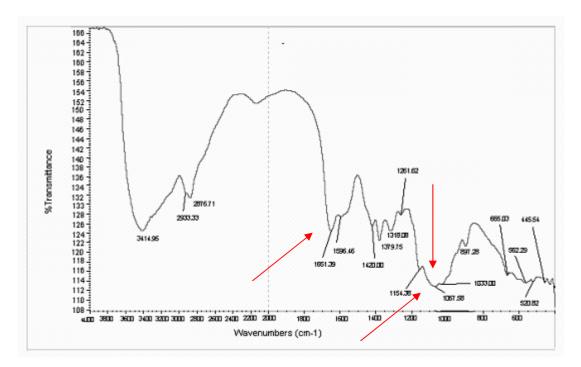


Figura 26. Espectro de FTIV da quitosana isolado.

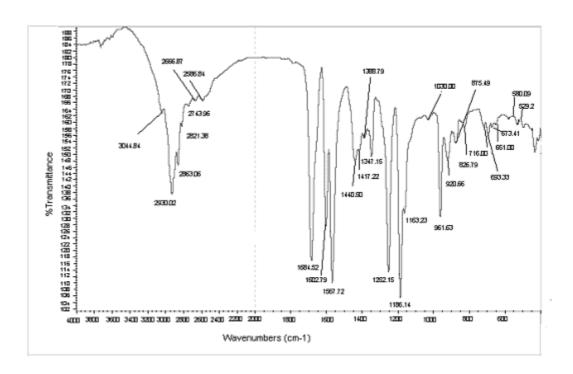


Figura 27. Espectro de FTIV do ácido retinóico isolado.

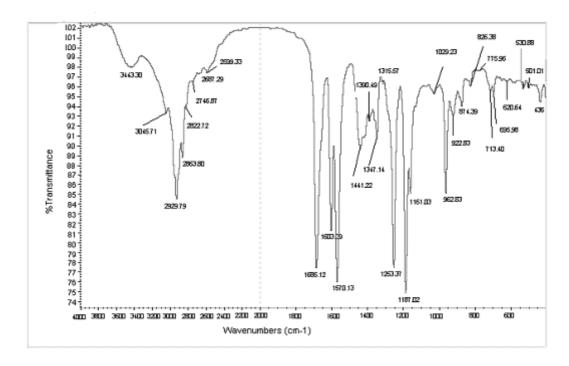


Figura 28 Espectro de FTIV da mistura física fármaco:polímero (1:1).

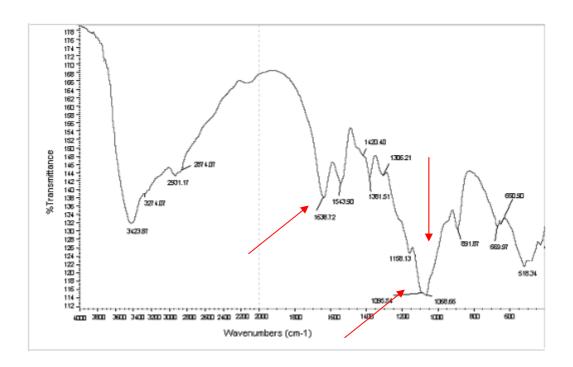


Figura 29. Espectro de FTIV das micropartículas estudadas.

Quando se comparam os espectros da quitosana e do ácido retinóico (Figuras 26 e 27) com o espectro obtido a partir das micropartículas (Figura 29) observam-se alterações e deslocamentos das bandas nas regiões entre 1030-1170 cm⁻¹ e 1600cm⁻¹. Estas alterações podem ser atribuídas às ligações C – N e N – C = O indicando forte associação entre os grupos carboxilato do ácido retinóico e os grupamentos amina da quitosana (LIRA et al., 2007c). Essa associação pode ser responsável pela baixa eficiência de encapsulação obtida.

As modificações observadas no espectro das micropartículas não foram verificadas na mistura física (Figura 28) sugerindo que não há interação fármaco/polímero nessa mistura.

A reação direta entre a quitosana e o ácido retinóico não é conhecida, mas há alguns exemplos de formação de amidas (amidação) por reação entre

quitosana (uma poliamina) e ácidos carboxílicos diversos (cítrico, maleico, succínico) ou anidridos (DON; CHEN, 2005; BODNAR et al., 2005; SHIMIZU et al., 2005; KAST; BERNKOP-SCHNÜRCH, 2001; ROGOVINA et al., 2000; SASHIWA et al., 2003). Inclusive a reação entre a quitina ou a quitosana e ácidos carboxílicos simples como ácido acético e seu anidrido, já são conhecidos (SASHIWA et al., 2003).

Foi encontrado também que a quitosana pode interagir com fármacos ácidos levando a modificações nas características do fármaco e do polímero. As interações entre quitosana e fármacos de caráter ácido, como a indometacina e o ácido salicílico, já foram relatadas anteriormente, todavia, interações entre este polímero e fármacos de caráter básico, como a teofilina, não foram observadas (IMAI et al., 1991; PUTTIPIPATKHACHORN et al., 2001).

Outros fatores também têm contribuído para sugerir uma possível interação entre quitosana e ácido retinóico como:

- o ácido retinóico combinado com a quitosana exibiu efeito sinérgico na diferenciação das células na leucemia mielóide.
- 2. a análise dos espectros de IV e UV do ácido retinóico têm demonstrado que o ácido retinóico forma agregados moleculares mesmo com moléculas pouco polares (CHIHARA; WADELL, 1980; RODSLY et al., 1983; 1986), e por isso formaria mais facilmente com moléculas mais polares como a quitosana.

Assim, pode-se afirmar que houve interação entre os grupos carboxilícos do ácido retinóico e os grupos amina da quitosana formando sais de retinoato ou retinoamidas.

4.2.2.4. Determinação *in vitro* do perfil de liberação do ácido retinóico a partir das micropartículas estudadas

Após o desenvolvimento de uma forma farmacêutica, os testes de avaliação *in vitro* do perfil de liberação servem para avaliar a quantidade de fármaco liberado por unidade de tempo. Os estudos realizados *in vitro* constituem um controle qualitativo do sistema de liberação e fornecem informações para um posterior estudo *in vivo*. A realização do estudo *in vitro* é importante porque reduz o número de amostras consideradas adequadas para a realização dos testes *in vivo* (GORDON et al, 1995).

4.2.2.4.1. Solubilidade do fármaco em tampão fosfato pH 7,4

Considerando que os ensaios de liberação visam a quantificação do fármaco liberado a partir dos sistemas microparticulados desenvolvidos e que estes ensaios são conduzidos em um sistema fechado onde o fármaco liberado será recebido em solução aquosa (meio receptor), fez-se necessária a realização de ensaios visando a determinação da solubilidade do ácido retinóico no meio receptor acrescido de agentes solubilizantes.

O etanol e o DMSO foram testados para a solubilização do fármaco no meio de dissolução.

As concentrações foram avaliadas utilizando a CLAE.

As soluções de tampão fosfato pH 7,4 que foram utilizadas, a solubilidade e o coeficiente de solubilidade do ácido retinóico estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10. Soluções de tampão de fosfatos pH 7,4 que foram utilizadas, solubilidade e coeficientes de solubilidade do ácido retinóico (CORDO, 2006).

Soluções tampão	Solubilidade	Coeficiente de	
fosfato	$(\mu g/mL)$	solubilidade (%)	
pH 7,4			
20% de etanol	20,78	2,0	
30% de etanol	701,80	70,18	
5,0% de DMSO	24,97	2,5	
10% de DMSO	267,00	26,7	

Considerando a determinação do coeficiente de solubilidade do ácido retinóico, os dados obtidos indicaram que o meio acrescido de 30% de etanol foi o que melhor solubilizou o ácido retinóico, proporcionando condições "sink", sendo então o meio escolhido para os ensaios utilizados na determinação do perfil de liberação in vitro.

THAKKER E CHERN (2003) desenvolveram um método de validação para o ácido retinóico em formulações semi-sólidas, e observaram que a maior solubilidade desse ácido foi em solução tampão fosfato pH 5,5 contendo 30-35% de etanol. Observa-se que mesmo variando o pH das soluções tampão fosfato, a melhor solubilidade do ácido retinóico acontece em meio que contenha 30% de etanol.

4.2.2.4.2. Perfil de liberação in vitro

Os resultados dos ensaios para a determinação do perfil de liberação do ácido retinóico a partir das micropartículas de quitosana está apresentado na Figura 30. Ocorreu apenas uma liberação inicial de aproximadamente 20% do fármaco durante o intervalo de tempo estudado (LIRA et al., 2007c).

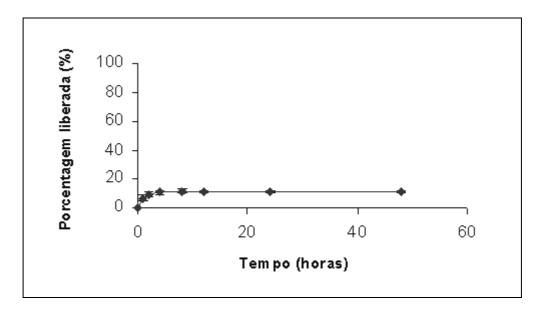


Figura 30. Perfil de liberação *in vitro* do ácido retinóico a partir das micropartículas de quitosana preparadas pelo método de geleificação ionotrópica (spray de 0,7 mm de diâmetro, vazão do ar de 20ml/min e quitosana HCMF) (n=5).

O fato do ácido retinóico não ser totalmente liberado pode ser explicado através dos resultados do ensaio anterior onde observamos a interação entre a quitosana e o ácido retinóico, provavelmente decorrente de uma forte associação entre os grupos carboxílicos do fármaco e grupamentos aminas da quitosana. Isto explicaria a dificuldade das micropartículas em

disponibilizar o fármaco no meio receptor. O mesmo foi observado com o ácido salicílico veiculado em filmes de quitosana, que apresentou perfil de liberação mais sustentado, provavelmente devido à interação com o polímero e a viscosidade do sistema (PUTTIPIPATKHACHORN et al., 2001).

De acordo com os resultados obtidos acima que inviabilizaram a continuidade do estudo utilizando o sistema proposto, um novo sistema microparticulado foi desenvolvido utilizando alginato como polímero e quitosana como agente cross-linking. Desta forma, a interação entre quitosana e ácido retinóico pode ser evitada já que o polímero vai atuar apenas na superfície como um revestimento das micropartículas.

4.3. MICROPARTÍCULAS DE ALGINATO REVESTIDAS COM QUITOSANA

4.3.1. Desenvolvimento do método

As micropartículas foram preparadas utilizando alginato de sódio e quitosana, dois polímeros naturais que têm sido bastante utilizados, isolados ou em associação, para a obtenção desses sistemas utilizando a técnica de geleificação ionotrópica (CHANDY; SHARMA, 1993; BODMEIER et al., 1989, KIM; LEE, 1992; MURATA et al., 1993a e b; SEZER; AKBUGA, 1995, 1999a e b). Apesar de serem extensivamente utilizados, os "beads" de alginato de sódio, apresentam inconvenientes quanto a sua utilização devido a um problema de erosão do gel que resulta em uma liberação rápida do fármaco (MURATA et al., 1993a). A utilização da quitosana como agente superficial de revestimento tem mostrado suprimir esta erosão e assim, retardar a liberação (MURATA et al., 1993b). Desta forma, micropartículas de alginato/quitosana foram preparadas a partir da modificação do método de geleificação ionotrópica proposto por SEZER; AKBUGA (1999a e b).

A pressão do ar de 1KgF não resultou em partículas microscópicas e assim, não foi utilizada nos estudos posteriores. As concentrações entre 2,0 e 3,25 % de alginato de sódio não permitiram a formação das micropartículas devido às condições do equipamento, já que uma nebulização eficiente não foi obtida (mesmo com a elevação da vazão do ar a valores como 40mL/min), devido a alta viscosidade da emulsão formada. Desta forma, apenas as micropartículas contendo 1% de alginato de sódio

preparadas a uma pressão de 3 KgF e os demais parâmetros já relatados foram mantidos nas etapas posteriores.

4.3.2. Caracterização físico-química

4.3.2.1. Análise morfológica das partículas

As fotografias das micropartículas antes da liofilização, obtidas por microscopia ótica (M.O.) estão apresentadas na Figura 31, onde podem ser visualizadas micropartículas esféricas (A) e com uma pequena saliência decorrente do processo de gotejamento (B).

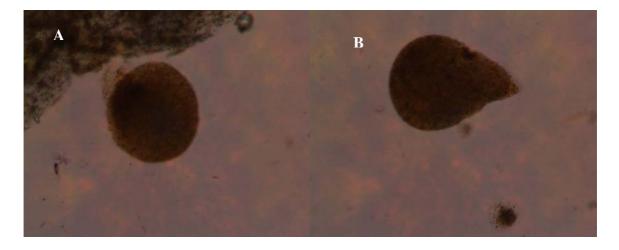


Figura 31. Fotografias das micropartículas de alginato/quitosana preparadas pelo método de geleificação ionotrópica, obtidas por M.O. (aumento de 360x).

As micrografias das micropartículas após liofilização obtidas por microscopia eletrônica de varredura estão apresentadas nas Figuras 32 e 33, onde se observou que elas apresentaram forma esférica com superfície

irregular, principalmente àquelas onde a quantidade de ácido retinóico foi aumentada de 0,1% para 0,5%.

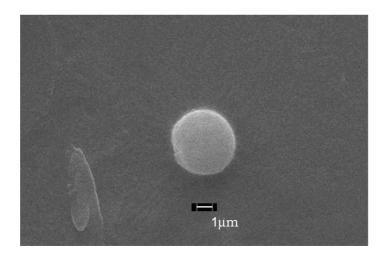


Figura 32. Fotomicrografia das micropartículas de alginato/quitosana utilizando 0,1% ácido retinóico obtidas por MEV (aumento de 15000X).

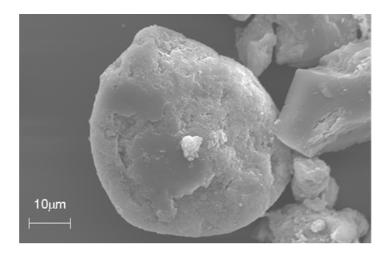


Figura 33. Fotomicrografia das micropartículas de alginato/quitosana utilizando 0,5% ácido retinóico obtidas por MEV (aumento de 4000X).

As partículas apresentaram diâmetro médio correspondente a 148 μm com 10% apresentando diâmetro < que 10μm, 50% com diâmetro < 79μm e 90% com diâmetro < 335μm.

Existem muitos trabalhos na literatura onde esse método é empregado por diferentes grupos para obtenção de micropartículas com diâmetro menor que 200µm (KU et al., 1995; WEE; GOMBOTZ; FANSLOW, 1995; BOWERSOCK et al., 1996; GOMBOTZ; WEE, 1998). O tamanho dessas micropartículas pode ser ajustado mediante o controle da pressão do sistema de extrusão, da velocidade do fluxo da solução de alginato de sódio que vai ser nebulizado e da distância entre o orificio e a superfície da solução de cross-linking (GOMBOTZ; WEE, 1998). Embora esses parâmetros pudessem ser utilizados para obtenção de partículas com uma faixa de distribuição de tamanho mais estreita, algumas limitações tecnológicas impediram a otimização do processo.

4.3.2.2. Determinação do rendimento e da eficiência de encapsulação do ácido retinóico

O rendimento do processo, conforme apresentado na Tabela 11, correspondeu a mais de 45% para a maioria dos processos, com exceção daquelas produzidas com 2% de alginato (rendimento de aproximadamente 20%) já que o equipamento não permitiu uma nebulização eficiente face a maior viscosidade da emulsão.

Tabela 11. Valores do rendimento do processo e eficiência de encapsulação das micropartículas de alginato/quitosana.

		Ácido				Rendimento	Eficiência
Alginato	Solvente	Retinóico	Quitosana	Pressão	Vazão	(%)	(%)
3,25%	diclorometano	0,10%	0,20%	3KgF	20mL/min	-	-
2,00%	diclorometano	0,10%	0,20%	3KgF	20mL/min	-	-
3,00%	diclorometano	0,10%	0,20%	3KgF	40mL/min	-	-
2,00%	diclorometano	0,10%	0,20%	3KgF	40mL/min	20,63	$12,84 \pm 1,81$
1,00%	diclorometano	0,10%	0,20%	3KgF	20mL/min	50,9	$2,63 \pm 0,83$
1,00%	diclorometano	0,10%	0,20%	1KgF	20mL/min	50.9	$3,\!25\pm0,\!66$
1,00%	diclorometano	0,50%	0,20%	3KgF	20mL/min	56.4	21.62 ± 1.71
1,00%	diclorometano	0,50%	0,40%	3KgF	20mL/min	71.0	25.11 ± 0.37
1,00%	clorofórmio	0,50%	0,20%	3KgF	20mL/min	48.4	43.72 ± 1.61
1,00%	clorofórmio	0,50%	0,40%	3KgF	20mL/min	56.0	47.46 ± 4.47

As micropartículas preparadas com 0,1% de ácido retinóico apresentaram baixa eficiência de encapsulação (< 5%). A utilização de uma maior quantidade de fármaco (0,5%) e de quitosana levou a uma eficiência de encapsulação aumentada, estando de acordo com os dados apresentados por SEZER; AKBUGA (1999a e b) onde concentrações crescentes de fármaco e de quitosana resultaram em aumentos significativos na eficiência de encapsulação.

As micropartículas obtidas com o clorofórmio em substituição ao diclorometano apresentaram valores de eficiência de encapsulação maiores, atingindo 48%. Isto pode ser explicado pelo fato do ácido retinóico ser menos solúvel no diclorometano Assim, no momento da formação da emulsão o

fármaco encontra-se disperso de forma não homogênea no solvente orgânico, resultando em valores de eficiência de encapsulação variáveis. RODRIGUEZ-LLIMÓS; BREGNI; SANTOS-CARVALLIDO (2003) veicularam o ácido retinóico em micropartículas de alginato, mas não obtiveram eficiência de encapsulação superior a 30%.

4.3.3. Estudo de interação fármaco-polímero utilizando DSC e espectroscopia de FTIV

A Figura 34 mostra as curvas termoanalíticas do fármaco, do polímero, da mistura física e das micropartículas.

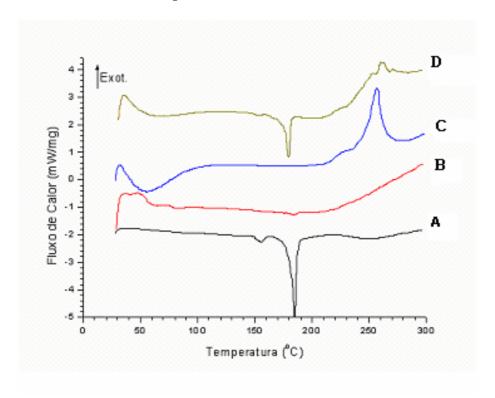


Figure 34. Curvas termoanalíticas obtida por DSC do fármaco puro (A), micropartículas de alginato/quitosana (B) alginato de sódio (C), e mistura física fármaco:polímero (1:1) (D).

O alginato de sódio não apresentou pico endotérmico devido a sua forma amorfa. Houve um desvio do pico endotérmico do ácido retinóico livre de 185 °C para 179,6 °C na mistura física. O pico endotérmico do fármaco não foi observado na curva das micropartículas. A espectrofotometria FTIV foi utilizada para confirmação das possíveis interações.

Os espectros de FTIV obtidos a partir da análise do alginato de sódio, da mistura física fármaco:polímero (1:1) e das micropartículas obtidas com 0,5% de fármaco estão apresentados nas Figuras 35, 36 e 37.

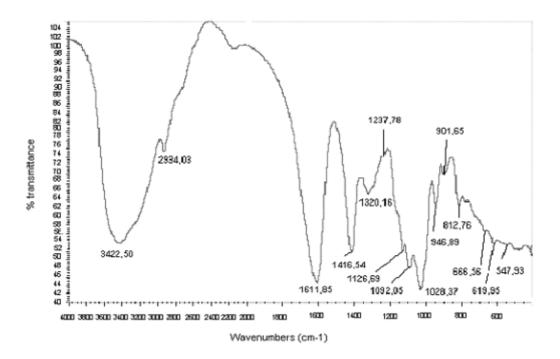


Figura 35. Espectro de FTIV do alginato de sódio isolado.

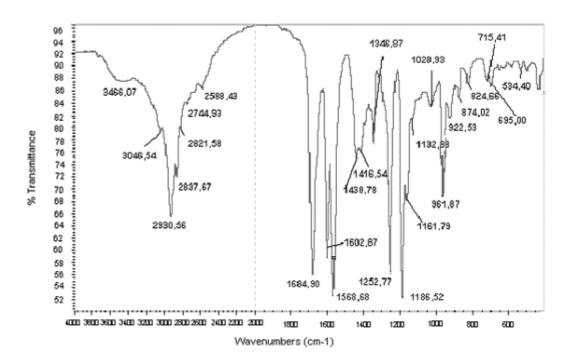


Figura 36. Espectro de FTIV da mistura física alginato/quitosana (1:1).

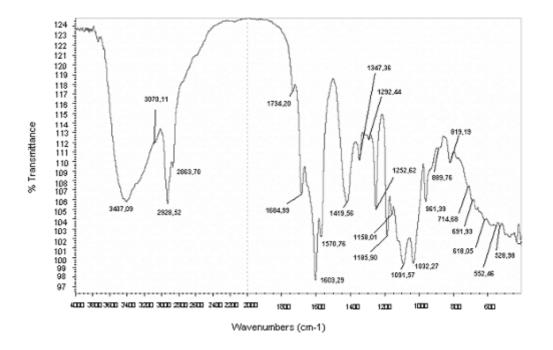


Figura 37. Espectro de FTIV das micropartículas de alginato/quitosana estudadas.

Comparando os espectros mostrados acima com o do ácido retinóico (Figura 27), observa-se que aparentemente não há interação química nem

reação, simplesmente o fármaco está sendo incorporado e pode ser liberado livremente.

Também não foram verificadas alterações no espectro da mistura física sugerindo que não há interação fármaco/polímero nessa mistura.

Desta forma, analisando apenas os espectros em questão pode-se dizer que não há interação entre fármaco e polímero no sistema estudado.

4.3.4. Estudo in vitro do perfil de liberação

As micropartículas de alginato preparadas com diferentes concentrações de quitosana (0,2% e 0,4%) foram avaliadas no estudo de liberação *in vitro* e os resultados obtidos estão apresentados na Figura 38.

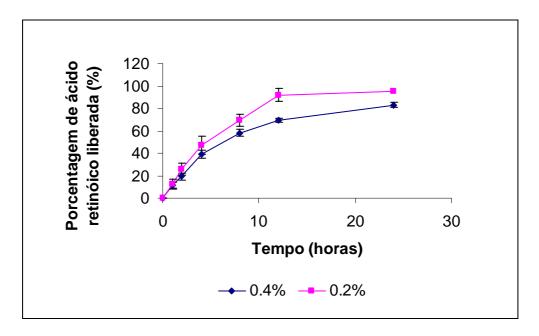


Figura 38. Perfil de liberação *in vitro* do ácido retinóico a partir das micropartículas de alginato preparadas utilizando soluções de quitosana a 0,2% e 0,4% (n=5).

As micropartículas que utilizaram solução de quitosana mais concentrada resultaram em um perfil de liberação mais sustentado provavelmente devido ao maior enrijecimento da parede pela reação de cross-linking mais intensa. Esses resultados estão mais uma vez de acordo com SEZER; AKBUGA (1999) que verificaram que o aumento da concentração de quitosana afetou as propriedades das partículas obtidas, resultando em liberação mais sustentada.

Aproximadamente 80% do fármaco foi liberado a partir dessas partículas ao final de 48h do ensaio. Essa liberação mais sustentada obtida será vantajosa para veiculação do ácido retinóico na pele, diminuindo a irritação cutânea e a resistência promovida pelo fármaco na pele, assim como para obtenção de uma eficácia terapêutica utilizando doses menores. Mais estudos serão realizados nas próximas etapas para avaliação desses sistemas aplicados topicamente.

4.3.5. Permeação e retenção cutânea in vitro

4.3.5.1. Recuperação do ácido retinóico extraído das amostras da pele

De acordo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa - RE nº 899, de 29 de maio de 2003) a recuperação é a eficiência de extração de um método analítico, expressa como a porcentagem da quantidade conhecida de um analito, obtida da comparação dos resultados analíticos de amostras "branco" acrescidas de padrão e submetidas ao processo de extração, com os resultados analíticos de soluções padrão não extraídas.

Foi avaliada a extração do ácido retinóico a partir de três (3) concentrações (baixa, média e alta), contemplando a faixa de linearidade do método, conforme apresentado na Tabela 12.

Tabela 12. Valores obtidos nos ensaios de recuperação do ácido retinóico a partir de três (3) concentrações diferentes (25, 10 e 1μg/mL), extraído das amostras da pele.

Recuperação	25μg/mL	10μg/mL	1μg/mL	
	(%)	(%)	(%)	
EC	95,43	90,83	85,97	
E + D	94,64	100,46	93,28	

CAUSON et al (1997), recomendam que a recuperação não deve exceder 15%. Assim, a análise dos valores encontrados na Tabela 12 permite concluir que eles estão de acordo com os limites estabelecidos.

4.3.5.2. Determinação da penetração cutânea in vitro

Já que as micropartículas de alginato revestidas com quitosana preparadas com 0,4% de quitosana e clorofórmio apresentaram as melhores características para aplicação tópica (maior eficiência de encapsulação e perfil de liberação sustentado), estas foram submetidas aos experimentos de permeação na pele.

Orelha de porco, especificamente a região mais externa da orelha, foi selecionada, pois sua utilização em experimentos de permeação tem sido extensivamente documentada demonstrando que esta é adequada para

representar a permeabilidade da pele humana (SIMON; MAIBACH, 2000; SANTAYO et al., 2002).

O etanol atua como um solubilizante e por isso foi utilizado no compartimento receptor, mantendo as condições sink (30% de etanol em tampão fosfato pH 7,4). Apesar de quantidades acima de 10% não serem recomendadas em experimentos de permeação, estudos prévios também usaram fases receptoras contendo de 33-50% etanol (MONTENEGRO et al., 1996; MANCONI et al., 2002; TROTTA et al., 2003]. Mesmo assim, nossos experimentos não detectaram a presença de ácido retinóico nas amostras coletadas do compartimento receptor após 12 horas, nem a partir das micropartículas nem a partir do controle. O experimento foi repetido utilizando pele dermatomizada e mais uma vez, o fármaco não foi detectado na solução receptora após as 12 horas de experimento. Dessa forma, não pudemos projetar o perfil de permeação do fármaco a partir das formulações testadas.

A Figura 39 apresenta o acúmulo de ácido retinóico nas camadas da pele de orelha de porco após os experimentos de permeação cutânea. Foi observado que a quantidade de fármaco retido no EC foi significativamente menor para as micropartículas do que para o controle (P < 0.05). Por outro lado, a quantidade de fármaco retido na epiderme sem EC + derme foi similar em ambas às formulações testadas.

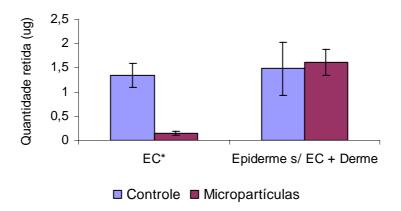


Figura 39. Distribuição do ácido retinóico nas camadas da pele de orelha de porco após 12h (*estrato córneo).

O EC é a principal barreira para prevenir a absorção de substâncias estranhas assim como a perda de água e de substâncias biológicas. Essa barreira é formada pelos corneócitos que são células inativas formadas no estágio final de diferenciação das células da epiderme (BARRY, 2001). Desta forma, esta camada não é o alvo para fármacos tópicos que têm ação em receptores localizados na epiderme viável e derme, como é o caso do ácido retinóico (PIERRE et al., 2001; BARRY, 2001).

Retinóides, particularmente o ácido retinóico, têm sido usados para tratamento de várias doenças dermatológicas tais como acne, fotoenvelhecimento e desordens de queratinização, incluindo a psoríase. O ácido retinóico é biologicamente o mais ativo dos retinóides e desempenha importante papel na regulação da expressão gênica na diferenciação celular e proliferação de células epiteliais (SHAPIRO; SALIOU, 2001). Embora o tratamento com este fármaco apresente vários benefícios, estes são freqüentemente acompanhados de excesso de irritação na pele (OLSEN et al.,

1992; YAMAGUCHI et al., 2005). As respostas clínicas predominantemente incluem dermatite severa em vários estágios da aplicação (ao redor de 3 ou 4 dias). Em geral, esta inflamação pode ocorrer por pelo menos dois mecanismos (YAMAGUCHI et al., 2005; NJAR et al., 2006):

- Ação específica do ácido retinóico em receptores retinóides;
- Efeito não específico onde os grupos funcionais ácidos (-COOH) do fármaco é o principal indutor, e a presença contínua das moléculas no estrato córneo atuariam como uma fonte de irritação.

Desta forma, espera-se que uma terapia com ácido retinóico previna estes efeitos indesejáveis e supere as limitações da terapia clássica. As microparticulas de alginato/quitosana apresentaram comportamento de penetração interessante na pele já que eles otimizaram a terapia com o fármaco, promovendo uma liberação direcionada nas camadas mais profundas da pele. Este tipo de penetração que promoveu uma quantidade significativamente menor de fármaco no EC seria interessante para diminuir a irritação promovida pelo fármaco nesta camada da pele.

Sabe-se que as micropartículas podem entrar via folículo piloso e oferecer a possibilidade de criar altas concentrações do fármaco dentro deste (ROLLAND et al., 1993; ILLEL, 1997; LADERMAN et al., 1999, TOLL et al., 2004; VOGT et al., 2005). O tamanho das micropartículas tem sido de grande importância no direcionamento folicular conforme foi apresentado na figura 14 (SHAEFER et al., 1990; ROLLAND et al., 1993). Alguns estudos foram realizados e mostraram que as micropartículas maiores (>10µm) nem penetram o orificio folicular nem a camada córnea, mas podem se concentrar ao redor da aberturas dos folículos sem maior penetração conforme já foi

mencionado no item 1.3.7. (TOLL et al., 2004). Este último mecanismo comentado pode explicar o comportamento de penetração na pele obtida com as micropartículas estudadas, já que elas apresentam diâmetro maior e poderiam penetrar utilizando mecanismo similar.

5. CONCLUSÕES

Conclusões 127

 A veiculação do ácido retinóico em micropartículas de quitosana não é indicada devido à interação que ocorre entre o fármaco e o polímero, detectada e detalhadamente estudada em nossa pesquisa;

- o método de geleficação ionotrópica utilizando a associação de alginato e quitosana para a obtenção de micropartículas contendo ácido retinóico para veiculação na pele mostrou ser simples e rápido resultando em partículas lisas e esféricas de diâmetro médio correspondente a 148µm;
- não foram observadas interações entre o fármaco e o alginato uma vez que a matriz de alginato protegeu o fármaco do contato e da interação com a quitosana, utilizada apenas superficialmente;
- micropartículas de alginato/quitosana retardaram a liberação do fármaco por um período compatível com sua utilização pela via tópica;
- nos ensaios de retenção cutânea, as micropartículas de alginato/quitosana diminuíram a retenção do fármaco no EC quando comparado ao fármaco livre, mantendo os níveis nas camadas mais profundas da pele (epiderme viável e derme).
- esses sistemas parecem ser promissores para a otimização da terapia com o ácido retinóico levando a um direcionamento do fármaco ao seu sítio de ação e evitando o seu acúmulo no EC. Isso resulta em uma diminuição da irritação cutânea e possibilita juntamente com o aumento de sua estabilidade, a obtenção de efeitos terapêuticos com a utilização de doses menores.

REFERÊNCIAS

• AGNIHOTRI, S.A.; MALLIKARJUNA, N.N.; AMINABHAVI, T.M. Recent advances on chitosan-based micro and nanoparticles in drug delivery. **J. Control. Release,** Amsterdan, v. 100, p. 5-28, 2004.

- AKBUGA, J.; DURMAZ, G. Preparation and evaluation of cross-linked chitosan microspheres containing furosemide. **Int. J. Pharm.**, Amsterdan, v. 111, p. 217-222, 1994.
- ALENCASTRE; J. B.; BENTLEY, M. V. L. B.; GARCIA, F. S. et al. 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, Ribeirão Preto, v. 42, n. 1, 2006
- ANAL, A.K.; STEVENS, W.F. Chitosan-alginate multilayer beads for controlled release of ampicillin. Int. J. Pharm., Amsterdan, v. 290, p. 45-54, 2005.
- ARAL, C.; AKBUGA, J. Alternative approach to the preparation of chitosan beads. **Int. J. Pharm.**, Amsterdan, v. 168, p. 9-15, 1998.
- ASBILL, C.S.; MICHNIAK, B.B. Percutaneous penetration enhancers: local versus transdermal activity. **PSTT**, Amsterdan, v. 3, n. 1, 2000.
- AUSTIN, L.; BOWER, J.J.; MULDOON, C. The controlled release of leukaemia inhibitory factor (LIF) from alginate gels, **Proc. Int. Symp. Control. Release Bioact. Mater.**, v. 23, p. 739–740, 1996.
- AUSTIN, L.; BOWER, J.J.; MULDOON, C. The controlled release of leukaemia inhibitory factor (LIF) from alginate gels, **Proc. Int. Symp. Control. Release Bioact. Mater.**, v. 23, p. 739–740, 1996.
- AYDIN, Z.; AKBUGA, J. Chitosan Beads for the delivery of salmon calcitonin: preparation and release characteristics. **Int. J. Pharm.**, Amsterdan, v. 131, p. 101-103, 1996.
- BADWAN, A.A.; ABUMALOOH, A.; SALLAM, E.; ABUKALAF, A.; JAWAN, O. A sustained release drug delivery system using calcium alginate beads, **Drug Dev. Ind. Pharm.**, New York, v. 11, p. 239–256, 1985.
- BAKAN, J.A. Microencapsulation. In LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H.A.; KANIG, J.L. **The theory and practice of industrial pharmacy** 3rd ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1986. p. 412-429.
- BARRY, B. W. **Dermatological Formulations: Percutaneus Absorptions**, New York: Marcel Dekker, 1983. v. 18, cap. 1, p. 1-48.
- BARRY, B.W. Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery. **Eur. J. Pharm. Sci.,** Amsterdan, v. 14, p. 101–114, 2001.
- BARRY, B.W. Drug delivery routes in skin: a novel approach. Adv. Drug Deliv. Rev., Amsterdan, v. 54 Supl. 1, p. S31–S40, 2002.
- BERBENNI, V. et al. Thermoanalytical and spectroscopic characterisation of solid-state retinoic acid. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 221, p.123-141, 2001
- BERTHOLD, A.; CREMER, K.; KREUTER, J. Preparation and Characterization of chitosan microspheres as drug carrier for prednisolone sodium phosphate as model for anti-inflammatory drugs. **J. Control. Release,** Amsterdan, v. 39, p. 17-25, 1996.

• BODMEIER, R.; OH, K.H.; PRAMAR, Y. Preparation and evaluation of drug containing chitosan beads. **Drug Dev. Ind. Pharm.**, New York, v. 15, p. 1475-1494, 1989.

- BODNAR, M.; HARTMANN, J.F.; BORBELY, J. Preparation and characterization of chitosan-based nanoparticles. **Biomacromolecules,** Washington, v. 6, p. 2521-2527, 2005.
- BOWERSOCK, T.L.; HOGENESCH, H.; SUCKOW, M.; PORTER, R.E.; JACKSON; PARK, K. Oral vaccination with alginate microsphere systems, **J. Control. Release**, Amsterdan, v. 39, p. 209–220, 1996.
- BRISAERT, M.; GABRIELS, M.; MATTHJS, V.; PLAIZIER-VERCAMMEN, J. Liposomes with tretinoin: a physical and chemical evaluation. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, Oxford, p. 909-917, 2001.
- BRISAERT, M.; PLAIZIER-VERCAMMEN, J. Investigation on the photostability of a tretinoin lotion and stabilization with additives. Int. J. Pharm., Amsterdan, v. 199, p. 49-57, 2000.
- BUCK, P. Skin barrier function: effect of age, race and inflammatory disease. **The International Journal of Aromatherapy**, Hove, v. 14, p. 70–76, 2004.
- BUCHLI, L. Radicais livres e amtioxidantes. **Cosmetics & Toiletries**, São Paulo, v. 14, mar./abr., 2002.
- BULENGO-RANSBY, S.M.; GRIFFITHS, C.E.M.; KIMBROUGH-GREEN, C.K. et al. Topical tretinoin (retinoic acid) therapy for hyperpigmented lesions caused by inflammation of the skin in black patients. N. Engl. J. Med., Boston, v. 328, p. 1438-1443, 1993.
- CAUSON, R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis; viewpoint and discution. **J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.,** Amsterdam, v. 689, p. 175-180, 1997.
- CALVO, P.; REMUNAN-LOPEZ, C.; VILA-LATA, J.L.; ALONSO, M.J. Chitosan and chitosan: ethylene oxide-propylene oxide block copolymer nanoparticles as novel carriers for protein and vaccines. **Pharm. Res.**, Washington, v. 14, p. 1431-1436, 1997a.
- CALVO, P.; REMUNAN-LOPEZ, C.; VILA-LATA, J.L.; ALONSO, M.J. Novel Hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. **J. Appl. Polym. Sci.**, New York, v. 63, p. 125-132, 1997b.
- CAMERA, G. PEGLIASCO P. Ear malformation in baby born to mother using tretinoin cream. **Lancet**, London, v. 339, p. 687, 1992.
- CHANDY, T.; SHARMA, C.P. Chitosan matrix for oral sustained delivery of ampicilin. **Biomaterials**, Guilford, v. 14, p. 939-944, 1993.
- CHEN, H.; CHANG, X.; DU, D. et al. Podophyllotoxin-loaded solid lipid nanoparticles for epidermal targeting. **J. Control. Release**, Amsterdan, v. 110, p. 296-306, 2006.
- CHIEN, Y. W. **Novel drug delivery systems**. New york, Marcel dekker, 1992. v. 50.
- CHICKERING, D.; JACOB, P., MATHIOWITZ, E. A tensile technique to evaluate the interaction of bioadhesive microspheres with intestinal mucosa, **Proc. Int. Symp. Control. Release Bioact. Mater.,** v. 19, p. 88–89, 1992.

• CHICKERING, D.E.; MATHIOWITZ, E. Bioadhesive microspheres: I. A novel electrobalance-based method to study adhesive interactions bepolissorbato individual microspheres and intestinal, **J. Control. Release,** Amsterdan, v. 34, p. 251–261, 1995.

- CH'NG, H.; PARK, H.; KELLY, P.; ROBINSON, J. Bioadhesive polymers as platforms for oral controlled drug delivery. **J. Pharm. Sci.**, New York, v. 74, p. 399–405, 1985.
- CHOI, Y.; KIM, S.Y.; KIM, S.H.; LEE, K.S., KIM, C.; BYUN, Y. Longterm delivery of all-trans-retinoic acid using biodegradable PLLA/PEG-PLLA blended microspheres. **Int. J. Pharm**., Amsterdan, v. 215, n. 1-2, p. 67-81, 2001.
- CIRPANLI, Y.; ÜNLÜ, N.; CALIS, S.; HINCAL, A.A. Formulation and in vitro characterization of retinoic acid loaded poly (lactic-co-glycolic acid) microspheres. **J. microencapsul.**, London, v. 22, n. 8, p. 877-889, 2005.
- CONNOR, M.J. Oxidation of retinol to retinoic acid as a requirement for biological activity in mouse epidermis. **Cancer Res.**, Philadelphia, v. 48, p. 7038-7040, 1988.
- CONTRERAS, M.J.F.; SORIANO, M.M.J.; DIÉGUEZ, A.R. In vitro percutaneous absoption of all-trans retinoic acid applied in free form or encapsulated in stratum corneum lipid liposomes. **Int. J. Pharm.**, Amsterdan, v. 297, p. 134-145, 2005.
- CRAIG, D.Q.M.; TAMBURIC, E. Dielectric analysis of bioadhesive gel systems. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, Stuttgart, v. 44, p. 61-70, 1997.
- CORDO, P.L.A.G. Desenvolvimento e caracterização de micropartículas de PLGA para veiculação de ácido retinóico na pele. 2004. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.
- DESAI, T.R.; FINLAY, W.H. Nebulization of niosomal all-trans-retinoic acid: an inexpensive alternative to conventional liposomes. **Int. J. Pharm.,** Amsterdan, v. 241, p. 311-317, 2002.
- DINARVAND, R.; RAHMANI, E.; FARBOD, E. Gelatin microspheres for the controlled release of all-trans-retinoic acid topical formulation and drug delivery evaluation. I.J.P.R., Tehran, p.47-50, 2003.
- DON, T.M.; CHEN, H.R. Synthesis and characterization of AB-crosslinked graft copolymers based on maleilated chitosan and N-isopropylacrylamide. **Carbohydr. Polym.**, London, v. 61, p. 334-347, 2005.
- DON, T.M.; HSU, S.C.; CHIU, W.Y.J. Structures and thermal properties of chitosan-modified poly(methyl methacrylate). **J. Polym. Sci.,** New York, v. 39, n. 10, p.1646–1655, 2001.
- DON, T.M.; KING, J.F.; CHIU, W.Y. Synthesis and properties of chitosan-modified poly(vinyl acetate). **J. Appl. Polym. Sci.**, New York, 86(12), 3057–3063, 2002a.
- DON, T.M.; KING, J.F.; CHIU, W.Y. Preparation of chitosangraft-poly(vinyl acetate) copolymers and their adsorption of copper ion. **P. J.**, Tokio, v. 34, n. 6, p. 418–425, 2002b.

• ELGIN, Y.M. Encapsulation of urease enzyme in xanthan-alginate spheres, Biomaterials, Guilford, v. 8, p. 1157–1161, 1995.

- ELSON, M.L. Topical Tretinoin in the treatment of striae distensae and in the promotion of wound healing: a review. **J. Dermatolog. Treat.**, London, v. 5, p. 163, 1994.
- EZPELETA, I.; IRACHE, J.M.; STAINMESSE, S.; CHABENAT, C.; GUEGUEN, J.; POPINEAU, Y.; ORECCHIONI, A.M. Gliadin nanoparticles for the controlled release of all-trans retinoic acid. **Int. J. Pharm.,** Amsterdan, v.131, p. 191-200, 1995.
- FENG, X.; PENG, Z.H.; DI, W. et al. Suprabasal expression of a dominant-negative RXRα mutant in transgenic mouse epidermis impairs regulation of gene transcription and basal keratinocyte proliferation by RAR-selective retinoids. **Genes Dev**., New York, v. 11, p. 59-71, 1997.
- FINCH, C.A. Spec. Publ. R. Soc. Chem., v. 138, p. 35, 1993.
- FISHER, G.L.; ZENGQUAN, W.; SUBHAS, C.D. et al. Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 337, p. 1419, 1997.
- FOLDVARI, M. Non-invasive administration of drugs through the skin: challenges in delivery system design. **PSTT**, Amsterdan, v. 3, p.12, 2000.
- FREITAS, M.N.; MARCHETTI, J.M. Nimesulide PLA microspheres as a potential sustained release system for the treatment of inflammatory diseases. **Int. J. Pharm**., Amsterdam, v. 295, n.1-2, p. 201-11, 2005.
- FUKUDA, H. Polyelectrolyte coplexes of chitosan carboxymethyl cellulose. **Bull. Chem. Soc. Jpn.**, Tokio, v. 53, p. 837-840, 1980.
- GATTI, R.; GIOIA, M.G.; CAVRINI, V. Analysis and stability study of retinoids in pharmaceuticals by LC with fluorescence detection. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, Oxford, v. 23, p. 147-159, 2000.
- GENTA, I.; PERUGINI, P.; CONTI, F.; PAVANETO, F. A multiple emulsion method to entrap a lipophilic compound into chitosan microspheres. **Int. J. Pharm**., Amsterdan, v. 152, p. 237-246, 1997.
- GOMBOTZ, W.R.; WEE, S.F. Protein release from alginate matrices. **Adv. Drug Deliv. Rev.,** Amsterdan, v. 31, p. 267–285, 1998.
- GOMES, A.J., LUNARDI, L.O., MARCHETTI, J.M., LUNARDI, C.N., TEDESCO, A.C. Photobiological and ultrastructural studies of nanoparticles of poly(lactic-co-glycolic acid)-containing bacteriochlorophyll-a as a photosensitizer useful for PDT treatment. **Drug Deliv.**, Philadelphia, v.12, n. 3, p.159-64, 2005.
- GORDON, L. A.; LENNERNAS, H.; SHA, V. P.; CRISON, J.R.A theoretical basis biopharmaceutic drug classification: the correlation of "in vitro" drug product dissolution and in vivo bioavailibility. **Pharm. Res.**, Washington, v. 12, n. 3, p. 413-20, 1995.
- GRIFFITHS, C.E.M.; VOORHEES, J.J. Topical tretinoin for photoaged skin. **Fitzpatrick. J. Clin. Dermatol.**, Cambridge, v. 3, p.14, 1995.
- GRIFFITHS, C.E.M.; FINKEL, L.J.; TRANFAGLIA, M.G.; HAMILTON, T.A.; VOORHEES, J.J. An in vivo experimental model for effects of

- topical retinoic acid in human skin. **Br. J. Dermatol.**, Oxford, v. 129, p. 389-394, 1993.
- HADGRAFT, J. Skin deep. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, Stuttgart, v. 58, p. 291-299, 2004.
- HARI, P.R.; CHANDY, T.; SHARMA, C.P. Chitosan/calcium alginate microcapsules for intestinal delivery of nitrofurantoin. J. microencapsul., London, v. 13, p. 319-329, 1996
- HE, P.; DAVIS, S.S.; ILLUM, L. In vitro evaluation of the mucoadhesive properties of chitosan microspheres. **Int. J. Pharm**., Amsterdam, v. 166, p. 75-88, 1998.
- HE, P.; DAVIS, S.S.; ILLUM, L. Chitosan Microspheres prepared by spray drying. **Int. J. Pharm**., Amsterdam, v. 187, p. 53-65, 1999a.
- HE, P.; DAVIS, S.S.; ILLUM, L. Sustained release chitosan microspheres prepared by novel spray drying methods. **J. Microencapsul.**, London, 16, p. 343-355, 1999b.
- HWANG, S.R.; LIM, S.J.; PARK, J.S.; KIM, C.K. Phospholipid-based microemulsion formulation of all-trans-retinoic acid for parenteral administration. **Int. J. Pharm.**, Amsterdan, v. 276, p. 175-183, 2004.
- ILLEL, B. Formulation for transfollicular drug administration: some recent advances. **Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.**, Boca Raton, v. 14, p. 207–219, 1997.
- IMAI, T.; SHIRAISHI, S.; SAITO, H.; OTAGIRI, M. Interaction of indomethacin with low molecular weight chitosan and improvements of some pharmaceutical properties of indomethacin by low molecular weight chitosans, Int. J. Pharm., Amsterdan, v. 67, p. 11–20, 1991.
- IOELE, G.; CIONE, E.; RISOLI, A.; GENCHI, G.; RAGNO, G. Accelerated photostability study of tretinoin and isoptretinoin in liposome formulations. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 293, p. 251-260, 2005
- JAHODA, C.A.; REYNOLDS, A.J. Dermal-epidermal interactions. Adult follicle-derived cell populations and hair growth. **Dermatol. Clin.**, Philadelphia, v. 14, p. 573–583, 1996.
- JALÓN, E.G.; BLANCO-PIETRO, M.J.; YGARTUA, P.; SANTOYO, S.
 PLGA microparticles: possible vehicles for topical drug delivery. Int. J.
 Pharm., Amsterdam, v. 226, p. 181-184, 2001.
- JALÓN, E.G.; BLANCO-PIETRO, M.J.; YGARTUA, P.; SANTOYO, S. Topical application of acyclovir-loaded microparticles: quantification of the drug in porcine skin layers. **J. Control. Release,** Amsterdan, v. 75, p. 191-197, 2001
- JAMEELA, S.R.; JAYAKRISHNAN, A. Glutaraldehyde cross-linked chitosan microspheres as a long acting biodegradable drug delivery vehicle: studies on the in vitro release of mitoxantrone and in vivo degradation of microspheres in rat muscle. **Biomaterials**, Guilford, v. 16, n. 10, p. 769-775, 1995.
- JAMEELA, S.R.; KUMARY, T.V.; LAL, A.V.; JAYAKRISHNAN, A. Progesterone-loaded chitosan microspheres: a long acting biodegradable controlled delivery system. **J. Control. Release,** Amsterdan, v. 52, p. 17-24, 1998.

• JENNING, V; GYSLER, A.; SCHÄFER-KORTING, M.; GOHLA, S. H.;. Vitamin A loaded solid lipid naoparticles for topical use: occlusive properties and drug targeting to the upper skin. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, Stuttgart, v. 49, p. 211-218, 2000.

- JEONG, Y.I.; SONG, J.G.; KANG, S.S. et al. Preparation of poly(DL-lactide-co-glycolide) microspheres encapsuling all-trans retinoic acid. **Int. J. Pharm.,** Amsterdan, v. 259, n. 1-2, p. 79-91, 2003.
- JICK, S.S.; TERRIS, B.Z.; JICK, H. First trimester topical tretinoin and congenital disorders. **Lancet**, London, v. 341, p. 1181-1182, 1993.
- JOHNSON, K.A., CHAMBERS, C.D.; FELIX, R. et al. Pregnancy outcome in women prospectively ascertained with Retin-A exposures: an ongoing study. **J. Abnorm. Dev. Teratol.**, v. 49, p. 375, 1994.
- KANG, S.; KIM, K.J.; GRIFFITHS, C.E.M. et al. Topical tretinoin (retinoic acid) improves early stretch marks. **Arch. Dermatol.**, Chicago, v. 132, p. 519, 1996.
- KANG, S.; VOORHEES, J. Terapia para fotoenvelhecimento com tretinoína tópica: uma análise baseada em evidência. **J. Am. Acad. Dermatol.**, Boston, v. 39, n. 2, p. 58-63, 1998.
- KAS, H.S. Chitosan: properties, preparation and application to microparticulate systems. **J. Microencapsul.**, London, v. 14, n. 6, p. 689-711, 1997.
- KAST, C.E.; BERNKOP-SCHNÜRCH, A. Thiolated polymers thiomers: develomment and in vitro evaluation of chitosan thioglycolic acid conjugates. **Biomaterials**, Guilford, v. 22, p. 2345-2352, 2001.
- KAWASHIMA, Y.; HANDA, T.; KASAI, A.; TAKENAKA, H.; LIN, S.Y.; ANDO, Y. Novel method for the preparation of controlled-release theophylline granules coated with a polyelectrolyte complex of sodium polyphosphate-chitosan. **J. Pharm. Sci.**, New York, v. 74, p. 264-268, 1985
- KIM, C.K.; LEE, E.J. The controlled release of blue dextran from alginate beads. **Int. J. Pharm.**, Amsterdan, v. 79, p. 11-19, 1992
- KIMBROUGH-GREEN, C.K.; GRIFFITHS, C.E.M; FINKEL, L.J. et al. Topical retinois acid (tretinoin) for melasma in black patients. **Arch. Dermatol.**, Chicago, v. 130, p. 723-733, 1994.
- KLIGMAN, A.M.; GROVE, G.L.; HIROSE, R. et al., Topical tretinoin for photoaged skin. **J. Am. Acad. Dermatol.**, Boston, v. 15, p. 836-859, 1986.
- KO, J.A.; PARK, H.J.; HWANG, S.J.; PARK, J.B.; LEE, J.S. Preparation and Characterization of chitosan microparticles intended for controlled drug delivery. **Int. J. Pharm.**, Amsterdan, v. 249, p. 165-174, 2002.
- KOCKISCH, S.; REES, G.D.; YOUNG, S.A.; TSIBOUKLIS, J.; SMART, J.D. Polymeric microspheres for drug delivery to the oral cavity: an in vitro evaluation of mucoadhesive potential. **J. Pharm. Sci.**, New York, v. 92, p. 1614-1623, 2003.
- KU, C.; DIXIT, V.; SHAW, W.; GITNICK, G. In vitro slow release profile of endothelial cell growth factor immobilized within calcium alginate microbeads, **Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol.**, Philadelphia, v. 23, p.143–151, 1995.

• KWOK, K.K.; GROVES, M.J.; BURGESS, D.J. Production of 5–15 mm diameter alginate–polylysine microcapsules by an atomization technique, **Pharm. Res.,** Washington, v. 8, p. 341–344, 1991.

- LADEMANN, J., WEIGMANN, H., RICKMEYER, C. et al. Penetration of titanium dioxide microparticles in a sunscreen formulation into the horny layer and the follicular orifice. **Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.**, New York, v. 12, p. 247–256, 1999.
- LATRIANO, L.; TZIMAS, G.; WONG, F. et al. The percutanous absorption of topically applied tretinoin and its effect on endonous plasma tretinoin concentration following single doses or long-term use. **J. Am. Acad. Dermatol.,** Boston, v. 36, p. 37-46, 1997.
- LEE, S.T.; MI, F.L.; SHEN, Y.J.; SHYU, S.S. Equilibrium and kinetic studies of copper (II) ion uptake by chitosan-tripolyphosphate chelating resin. **Polymer**, London, v. 42, p. 1879-1892, 2001.
- LEE, D.W.; HWANG, S.J.; PARK, J.B.; PARK, H.J. Preparation and release characteristics of polymer-coated and blended alginate microspheres. **J. Microencapsul**., London, v. 20, n. 2, p. 179–192, 2003.
- LEHMAN, P.A.; SLATTERY, J.T.; FRANZ, T.J. Percutaneou absorption of retinoids: influence on vehicle, light exposure and dose. **J. Invest. Dermatol.**, New York, v. 91, p. 56-61, 1988.
- LEHR, C.M.; BOWSTRA, J.A.; SCHACHT, E.H.; JUNGIGER, H.E. In vitro evaluation of mucoadhesive properties of chitosan and some other natural polymers. **Int. J. Pharm**., Amsterdan, v. 78, p. 43-48, 1992.
- LEVER, L.; KUMAR, P.; MARKS, R. Topical Retinoic Acid for treatment of solar damage. **Br. J. Dermatol.**, Oxford, v.122, p. 91-98, 1990.
- LEYDEN, J.J.; GROVE, G.L.; GROVE, M.J. et al. Treatment of photodamaged facial skin with topical tretinoin. **J. Am. Acad. Dermatol.**, Boston, v. 21, p. 638-644, 1989.
- LEYDEN, J.J.; SHALITA, A. Retinol therapy for acne vulgaris: an updateon topical treatment. **J. Am. Acad. Dermatol.**, Boston, v. 15, p. 907, 1986.
- LI, Y.P.; MACHIDA, Y.; SANNAN, T.; NAGAI, T. Preparations of chitosan microspheres containing fluorouracil using the dry-in-oil method and its release characteristics. **STP Pharma Sci.**, Boston, v. 1, p. 363-368, 1991.
- LIM, S.J.; LEE, M.K.; KIM, C.K. Altered chemical and biological activities of all-trans retinoic acid incorporated in solid lipid nanoparticle powders. **J. Control. Release,** Amsterdan, v. 100, p. 53-61, 2004.
- LIPSON, A.H.; COLLINS F.; WEBSTER, W.S. Multiple congenital defects associated with maternal use of topical tretinoin. **Lancet**, London, v. 341, p. 1352-1353, 1993.
- LIRA, A. A. M.; SESTER, E. A.; SANTANA, D. P.; WANDERLEY, A. G. Development of lapachol topical formulation: anti-inflammatory study of a selected formulation. **AAPS PharmSciTech.**, 2007a. No prelo (AAPSPT-D-06-00162).

• LIRA, A.M.; ARAÚJO, A.A.S.; BASÍLIO, I.D.J.; SANTOS, B.L.L.; SANTANA, D.P.; MACÊDO, R.O. Compatibility studies of lapachol with pharmaceutical excipients for the development of topical formulations. **Thermochimica Acta**, 2007b. No prelo (TCA 74565).

- LIRA, A.A.M.; NANCLARES, D.M.A.; FEDERMAN NETO, A.; MARCHETTI, J.M. Drug-polymer interaction in the all-trans retinoic acid release from chitosan microparticles. **J. Therm. Anal. Cal.**, Budapeste, v. 87, p. 899-903, 2007c.
- LIRA, A. A. M.; SESTER, E. A.; SANTANA, D. P.; WANDERLEY, A. G. Preliminary development of lapachol gel: in vitro premeation study.
 Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, São Paulo, v. 40, p. 35-41, 2004.
- LOPES, L. B.; COLLETT J. H.; BENTLEY M. V. L.B., Topical delivery of Cyclosporin A: an in vitro study using monoolein as a penetration enhancer, **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, Stuttgart, v. 60, p. 25–30, 2005.
- LOURENÇO, V.A. Desenvolvimento e avaliação de micropartículas de quitosana para veiculação de dimetilaminoetanol (DMAE) na pele.
 2006. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.
- LUPO, M. P. Antioxidants and vitamins in Cosmetics. Elsevier Science Inc., 2001.
- MAGDASSI, S.; VINETSKY, Y.; BENITA, S. Microencapsulation,.
 Methods and industrial applications, Marcel Dekker, New York, p. 21-33, 1996.
- MAIA, C.S.; MEHNERT, W.; SHÄFER-HORTING, M. Solid lipid nanoparticles as drug carriers for topical glucocorticoids. Int. J. Pharm., Amsterdan, v. 196, p. 165-167, 2000.
- MANCONI, M.; SINICO, C.; VELENTI, D.; LOY, G.; FADDA, A.M. Niosomes as carriers for tretinoin. I. Preparation and properties. Int. J. Pharm., Amsterdan, v. 234, n.1-2, p. 237-248, 2002.
- MARTINSEN, A.; SKJAK-BRAEK, G.; SMIDSROD, O.; ZANETTI, F.; Comparison of different methods for determination of molecular weight and molecular weight distribution of alginates, **Carbohydr. Polym.,** London, v.15, p. 171–193, 1991.
- MEI, Z.; CHEN, H.; WENG, T. et al. Solid lipid nanoparticle and microemulsion for topical delivery of triptolide. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, Stuttgart, v. 56, p. 189-196, 2003.
- MI, F.L.; SHYU, S.S.; KUAN, C.Y.; LEE, S.T.; LU, K.T.; JANG, S.F. Chitosan-polyelectrolyte complexation for the preparation of gel beads and controlled release of anticancer drug. I. Enzymatic hidrolysis of polymer. **J. Appl. Polym. Sci.**, New York, v. 74, p. 1868-1879, 1999.
- MONTENEGRO, L.; PANICO, A.M.; VENTIMIGLIA, A.; BONINAF.P. In vitro retinoic acid relese and skin permeation from different liposome formulations. **Int. J. Pharm.**, Amsterdan, v. 133, p. 89-96, 1996.
- MORDON, S., SUMINA, C., DEVOISSELE, J.M. Site-specific methylene blue delivery to pilosebaceous structures using highly porous nylon

- microspheres: an experimental evaluation. **Lasers Surg. Med.**, New York, v. 33, p. 119-125, 2003.
- MOSER, K.; KRIWET, K.; NAIK, A.; KALIA, Y.N.; GUY, R.H. Passive Skin Penetration Enhancement and its Quantification In Vitro. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, Stuttgart, v. 52, p. 103-112, 2001.
- MOTTO, G.M. et al. Separation and indentification of retinoic acid photoisomeirs. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v. 481, p. 255-62. 1989.
- MUMPER, R.J.; HOFFMAN, A.S.; PUOLAKKAINEN, P.; BOUCH- ARD, L.S.; GOMBOTZ, W.R. Calcium-alginate beads for the oral delivery of transforming growth factor-b: Stabilization of TGF-b by the addition of polyacrylic acid within acid-treated beads, J. Control. Release, Amsterdan, v. 30, p. 241–251, 1994.
- MURATA, Y.; MAEDA, T.; MIYAMOMTO, E.; KAWASHIMA, S. Preparation of chitosan-reinforced alginate gel beads-effects of chitosan on gel matrix erosion. **Int. J. Pharm**., Amsterdan, v. 96, 139-145, 1993a.
- MURATA, Y.; NAKADA, T.; MIYAMOMTO, E.; KAWASHIMA, S.; SEO, S.H. Influence of erosion of calcium-induced alginate matrix on the release brilliant blue. **J. Control. Release,** Amsterdan, v. 23, p. 21-26, 1993b.
- NEEDLEMAN, I.G.; SMALES, F.C. In vitro assessment of bioadhesion for periodontal and buccal drug delivery. **Biomaterials**, Guilford, v. 16, p. 617-624, 1995.
- NISHIMURA, K.; NISHIMURA, S.; SEO, H.; NISHI, N.M.; TOKURA, I. Macrophage attraction with multiporous beads prepared from practically deacetylated chitin. J. Biomed. Mater. Res., Hoboken, v. 20, p. 1359-1372, 1986.
- NISHIMURA, E.K.; JORDAN, S.A.; OSHIMA, H., et al. Dominant role of the niche in melanocyte stem-cell fate determination. **Nature**, London, v. 416, p. 854–860, 2002.
- NJAR, V.C.O. Cytochrome P450 Retinoic Acid 4-Hydroxylase Inhibitors: potential agents for cancer therapy. **Mini Rev. Med. Chem.**, Hilversum, v. 2, p. 261-269, 2002.
- NJAR, V.C.O.; GEDIYA, L.; PURUSHOTTAMACHAR, P.; CHOPRA, P.; VASAITIS, T.S.; KHANDELWAL, A.; MEHTA, J.; HUYNH, C.; BELOSAY, A.; PATEL, J. Retinoic acid metabolism blocking agents (RAMBAs) for treatment of cancer and dermatological diseases. **Bioorg. Med. Chem.**, Oxford, v. 14, p. 4323-40, 2006.
- NYRADY, J.; LUCAS, C.; YUSUF, M. et al. The stability of tretinoin in tretinoin gel microsphere 0.1%. **Cutis,** v. 70, n. 5, p. 295-298, 2002.
- NYRADY, J.; NIGHLAND, M.; PAYONK, G. et al. A comparative evaluation of tretinoin gel microsphere, 0.1%, versus tretinoin cream, 0.025% in reducing facial shine. **Cutis**, v. 66, n. 2, p. 153-156, 2000.
- OLSEN, E.A., KATZ, H.I., LEVINE, N. et al. Tretinoin emollient cream: a new therapy for photodamaged skin. **J. Am. Acad. Dermatol.**, Boston, v. 26, p. 215-224, 1992.
- ORIENTI, I.; AIEDEH, K.; GIANASI, E.; BERTASI, V.; ZECCHI, V. Indomethacin loaded chitosan microspheres. Correlation between the

- erosion process and release kinetics. **J. Microenpsul.,** London, v. 13, p. 463-472, 1996.
- KU, C.; DIXIT, V.; SHAW, W.; GITNICK, G. In vitro slow release profile of endothelial cell growth factor immobilized within calcium alginate microbeads, **Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol.**, Philadelphia, v. 23, p.143–151, 1995.
- PARK, K.; ROBINSON, J.R. Bioadhesive polymers as platformsfor oral-controlled drug delivery: Method to study bioadhesion, **Int. J. Pharm.**, Amsterdan, v. 19, p. 107–127, 1984.
- PARK, S. B.; KANG, H. W.; HAAM, S.; PARK, H. Y.; KIM, W. S. Caalginate microspheres encapsulated in chitosan beads. J. Microencapsul., London, v. 21, n. 5, p. 485–497, 2004.
- PARTHASARATHY, R.; MEHTA, K. Altered metabolism of all-transretinoic acid in liposome-encapsulated form. **Cancer Lett.**, Amsterdan, v.134, n. 2, p. 121-8, 1998.
- PAVANETTO, F.; PERUGINI, P.; CONTI, B.; MODENA, T.; GENTA, I. Evaluation of process parameters involved in chitosan microsphere preparation by the o/w/o multiple emulsion method. **J. Microenpsul.**, London, v. 13, n. 6, p. 679-688, 1996.
- PIERRE, M.B.R.; TEDESCO, A.C.; MARCHETTI, J.M.; BENTLEY, M.V.L.B. Stratum corneum lipids liposomes for the topical delivery of 5- aminolevulinic acid in photodynamic therapy of skin cancer:preparation and in vitro permeation study. **BMC Dermatology**, London, v. 1, n. 5, 2001.
- PUTTIPIPATKHACHORN, S.; NUNTHANID, J.; YAMAMOTO, K.; PECK, G.E. Drug physical state and drug-polymer interaction on drug release from chitosan matrix films. **J. Control. Release**, Amsterdan, v. 75, 143 -153, 2001.
- RAFAL, E.S.; GRIFFITHS, C.E.M.; DITRE, C.M. et al. Topical tretinoin (retinoic acid) treatment for liver spots associated with photodamaged. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 326, p. 368-374, 1992.
- REGAZZI, M.B.; IACONA, I.; GERVASUTTI, C. et al. Clinical pharmacokinetics of tretinoin. **Clin Pharmacokinet.**, New York, v. 32, n. 5, p. 382-402, 1997.
- RIBEIRO, A.J.; NEUFELD, R.J.; PHILIPPE, A.; CHAUMEIL, J.C. Microencapsulation of lipophilic drugs in chitosan-coated alginate microspheres. **Int. J. Pharm.**, Amsterdan, v. 187, p. 115–123, 1999.
- RICCI-JÚNIOR, E.; MARCHETTI, J.M. Zinc(II) phthalocyanine loaded PLGA nanoparticles for photodynamic therapy use. **Int. J. Pharm.**, Amsterdan, v. 310, p. 187–195, 2006.
- RILLOSI, M.; BUCKTON, G. Modelling mucoadhesion by use of surface energy terms obtained from the Lewis acid-Lewis base approach. II Studies on anionic, cationic and unionisable polymers. **Pharm. Res.**, Washington, v. 12, p. 669-675, 1995.
- RODRIGUEZ-LLIMÓS, A.C.; BREGNI, C.; SANTOS-CARVALLIDO, C. Microesferas de alginato para uso dermatofarmacêutico. Ars Pharmaceutica, Granada, v. 44, n. 3, p. 215-224, 2003.

• RODSLY et al. Infrared spectroscopy of retinoids. **Analytical biochemistry**, v. 43, n. 9, p. 4283-4290, 1983.

- RODSLY et al. Fourier transform infrared spectroscopy of retinoids. Methods in Enzimology. Vitamin and Coenzymes, New York, p. 92-101, 1986.
- ROGOVINA, S.Z.; VIKHOREVA, G.A.; AKOPOVA, T.A.; GORBACHEVA, I.N. Investigation of interaction of chitosan with solid organic acids and anhydrides under conditions of shear deformation. J. Appl. Polym. Sci., New York, v. 76, p. 616-622, 2000.
- ROLLAND, A.; WAGNER, N.; CHATELUS, A. et al. Site-specific drug delivery to pilosebaceous structures using polymeric microspheres. **Pharm. Res.,** Washington, v. 10, p. 1738–1744, 1993.
- ROSSLER, B.; KREUTER, J.; SCHERER, D. Collagen microparticles: preparation and properties. **J. Microenpsul.**, London, v. 12, n. 1, p. 49-57, 1995.
- SANTAYO, S.; DE JALON E.G.; YGARTUA, P.Y. et al. Optimization of topical cidofovir penetration using microparticles. **Int. J. Pharm.**, Amsterdan, v. 242, p. 107-113, 2002.
- SASHIMA, H.; KAWASAKI, N.; NAKAYAMA, A. et al. Chemical modification of chitosan. Part 15: Synthesis of novel chitosan derivatives by substitution of hydrophilic amine using Ncarboxyethylchitosan ethyl ester as an intermediate. **Carbohydr. Res.**, Amsterdan, v. 338, p. 557-561, 2003.
- SCHAEFER, H.; WATTS, F.; BROD, J.; ILLEL, B. Follicular penetration. In: SCOTT, R.C., GUY, R.H., HADGRAFT, J. (Ed.), Prediction of percutaneous penetration, methods, measurements, modeling. London: IBC Technical Services, 1990. p. 163–173.
- SEGI, N.; YOTSUYANGI, T.; IKEDA, K. Interaction of induced alginate gel beads with propranolol. **Chem. Pharm. Bull.**, Tokio, v. 37, p. 3092–3095, 1989.
- SELEK, H.; ÜNLÜ, N.; ORHAN, M.; IRKEC, M. Evaluation of retinoic acid ophthalmic emulsion in dry eye. **Eur.J. Ophthalmol.,** Milão, v. 10, p. 121-127, 2000.
- SEZER, A.D.; AKBUGA, J. Controlled release of piroxicam from chitosan beads. **Int. J. Pharm.**, Amsterdan, v. 121, p. 113-116, 1995.
- SEZER, A.D.; AKBUGA, J. Release characteristics of chitosan treated alginate beads: I. Sustained release of a macromolecular drug from chitosan treted alginate beads. **J. Microencapsul.**, London, v. 16, n. 2, p. 195-203, 1999a.
- SEZER, A.D.; AKBUGA, J. Release characteristics of chitosan treated alginate beads: I. Sustained release of a macromolecular drug from chitosan treted alginate beads. **J. Microencapsul.**, London, v. 16, n. 2, p. 195-203, 1999b.
- SHAPIRO, S. S.; SALIOU, C. Role of vitamins in skin care. **Nutrition**, v. 17, p. 839-844, 2001.
- SHAROV, A.A.; LI, G.Z.; PALKINA, T.N. et al. Fas and c-kit are involved in the control of hair follicle melanocyte apoptosis and migration in

- chemotherapy-induced hair loss. **J. Invest. Dermatol.,** New York, v. 120, p. 27–35, 2003.
- SHIM, J.; KANG, H.S.; PARK, W.S. et al. Transdermal delivery of mixnoxidil with block copolymer nanoparticles. **J. Control. Release**, Amsterdan, v. 97, p. 477-484, 2004.
- SHIMIZU, K.; TAMAGAWA, K.; TAKAHASHI, N.; TAKAYAMA, K.; MAITANI, Y. Stability an antitumor effects of all-trans retinoic acidloaded liposomes contained sterylglucoside mixture. **Int. J. Pharm.**, Amsterdan, v. 258, p. 45-53, 2003.
- SHIMIZU, Y.; TANIGAWA, S.; SAITO, Y.; NAKAMURA, T. Synthesis of chemically modified chitosans with a higher fatty acid glycidyl and their absorption abilities for anionic and cationic dyes. **J. Appl. Polym. Sci.**, New York, v. 96, p. 2423-2428, 2005.
- SHIMODA, J.; ONISHI, H.; MACHIDA, Y. Bioadhesive Characteristics for chitosan microspheres to the mucosa of rat small intestine. **Drug Dev. Ind. Pharm.**, New York, v. 27, p. 567-579, 2001.
- SHIRAISHI, S.; IMAI, T.; OTAGIRI, M. Controlled release of indomethacin by chitosan-polyelectrolyte complex: optimization and in vivo/in vitro evaluation. J. Control. Release, Amsterdan, v. 25, p. 217-225, 1993.
- SHU, X.Z.; ZHU, K.J. A novel appoach to prepare tripolyphosphate/chitosan complex beads for controlled drug delivery.
 Int. J. Pharm., Amsterdan, v. 201, p. 51-58, 2000.
- SHU, X.Z.; ZHU, K.J. Chitosan/gelatin microspheres prepared by modified emulsification and ionotropic gelation. **J. Microencapsul.**, London, v. 18, p. 237-245, 2001.
- SIMON, G.A., MAIBACH, H.I. The pig as an experimental animal model of percuatneous penetration in man: qualitative and quantitative observations. **Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.,** New York, v. 13, p. 229-234, 2000.
- SINHA, V.R.; SINGLA, A.K.; WADHAWAN, S.; KAUSHIK, R.; KUMRIA, R.; BANSAL K.; DHAWAN, S. Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs. **Int. J. Pharm.**, Amsterdan, v. 274, p. 1-33, 2004.
- SINICO, C.; MANCONI, M.; PEPPI, M.; LAI, F.; VALENTI, D.; FADDA, A.M. Liposomes as carriers for dermal delivery of tretinoin: in vitro evaluation of drug permeation and vesicle-skin interaction. **J. Control. Release,** Amsterdan, v. 103, p. 123-136, 2005.
- SISCO, W.R.; SCHRADER, P.A.; MCLAUGHLIN, A.M.; CLARK, B.H. J. Chromatogr., Amsterdan, v. 368, p. 184-187, 1986.
- STOCKWELL, A.F.; DAVIS, S.S.; WALKER, S.E. In vitro evaluation of alginate gel systems as sustained release drug delivery systems, **J. Control. Release**, Amsterdan, v. 3, p. 167–175, 1986.
- SUARAT, J.H. **Retinoids:** new trends in research and therapy. New York: Karger press, 1985.
- SUHONEN, T.M.; BOWSTRA, J.A.; URTTI, A. Chemical enhancement of percutaneous absorption in relation to stratum corneum structural alterations. **J. Control. Release**, Amsterdan, v. 59, p. 149–161, 1999.

• TAKKA, S.; ACARTURK, F. Calcium alginate microparticles for oral administration: I: efect of sodium alginate type on drug release and drug entraMMent efficiency. **J. Microencapsul.**, London, 1999, v. 16, n. 3, p. 275 – 290

- TAYLOR, G.; LEHRER, M.S.; JENSEN, P.J.; SUN, T.T.; LAVKER, R.M. Involvement of follicular stem cells in forming not only the follicle but also the epidermis. **Cell**, Cambridge, v. 102, p. 451-461, 2000.
- THACHER, S.M.; STANDEVEN, A.M.; ATHANIKAR, A.; KOPPER, J.; CASTILLEJA, O.; ESCOBAR, M.; BEARD, R.L.; CHANDRARATNA, R.A.S. Receptor specificity of retinoid-induced epidermal hyperplasia: effect of rxr-selective agonists and correlation with topical irritation. J. Pharmacol. Exp. Ther., Baltimore, v. 282, n. 2, p. 528-534, 1997.
- THAKKER, K.D.; CHERN, W. H. Development and validation of in vitro release testes for semisolid dosage forms case study. **Dissolutions technologies**, Lawrence, may, 2003.
- THANOO, B.C.; SUNNY, M.C.; JAYAKHRISHNAN, A. Cross-linked chitosan microspheres: preparation and evaluation as a matrix for the controlled release of pharmaceuticals. **J. Pharm. Pharmacol.**, London, v. 44, n. 4, p. 283-286, 1992.
- TOLL, R.; JACOBI, U.; RICHTER, H. et al. Penetration profile of microspheres in follicular targeting of terminal hair follicles. **J. Invest. Dermatol.**, New York, v. 123, p. 168-76, 2004.
- TROTTA, M.; UGAZIO, E.; PEIRA, E.; PULITANO, C. Influence of ion pairing on topical delivery of retinoic acid from microemulsions. **J. Control. Release,** Amsterdan, v. 86, p. 315-321, 2003.
- VOGT, A., MANDT, N., LADEMANN, J. et al. Follicular targeting: a promising tool in selective dermatotherapy. **J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.**, New York, v. 10, p. 252-255, 2005.
- YAMAGUCHI, Y.; NAGASAWA, T.; NAKARUMA, N. et al. Successful treatment of photo-damaged skin of nano-scale atRA particles using a novel transdermal delivery. **J. Control. Release,** Amsterdan, v. 104, p. 29-40, 2005.
- WALS, P.; BLOCH, D.; CALABRO, A. et al. Association Bepolissorbato holoprosencephaly and exposure to topical retinoids: results of the EUROCAT survey. **Paediatr. Perinatal Epidemiol.**, Oxford, v. 5, p. 445-447, 1991.
- WANG, Y.M.; SATO, H.; ADACHI, I.; HORIKOSHI, I. Optimization of the formulation design of chitosan microspheres containing cisplatin. **J. Pharm. Sci.**, New York, v. 85, n. 11, p. 1204-1210, 1996.
- WEE, S.F.; GOMBOTZ, W.R. Controlled release of recombinant human tumor necrosis factor receptor from alginate beads. **Proc. Int. Symp. Control. Release Bioact. Mater.**, v. 21, p. 730-731, 1994.
- WEE, S.F.; GOMBOTZ, W.R.; FANSLOW, W. Evaluation of alginate microbeads for intranasal delivery of ovalbumin. **Proc. Int. Symp. Control. Release Bioact. Mater.**, v. 22, p. 566–567, 1995.
- WEINSTEN, G.D.; NIGRA, T.P., POCHI, P.E. et al. Topical tretinoin for treatment of photodamaged skin: a multicenter study. **Arch. Dermatol.**, Chicago, v.127, p. 659-665, 1991.

• WEISS, J.S.; ELLIS, C.N.; HEADINGTON, J.T. et al. Topical tretinoin for photoaged skin: a double-blind vehicle-controlled study. **JAMA**, Hong Kong, v. 259, p. 527-532, 1988.

- WILLIAMS, A.C.; BARRY, B.W. Skin absorption enhancers. **Crit. Rev. Therap. Drug Carrier. Syst.**, Boca Raton, v. 79, n.2, p. 305-353, 1992.
- WITTAYA-AREEKUL, S.; KRUENATE, J.; PRAHSARN, C. Preparation and In Vitro Evaluation of Mucoadhesive Properties of alginate/chitosan micro particles containing prednisolone. **Int. J. Pharm.**, Amsterdan, v. 312, p. 113-118, 2006.
- YONKOSKY, D.M.; POCHI, P.E. Acne vulgaris in childhood. Pathogenesis and management. **Dermatol. Clin.**, Philadelphia, v. 4, p. 127, 1986.