

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

Influência da adição de um insumo nanoestruturado comercial em formulações semissólidas contendo tretinoína: caracterização e estudo da permeação/retenção cutânea

DILEUSA DE OLIVEIRA

PORTO ALEGRE, 2013

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

Influência da adição de um insumo nanoestruturado comercial em formulações semissólidas contendo tretinoína: caracterização e estudo da permeação/retenção cutânea

Dissertação apresentada por **Dileusa de Oliveira** para obtenção do GRAU DE MESTRE em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. Ruy Carlos Ruver Beck

Porto Alegre, 2013

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 27 de março de 2013, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dra. Irene Clemes Kulkamp-Guerreiro
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Marta Palma Alves
Centro Universitário Franciscano

Profa. Dra. Solange Cristina Garcia
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Oliveira, Dileusa de
Influência da adição de um insumo nanoestruturado comercial em formulações semissólidas contendo tretinoína: caracterização e estudo da permeação/retenção cutânea / Dileusa de Oliveira. -- 2013.

189 f.

Orientador: Ruy Carlos Ruver Beck.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2013.

1. Nanopartículas de vitamina C. 2. Tretinoína. 3. Formulações semissólidas. 4. Permeação/penetração cutânea. I. Beck, Ruy Carlos Ruver, orient. II. Título.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório 405 e 602 da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, com apoio financeiro CNPq, FAPERGS e CAPES.

AGRADECIMENTOS

À minha família pela fé, oportunidade, apoio, paciência, sustento e compreensão;

À minha irmã-amiga Deisi Rhoden pelo incentivo, apoio emocional, conversas, conduta pessoal e profissional a todo o momento;

À minha amiga Cândice Felippi pelo incentivo, amizade e oportunidades oferecidas;

À Renata Raffin pelas oportunidades e ensinamentos concedidos;

Às professoras Silvia Stanisçuaski Guterres e Adriana R. Pohlmann pelas oportunidades profissional e acadêmica;

Ao meu orientador professor Ruy Beck pela paciência, orientação e oportunidade de participar do grupo de pesquisa;

Aos meus queridos amigos Denise Soledade, Diego Fontana, Gabriele Dadalt Souto, Karina Paese e Kelly B. Condota, que me proporcionaram grande apoio emocional, incentivo, contribuições no andamento do trabalho e ensinamentos durante o período do mestrado e pelos diversos momentos de diversão;

Às minhas queridas colegas Aline Ourique e Karine Coradini pelo apoio, pela paciência e pelas diversas ajudas e ensinamentos durante o mestrado;

Aos colegas do grupo de pesquisa Alana Klein, Ana Carolina Asbahr, Ana Luiza Maurer, Cássia Detoni, Catiúscia Padilha, Cecília Michalowski, Cláudia Melo, Cristina Venturini, Evelise Assumpção, Fernanda Flores, Franciane Johansson, Franciele Bruinsmann, Frantiescoli Dimer, Gabriela Garrastazu, Grégory Svetlichny, Greice Ferreira, Joana Forgearini, Júlia Scherer, Katherine Krieser, Kelly Zatta, Kenia Pissinate, Luana Fiel, Lucas Rigo, Luiza Frank, Noé Fonseca, Manoel Ortiz, Márcia Adorne, Márcia Camponogara, Paula Chaves, Renata Contri, Rossana Friedrich, Stela Ferrarini, Taís Durli, Tanira Aguirre, Tatiane Daboit, Tatiele Katzer, Thatiana Terroso, Tiago Beber e Willian Prado, pelas discussões de resultados, idéias, ajudas, amizade e pelos demais momentos compartilhados neste período e também à Geni Maria pela disposição e alegria;

Ao Abatedouro Araldi (Nova Roma do Sul – RS), pela gentileza em ceder as peles suína para realização deste trabalho;

À UFRGS e ao curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, pela oportunidade na construção do meu conhecimento;

Aos professores do PPGCF pelos ensinamentos e contribuição profissional;

Aos demais amigos e pessoas que de alguma forma fizeram parte dessa etapa da minha vida.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar as características físico-químicas de um insumo nanoestruturado comercial (IN) e de formulações semissólidas de creme e de gel contendo insumo nanoestruturado e/ou tretinoína, bem como estudar *in vitro* sua influência na permeação e penetração/retenção cutânea da tretinoína (TTN) a partir de formulações semissólidas. A caracterização abrangeu análises de pH, diâmetro de partícula, fenômenos de instabilidade, potencial zeta e reologia. O estudo de permeação foi conduzido por células de difusão de *Franz* e da penetração cutânea pelas técnicas de *tape stripping* e retenção cutânea. O insumo nanoestruturado (IN) analisado consistiu de uma dispersão líquida de aparência opaca e leitosa, com comportamento reológico do tipo newtoniano, pH médio de $6,2 \pm 0,05$ e potencial zeta de $-9,55 \pm 1,16$ mV. As partículas esféricas presentes na dispersão apresentaram diâmetro de partícula médio de 144 ± 14 nm e baixo índice de polidispersão. As formulações semissólidas apresentaram-se com pH adequado para aplicação cutânea, com teor de TTN próximo ao teórico. A presença no IN não alterou o comportamento reológico das mesmas, mas reduziu o índice de consistência dos géis. As formulações de creme apresentaram uma leve tendência a cremagem. Através de microscopia eletrônica de transmissão verificou-se nanopartículas esféricas e homogêneas com diâmetro em torno de 150 nm para as formulações de creme e gel. No estudo de permeação *in vitro* não foi detectada a presença de TTN no meio receptor para as diferentes formulações semissólidas. A presença do IN na formulação de creme contendo TTN promoveu uma distribuição mais homogênea do fármaco no estrato córneo (EC). O fluxo da TTN foi reduzido nas camadas adjacentes ao EC a partir de todas as formulações semissólidas. O estudo *in vitro* de liberação permitiu corroborar maior cedência da TTN pelo gel em relação ao creme, e confirmar uma distribuição mais homogênea/constante do fármaco a partir da base de creme contendo IN. O conjunto dos resultados permitiu concluir que é possível associar tretinoína livre em formulações contendo nanopartículas sem que haja favorecimento da permeação cutânea, mas que podem favorecer a maior homogeneidade de sua distribuição através do estrato córneo.

Palavras-chave: tretinoína, insumo comercial nanoestruturado, penetração/permeação cutânea, pele suína, formulações semissólidas.

ABSTRACT

The aim of this work was to evaluate the physicochemical characteristics of the commercial nanostructured ingredient (NI) and semisolids formulations of cream and gel contained nanostructured ingredient and/or tretinoin, as well as to study *in vitro* its influence on the skin permeation and penetration/retention profile of the tretinoin (TTN) from the semisolids formulations. The characterization analyzes included of pH, diameter of particle, instability phenomena, zeta potential and rheology. The permeation study was conducted by *Franz* diffusion cells and the study of skin penetration by *tape stripping* and cutaneous retention techniques. The commercial nanostructured ingredient (NI) consisted of a opaque liquid dispersion with a milky appearance, with newtonian rheological behavior, mean pH of 6.2 ± 0.05 , and zeta potential of -9.55 ± 1.16 mV. IN presented spherical particles with mean diameter size of 144 nm and low polydispersion index. The semi-solid formulations showed with pH adequate for cutaneous application and tretinoin content close theoretical. The NI presence did not affect the rheological behavior of semi-solid formulations, but decreased the consistency index of gels. The cream formulations presented slight tendency to creaming. Through transmission electron microscopy verified homogeneous and spherical nanoparticles with diameter of particles around 150 nm for the gel and cream formulations. *In vitro* skin permeation study was not detected the presence of TTN in the receptor compartment. The presence of NI in cream formulation containing TTN promoted a more homogeneous distribution of the drug in the stratum corneum (SC). The flow of TTN was reduced in layers adjacent to the SC from all formulations semissólidas. The *in vitro* release study corroborate allowed higher yield of TTN by gel compared to the cream, and confirm a more homogeneous distribution/constant of the drug from the cream base containing NI. The set results indicated that it is possible to mix up free-tretinoin in formulations containing nanoparticles without any favoring permeation, but may encourage greater uniformity of their distribution across the stratum corneum.

Keywords: tretinoin, commercial ingredient nanostructured, skin penetrate, pigskin, semi-solid formulations.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura molecular do ácido <i>trans</i> -retinóico.....	37
Figura 2: Crescimento do número de produtos de base nanotecnológica no mercado mundial entre março de 2005 e março de 2011.....	46
Figura 3: Número de produtos de base nanotecnológica comercializados para área de Saúde e <i>fitness</i>	47
Figura 4: Distribuição do tamanho de partícula, por difratometria de laser, da média da triplicata de lote do insumo nanoestruturado analisados pelo volume das partículas.....	79
Figura 5: Distribuição do tamanho de partícula do insumo nanoestruturado analisado por NTA.....	80
Figura 6: Fotomicrografias das partículas do insumo nanoestruturado obtidas por MET.....	82
Figura 7: Reograma de tensão <i>versus</i> velocidade de cisalhamento referente a análise em triplicata do insumo nanoestruturado.....	83
Figura 8: Gráfico de variação de backscattering do insumo nanoestruturado.....	84
Figura 9: Fotomicrografias das nanopartículas na formulação CTN obtidas por MET.....	92
Figura 10: Distribuição do tamanho de partícula, por difratometria de laser, das formulações: (a) GN e (b) GTN analisadas pelo volume e por número de partículas respectivamente.....	94
Figura 11: Perfil granulométrico das formulações de gel (GB, GT, GN e GTN) analisadas por difratometria de laser.....	96
Figura 12: Fotomicrografias das nanopartículas na formulação GTN obtidas por MET.....	97
Figura 13: Perfil reológico das formulações de cremes de acordo com o modelo de Herschel-Bulkley.....	98
Figura 14: Perfil reológico das formulações de gel descritas pelo modelo de Casson.....	98
Figura 15: Gráfico de variação de <i>backscattering</i> da formulação CB.....	102
Figura 16: Gráfico de variação de <i>backscattering</i> da formulação CN.....	103
Figura 17: Gráfico de variação de <i>backscattering</i> da formulação CT.....	103
Figura 18: Gráfico de variação de <i>backscattering</i> da formulação CTN.....	104
Figura 19: Gráfico de variação de transmitância da formulação GB.....	104
Figura 20: Gráfico de variação de <i>backscattering</i> da formulação GT.....	105
Figura 21: Gráfico de variação de <i>backscattering</i> da formulação GN.....	105
Figura 22: Gráfico de variação de <i>backscattering</i> da formulação GTN.....	106
Figura 23: Distribuição da TTN ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) nas camadas de <i>tape</i> no EC, a partir de CTN e CT, através da técnica do <i>tape stripping</i>	108
Figura 24: Distribuição da TTN ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) no estrato córneo, a partir de CTN e CT, através da técnica do <i>tape stripping</i>	110
Figura 25: Distribuição da TTN ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) nas diferentes camadas da pele, a partir de GTN e GT, através da técnica de <i>tape stripping</i> e retenção cutânea.....	111
Figura 26: Distribuição da TTN ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) nas diferentes camadas da pele, a partir de GTN e GT, através da técnica do <i>tape stripping</i>	112
Figura 27: Distribuição da TTN ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) no estrato córneo a partir das formulações de gel e creme.....	114

Figura 28: Distribuição da TTN ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) nas camadas de <i>tape</i> , do EC a partir das formulações de gel e de creme.....	114
Figura 29: Percentual (%) de liberação da TTN a partir das formulações CTN e CT.	116
Figura 30: Representação gráfica da média de valores de DP obtidos na avaliação da liberação da TTN a partir das formulações CTN e CT.....	117
Figura 31: Representação gráfica do percentual de liberação de TTN a partir das formulações GTN e GT.....	118
Figura 32: Representação gráfica comparativa do percentual de TTN liberada a partir das formulações semissólidas de cremes e géis.....	119
Figura 33: Curva-padrão obtida para quantificação da TTN.....	154
Figura 34: Cromatogramas obtidos por CLAE	158
Figura 35: Cromatograma obtido por CLAE representando a especificidade da metodologia empregada para a quantificação da TTN.	160
Figura 36: Curva-padrão obtida para quantificação da TTN nos estudos de penetração/retenção cutânea e de liberação.....	161
Figura 37: Cromatograma de CLAE representando a especificidade da fita <i>tape</i> . .	163
Figura 38: Cromatogramas obtidos por CLAE representando especificidade.	165
Figura 39: Cromatograma obtido por CLAE representando especificidade da pele.	167
Figura 40: Cromatogramas obtidos por CLAE representando especificidade das amostras.....	168
Figura 41: Cromatogramas obtidos por CLAE representando especificidade da membrana de diálise para as amostras das formulações semissólidas.	169
Figura 42: Curva-padrão para quantificação de TTN em PBS pH 7,4:etanol (70:30).	172
Figura 43: Cromatograma obtido por CLAE para especificidade do meio receptor.	174

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição quali-quantitativa das formulações de creme	60
Tabela 2: Composição quali-quantitativa das formulações de gel.....	61
Tabela 3: Modelos matemáticos que descrevem os tipos de comportamentos não-newtonianos	67
Tabela 4: Soluções testadas como candidatas a meio receptor para os estudos de permeação cutânea.....	70
Tabela 5: Diâmetro médio e distribuição granulométrica do insumo nanoestruturado medido pelas diferentes técnicas	79
Tabela 6: Características organolépticas das formulações semissólidas.....	88
Tabela 7: Valores de pH das formulações semissólidas	89
Tabela 8: Coeficiente de regressão (r^2) para os modelos de fluxo da triplicata dos lotes dos cremes (CB, CT, CN e CNT).....	99
Tabela 9. Índices de escoamento (n) e de consistência (K) das formulações dos cremes (CB, CT, CN e CTN).....	100
Tabela 10: Coeficiente de regressão (r) para os modelos de fluxo da triplicata dos lotes das formulações de gel.....	101
Tabela 11: Parâmetros cromatográficos utilizados na metodologia analítica para doseamento da tretinoína em metanol.	151
Tabela 12: Preparo dos pontos de concentração das curvas-padrão de tretinoína.153	
Tabela 13: ANOVA da linearidade do método analítico para quantificação da TTN nas formulações semissólidas.....	153
Tabela 14: Avaliação dos coeficientes de variação (CV %) intra e inter-dia do método analítico para quantificação da TTN nas formulações semissólidas	155
Tabela 15: Avaliação dos coeficientes de variação (CV %) intra e inter-dia do método analítico para extração da TTN nas formulações semissólidas.....	156
Tabela 16: Parâmetros cromatográficos utilizados na metodologia analítica para doseamento da tretinoína em metanol	159
Tabela 17: ANOVA da linearidade do método analítico para quantificação da TTN	161
Tabela 18: Avaliação dos coeficientes de variação (CV %) intra e inter-dia do método analítico para quantificação da TTN nas formulações semissólidas.	162
Tabela 19: Repetibilidade da extração da TTN nas fitas <i>tape</i> (n = 3)	163
Tabela 20: Repetibilidade da extração da TTN nas formulações semissólidas (n = 6)	164
Tabela 21: Percentual de TTN recuperado na extração da pele suína e concentração com o desvio padrão relativo (n = 5)	167
Tabela 22: Condições da escolha do meio receptor	170
Tabela 23: ANOVA da linearidade do método analítico para quantificação da TTN no meio receptor	173
Tabela 24: Avaliação dos coeficientes de variação (CV %) da repetibilidade intra e inter-dia do método analítico para quantificação no meio receptor (n = 9).....	174

LISTA DE EQUAÇÕES

(Equação 1).....	64
(Equação 2).....	99
(Equação 3).....	155
(Equação 4).....	155

LISTA DE ABREVIATURAS

A/O: Água/óleo

CB: creme base

CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CN: Creme contendo nanopartículas

CT: Creme contendo tretinoína

CTN: Creme contendo tretinoína e nanopartículas

EC: Estrato córneo

EV: Epiderme viável

GB: Gel base

GN: Gel contendo nanopartículas

GT: Gel contendo tretinoína

GTN: Gel contendo tretinoína e nanopartículas

LSS: Lauril sulfato de sódio

MET: Microscopia eletrônica de transmissão

IN: Insumo nanoestruturado

NLS: Nanopartícula lipídica sólida

NTA: Nanoparticle Tracking Analysis

O/A: Óleo/água

PDI: Índice de polidispersão

PEG: Polietilenoglicol

PPG: Propilenoglicol

SM: Solução-mãe

T80: Polissorbato 80

TTN: Tretinoína

SUMÁRIO

1. Introdução	19
2. Objetivos	24
2.1 Objetivo Geral	24
2.2 Objetivos Específicos	27
3. Revisão de Literatura	29
3.1 A pele	30
3.1.1 A pele e a absorção percutânea	31
3.2 Fotoenvelhecimento cutâneo e tratamento	35
3.2.1 Fotoenvelhecimento cutâneo	35
3.2.2 Tratamento da pele fotoenvelhecida	36
3.3 Nanopartículas	38
3.3.1 Nanopartículas e nanomateriais: definição e regulamentação	38
3.3.2 Produtos e Insumos cosméticos contendo nanotecnologia: panorama nacional e mundial	45
3.3.3 Aplicação das nanopartículas lipofílicas em cosméticos	48
3.3.4 Nanopartículas lipofílicas contendo vitamina C	51
4. Materiais e Métodos	55
4.1 Materiais	57
4.2 Métodos	59
4.2.1 Produção das bases semissólidas e incorporação dos ativos	59
4.2.2 Caracterização físico-química	62
4.2.2.1 Características organolépticas	62
4.2.2.2 Determinação do pH	63
4.2.2.3 Determinação do potencial zeta (ξ)	63
4.2.2.4 Determinação do diâmetro médio de partícula e distribuição granulométrica	63
4.2.2.5 Avaliação morfológica	65
4.2.2.6 Comportamento Reológico	66
4.2.2.7 Avaliação da estabilidade física	67
4.2.2.8 Quantificação da tretinoína nas formulações semissólidas	68
4.2.3 Avaliação <i>in vitro</i> da permeação/retenção cutânea da tretinoína a partir das bases semissólidas	68
4.2.4 Estudo da liberação <i>in vitro</i> da tretinoína a partir das bases semissólidas	73
4.2.5 Descarte de resíduos químicos e biológicos	73
5. Resultados e Discussão	75
5.1 Caracterização físico-química do insumo nanoestruturado	76
5.1.1 Características organolépticas	77
5.1.2 Determinação do pH	77
5.1.3 Determinação do potencial zeta (ξ)	77
5.1.4 Determinação do diâmetro médio de partícula e distribuição granulométrica	78
5.1.5 Avaliação morfológica	82
5.1.6 Comportamento reológico	83
5.1.7 Análise de fenômenos de instabilidade pela técnica de espalhamento múltiplo de luz	84
5.2 Caracterização físico-química das formulações semissólidas	86
5.2.1 Incorporação dos ativos	86

5.2.2 Características organolépticas.....	88
5.2.3 Determinação do pH.....	89
5.2.4 Quantificação da tretinoína nas formulações semissólidas	90
5.2.5 Determinação do diâmetro médio de partícula e distribuição granulométrica e morfologia das partículas	90
5.2.6 Comportamento reológico	97
5.2.7 Análise de fenômenos de instabilidade pela técnica de espalhamento múltiplo de luz.....	102
5.3 Avaliação in vitro da permeação e penetração/retenção cutânea da tretinoína a partir das bases semissólidas	107
5.4 Estudo de liberação da TTN in vitro	116
6. Conclusões	123
7.Referências	127
8. Anexos	149
8.1 Validação de metodologia para extração e quantificação da tretinoína nas formulações semissólidas	151
8.1.1 Validação de metodologia para quantificação da tretinoína nas formulações semissólidas.....	151
8.1.2 Validação da extração da TTN nas formulações semissólidas.....	155
8.2 Validação de metodologia analítica para extração e doseamento da TTN nos estudos de penetração cutânea e liberação.....	159
8.2.1 Validação da metodologia para quantificação da tretinoína	159
8.2.2 Validação da extração da TTN e especificidade das fitas de <i>tape</i>	162
8.2.3 Validação da extração da TTN a partir das formulações semissólidas...	163
8.2.4 Especificidade do algodão	164
8.2.5 Validação de metodologia da extração da TTN de especificidade das amostras de pele abdominal de fêmea suína	165
8.2.6 Especificidade membrana de diálise	168
8.2.7 Validação da metodologia para quantificação de TTN no meio receptor	170
8.3 Certificado de Análise do insumo nanoestruturado NanoVit C – Lote 3060...	175
8.4 Informe Técnico do insumo nanoestruturado NanoVit C.....	177
8.5 Bula do Vitacid (componetes creme e gel).....	183

1. Introdução

Atualmente produtos cosméticos e dermocosméticos têm sido desenvolvidos com algum tipo de tecnologia inovadora, como a nanotecnologia, a qual começou a ser visada em meados dos anos 90 devido às diversas vantagens de sua aplicabilidade, principalmente no que se refere a uma maior capacidade de penetração dos ativos na pele (ERENO, 2008; NEVES, 2008; BARIL et al., 2012). Para aplicação dermatológica os produtos nanotecnológicos apresentam algumas vantagens frente a produtos convencionais como: a capacidade de proteção a compostos lábeis contra a degradação química (OURIQUE et al., 2011), a possibilidade de controlar a liberação de fármacos (CONTRI et al., 2010), a atuação como agentes oclusivos (WISSING e MÜLLER, 2003), a potencial ação com bloqueadores das radiações UV (ALMEIDA et al., 2009), a melhora da eficácia dermatológica (FONTANA et al., 2011), a redução da irritação dérmica (LIU et al., 2007), um baixo potencial alergênico (PAESE et al., 2009) e como sistemas de depósito no folículo piloso (LADEMANN et al., 2007).

Uma vez que atualmente é notório o avanço na produção e disponibilização de novos ingredientes para produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes com base nanotecnológica torna-se necessário à existência de uma regulamentação de produtos contendo esta nova tecnologia. Tomando a frente, os países da União Européia publicaram no Official Journal of the European Union em outubro de 2011 o primeiro documento oficial (L 275) de definição e normas específicas para nanomateriais e produtos nanotecnológicos. O documento L 275 já possui atualizações e tem servido de base para outros países deficientes de regulamentação em nanotecnologia. Países como Brasil, Japão, EUA, Canadá, dentre outros, já estão avançando na regulamentação com a criação de guias derivados de encontros de nível internacional.

Tendo em vista a disponibilidade de produtos cosméticos e dermocosméticos contendo nanotecnologia no mercado há pelo menos duas décadas e o estabelecimento de legislações em fase de desenvolvimento e implantação, diversos produtos contendo nanotecnologia foram liberados para comercialização sem a obrigatoriedade da realização de ensaios que comprovassem a presença ou ausência de nanoestruturas na sua composição. Diversos autores apontam a necessidade de alguns estudos em produtos contendo nanotecnologia como:

avaliação das características físico-químicas (estrutura cristalina; estado de agregação; revestimentos de superfície; reatividade de superfície; pureza, pH, potencial zeta); influência da absorção percutânea e da liberação do ativo; biodegradabilidade em meios biológicos ou ambiente (SCHAFFAZICK et al., 2003; PARDEIKE et al., 2009; MÜ e SPRANDO, 2010).

Atualmente novos grupos de excipientes e sistemas vem sendo utilizado para melhorar a liberação de fármacos através da pele, sem, no entanto, afetar a sua função barreira. Como opção frente aos promotores químicos cita-se, as microemulsões, nanopartículas (poliméricas e lipídicas) e os lipossomas que poderão modificar a farmacocinética da substância ativa facilitando sua passagem através da pele (ALVAREZ-ROMÁN et al., 2004; CEVC, 2004; MÜ e SPRANDO, 2010). Em vista da atuação das nanopartículas como promotoras de permeação de fármacos na pele, alguns grupos de pesquisa tem realizado estudos de permeação para avaliar a influência das nanopartículas na permeação/penetração e liberação de ativos na pele a partir de formulações semissólidas (MÜLLER, 2002; JIMÉNEZ et al., 2004; PAESE, 2008; SHAH et al., 2007; YOURIK et al., 2008; OURIQUE et al., 2011). Entretanto, até o momento não foi encontrado na literatura estudos que avaliassem fármacos livres em presença de nanopartículas em formulações de creme e gel e trabalhos que avaliassem insumos comerciais e sua compatibilidade em formulações de creme e gel. Contudo, propôs-se a realizar um estudo pioneiro de permeação de um fármaco livre incorporado em formulações semissólidas contendo nanopartículas já produzidas e comercializadas no Brasil.

Considerando o exposto este trabalho se trata da avaliação das características físico-químicas de um insumo cosmético nanoestruturado comercial, antes e após sua incorporação em formulações semissólidas, bem como da avaliação da sua influência na permeação/retenção cutânea e na liberação *in vitro* da tretinoína, a partir das formulações semissólidas de creme e gel. A tretinoína foi escolhida para esse estudo devido a sua ampla utilização em formulações dermocosméticas para o tratamento do fotodano e clareamento facial, assim como o insumo nanoestruturado que contém vitamina C oleosa, podendo assim os ativos selecionados agirem de forma complementar ou sinérgica no tratamento de manchas e fotoenvelhecimento da pele.

Além disso, a tretinoína por sua característica altamente lipofílica poderia associar-se aos nanocarreadores lipídicos nanoestruturados por afinidade, penetrando mais facilmente na pele.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Avaliar as características físico-químicas de um insumo cosmético nanoestruturado comercial, antes e após sua incorporação em formulações de creme e gel com ou sem a adição de tretinoína e estudar sua influência no perfil de permeação, penetração/retenção cutânea e liberação *in vitro* da tretinoína a partir de formulações semissólidas (creme ou gel).

2.2 Objetivos Específicos

I. Avaliar as características físico-químicas do insumo nanoestruturado comercial;

II. Preparar bases semissólidas (gel e creme) para incorporação de tretinoína e/ou do insumo nanoestruturado e avaliar suas características físico-químicas a fim de verificar a influência da adição do insumo nanoestruturado;

III. Validar uma metodologia analítica para extração e quantificação da tretinoína nas bases semissólidas, fitas adesivas e pele suína;

IV. Avaliar a influência do insumo nanoestruturado na permeação e retenção cutânea *in vitro* da tretinoína, a partir de bases semissólidas, empregando célula de Franz e pele de abdômen de porcas;

V. Estudar a liberação *in vitro* da tretinoína a partir de formulações semissólidas contendo e não contendo insumo nanoestruturado.

3. Revisão de Literatura

3.1 A pele

3.1.1 A pele e a absorção percutânea

A pele como maior órgão do corpo humano corresponde a cerca de 5% do peso total do indivíduo, apresentando uma área total em torno de 2 m². Uma de suas principais funções é funcionar como barreira protetora contra influências mecânicas, químicas, microbianas e físicas entre o organismo e o meio externo (GONCHOROSKI e CORRÊA, 2005; SCHAEFER et al., 2008; BECK et al., 2011). A pele é composta por três camadas: a epiderme, a derme e a hipoderme. A epiderme é constituída por quatro camadas de células: basal, granulosa, espinhosa e córnea (a camada mais superficial), classificadas pelos tipos celulares que cada uma possui, contudo, a fim de facilitar o entendimento, pode ser dividida apenas em estrato córneo (EC) e epiderme viável (EV), as quais englobam a epiderme como um todo (PRISTA et al., 1995; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1999; HERNANDEZ e MERCIER-FRESNEL, 1999; NETZLAFF et al., 2005; SCHAEFER et al., 2008).

O EC é formado basicamente por corneócitos, células não viáveis, com composição lipídica fundamental que atua como uma barreira física que se renova constantemente e que protege o corpo da perda excessiva de água e da invasão de substâncias químicas e biológicas. Esta é a principal camada responsável pela impermeabilidade à diversas substâncias, constituindo na principal responsável pelo controle da penetração de ativos, pois atua como obstáculo à penetração de moléculas indesejáveis, em especial às substâncias altamente hidrofílicas (WERTZ e DOWNING, 1989; MORGANTI et al., 2001; CEVC, 2004; LEONARDI E CHORILLI, 2008; SCHAEFER et al., 2008). No caso da epiderme viável, que está logo abaixo do estrato córneo, é constituída de várias camadas de células em distintos estágios de diferenciação, possui capacidade de metabolizar produtos químicos que passam através do estrato córneo e confere maior resistência às substâncias altamente lipofílicas. De forma generalizada, as substâncias lipofílicas permeiam mais facilmente através da pele devido à maior eficiência da barreira formada pelo EC às substâncias hidrofílicas (RHEIN et al., 2000; LEONARDI E CHORILLI, 2008). A derme fornece suporte fisiológico para a epiderme avascular e é onde residem os vasos sanguíneos, nervos sensoriais e vasos linfáticos, além de fibras colágenas e

elásticas. A pele também contém apêndices, tais como os folículos pilosos, glândulas sebáceas e sudoríparas (WHO, 2006). A hipoderme reside abaixo da derme e é composta de gordura, tecido conjuntivo fibroso e elástico, os quais estão intercalados, e possui especial importância no isolamento térmico (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1999; KANIKKANNAN et al., 2000).

A penetração na pele de uma substância é um processo complexo que envolve três etapas principais: (1) a liberação da substância a partir do veículo ou forma farmacêutica, (2) a penetração no EC, e (3) o particionamento do estrato córneo para a epiderme viável e derme. As propriedades físico-químicas tanto da substância quanto do veículo e grau de saturação da substância na formulação são processos determinantes na penetração de substâncias na pele. Assim, o entendimento dos processos de absorção cutânea são necessários para a avaliação da liberação de fármacos de qualquer via dérmica ou transdérmica (DESAI et al., 2010). Além disso, o estudo do perfil de permeação/penetração cutânea é muito importante para o desenvolvimento, otimização das formulações e melhor conhecimento da eficácia de produtos tópicos (LADEMANN et al., 2007). Além dos fatores já citados, a composição lipídica da epiderme é também importante no processo de absorção cutânea (LEONARDI E CHORILLI, 2008), sendo que o efeito local pode ser favorecido se estas substâncias se concentrarem em regiões subcutâneas ao atravessarem o estrato córneo (FRONZA, 2006).

A lipofilia de um produto é fator importante, pois faz com que este atinja as estruturas lipídicas ou lipoprotéicas da pele com maior facilidade para participar do metabolismo desta. Além da lipofilia, a massa molar (moléculas com alta massa molecular penetram com maior dificuldade devido ao seu volume), a presença de promotores de penetração, o tipo de formulação, o estado físico da formulação, local de aplicação da formulação e o grau de hidratação do estrato córneo são fatores importantes a serem considerados no caso de formulações de aplicação tópica (MORGANTI et al., 2001; VERMA et al., 2003; LEONARDI E CHORILLI, 2008).

Existem diversos agentes que podem auxiliar na penetração de substância na pele. Os promotores de permeação são compostos químicos farmacologicamente inertes e com boas propriedades solventes (HADGRAFT, 1999; WILLIAMS E BARRY, 2004; PATHAN E SETTY, 2009). Solventes e compostos anfifílicos são os grupos de promotores de permeação clássicos e mais antigos, como exemplo:

propilenoglicol, polietilenoglicol, DMSO, ácidos láctico, oléico e salicílico, tensoativos, uréia, etc. De modo geral esses promotores irão aumentar o fluxo da substância ativa através da pele (ANSEL et al., 2000; WILLIAMS E BARRY, 2004; LEONARDI E CHORILLI, 2008). Atualmente novos grupos de excipientes e sistemas vem sendo utilizado para melhorar a liberação de fármacos através da pele, sem, no entanto, afetar a sua função barreira. Como opção frente aos promotores químicos cita-se, atualmente, as microemulsões, nanopartículas (poliméricas e lipídicas) e os lipossomas que poderão modificar a farmacocinética da substância ativa facilitando sua passagem através da pele (ALVAREZ-ROMÁN et al., 2004; CEVC, 2004; MÜ e SPRANDO, 2010).

Em vista a obter maiores informações acerca da atuação de nanopartículas como promotoras de permeação, diferentes estudos têm sido relatados na literatura. WISSING e MÜLLER (2003) introduziram as nanopartículas lipídicas sólidas e (NLS) e os carreadores lipídicos nanoestruturados (CLNs) como importantes sistemas transportadores de ativos de formas farmacêuticas e cosméticas. Esses sistemas nanoestruturados estão sendo propostos como carreadores coloidais usados para liberar vários fármacos na pele e no estrato córneo de forma imediata ou gradual. Como resultado é possível suprir a pele por um período de tempo mais prolongado, podendo-se também considerar que um tratamento no local afetado é capaz de reduzir a absorção sistêmica e os efeitos colaterais (JALÓN et al, 2001a; JALÓN et al., 2001b; COUVREUR et al, 2002).

A absorção de fármacos e outras substâncias através da pele pode ser estudada através de ensaios *in vitro* e *in vivo*, com diversos tipos de membranas naturais, como pele humana, de porco, de rato, etc, ou sintéticas. A pele de porco tem sido bastante utilizada nos estudos *in vitro*, em especial por indústrias cosméticas, uma vez que estes ensaios são necessários para uma previsão da absorção percutânea, avaliação de perfis farmacocinéticos da substância em questão e correlação entre os ensaios *in vitro* e *in vivo* com a pele humana, dos quais resultados são mais próximos da realidade (OECD, 2004; GODIN E TOUITOU, 2007; LEONARDI E CHORILLI, 2008; SCHAEFER et al., 2008).

Diversos equipamentos e instrumentos são empregados para estudos *in vitro* de permeação cutânea e liberação de fármacos a partir de formulações dermatológicas e transdérmicas, entre eles as “células de liberação ou de difusão”.

Há uma grande variedade de estudos descritos na literatura utilizando células de difusão de Franz (FRANZ, 1975) para avaliação da encapsulação de ativos ou fármacos na permeação cutânea. MANCONI e colaboradores (2002) estudaram a liberação *in vitro* da tretinoína, livre e encapsulada em niossomas, em células de difusão do tipo Franz, a partir de formulações semissólidas e concluíram que a entrega da tretinoína é principalmente afetada pela estrutura vesicular, aumentando respectivamente nas estruturas multilamelares para unilamelares de tamanho grande e unilamelares de tamanho pequeno.

ALVES e colaboradores (2007) utilizaram o método de célula de Franz seguida da técnica de *tape stripping* para avaliar a penetração e a distribuição da nimesulida a partir de hidrogéis contendo diferentes nanopartículas, os quais foram aplicados em pele humana. Os resultados apresentados pelos autores mostraram que a presença da nimesulida nas camadas viáveis da pele foi maior para o hidrogel contendo nimesulida associada às nanocápsulas, quando comparados àqueles obtidos para os hidrogéis contendo nimesulida associada a nanoesferas ou nanoemulsão.

PUGLIA e colaboradores (2008) utilizaram células de Franz a fim de estudar *in vitro* o comportamento de nanopartículas lipídicas de ketoprofeno e naproxeno na absorção percutânea sobre pele humana a partir de formulações de gel. Os resultados obtidos pelos autores demonstraram que as nanopartículas foram capazes de reduzir a penetração do fármaco verificado pelo seu acúmulo na camada córnea.

OURIQUE e colaboradores (2011) utilizaram células de difusão de Franz para estudar a influência da nanoencapsulação no perfil de permeação da tretinoína através da pele a partir de hidrogéis. Os autores compararam a permeação da tretinoína livre e nanoencapsulada em nanocápsulas de núcleo lipídico e concluíram que a nanoencapsulação permitiu maior retenção do fármaco na superfície da pele em comparação com o fármaco livre no hidrogel.

SILVA e colaboradores (2013) após preparar nanocápsulas de núcleo lipídico contendo vitamina K1 estudaram a influencia da nanoencapsulação da vitamina K1 na sua permeação cutânea. Foi utilizado células de difusão de Franz seguida da técnica *de tape stripping* como metodologias. Após 8 horas de experimento foi observado maior quantidade da vitamina K1 na derme e na camada mais externa da

pele e uma diminuição da permeação do fármaco para o compartimento receptor do fármaco a partir das nanocápsulas em comparação com o fármaco livre.

3.2 Fotoenvelhecimento cutâneo e tratamento

3.2.1 Fotoenvelhecimento cutâneo

O envelhecimento é um processo complexo e multifatorial, resultando em diversas alterações funcionais e estéticas na pele, tendo duas vertentes classificatórias: fotoenvelhecimento e envelhecimento cronológico. O fotoenvelhecimento cutâneo é a ocorrência da exposição crônica às radiações ultravioletas (UV) que, associado a fatores intrínsecos e o aumento da idade, acarreta mudanças na aparência e alterações da pele, podendo causar a fotocarcinogênese. O envelhecimento cronológico é considerado um fenômeno de continuação do processo de desenvolvimento e diferenciação, que ocorre com uma sequência de eventos que leva à redução progressiva do funcionamento e capacidade de reserva de todos os órgãos do corpo, incluindo a pele (GILCHREST E YAAR, 2007; RAMOS-E-SILVA e CARNEIRO, 2007; SCOTTI et al., 2007).

O fotoenvelhecimento e o envelhecimento cronológico são processos distintos tanto na ocorrência quanto nos processos clínicos e histológicos que afetam a estrutura e funções da pele (FARAGE et al., 2008; RESZKO et al., 2009). Fatores intrínsecos ao envelhecimento representam um processo complexo que inicia em nível molecular e obedece intrinsecamente a um programa genético individual, ao qual se sobrepõem as agressões impostas pelo meio ambiente. O fatores extrínsecos são, em diferentes graus, controláveis e incluem a exposição à poluição, à luz solar (radiações UV), hábitos alimentares, tabagismo, uso do álcool e outras drogas, estilo de vida, entre outros (VIEIRA, 2007; FARAGE et al., 2008; KEDE E OLEG, 2009).

As alterações histológicas decorrentes do envelhecimento intrínseco são caracterizadas pela diminuição da síntese de colágeno, da degeneração de redes de fibras elásticas e da perda da hidratação da pele. Clinicamente essas alterações são visualizadas através do enrugamento fino, da perda do tônus, e da perda de gordura subcutânea da pele. Por outro lado, as alterações histológicas decorrentes dos

fatores extrínsecos, onde a radiação UVA é o principal fator desencadeante, são caracterizadas pelas alterações da matriz e mudanças no padrão da expressão dos fibroblastos com diminuição do colágeno tipo 1 e do conteúdo celular. Clinicamente, o fotoenvelhecimento extrínseco é caracterizado pelo enrugamento grosseiro e sulcar com um espessamento da pele, elastose aparente, e uma variedade de neoplasmas benignos, pré-malignos ou malignos, além de alterações pigmentares e telangiectasias que contribuem para uma aparência envelhecida, criando sombras e áreas de contraste na face (GILCHREST e YAAR, 1992; DRAELOS, 2005; VARANI et al., 2010).

O fotoenvelhecimento ocorre a partir da exposição excessiva da pele à luz do sol, onde a radiação UV (UVA e UVB) é absorvida por moléculas da pele. A radiação UV é responsável por 90% dos danos causados à pele e assim como os raios infravermelhos (IV) os quais penetram mais profundamente na pele. As radiações UVA e UVB estimulam a formação de radicais livres. Para exercer seus efeitos nas células, a energia eletromagnética da radiação UV deve ser absorvida pelos cromóforos celulares existentes, tais como DNA, porfirinas, ácido urocânico e aminoácidos aromáticos. Estes cromóforos, quando excitados, podem reagir com o oxigênio molecular, resultando em espécies reativas de oxigênio que causam dano oxidativo de componentes celulares como paredes celulares, membranas lipídicas, mitocôndrias e DNA (LONGSTRETH et al., 1998; FISHER et al., 2005).

3.2.2 Tratamento da pele fotoenvelhecida

O fotoenvelhecimento e suas consequências podem ser evitados através da supressão da exposição da pele ao sol e uso da fotoproteção, com uso de chapéus, tecidos ou ainda produtos como filtros solares. A fotoproteção é a medida mais importante a ser tomada para a melhoria do aspecto da pele. Contudo, a pele que se apresenta fotoenvelhecida precisa ser tratada. Atualmente há inúmeros tratamentos médicos e cirúrgicos, além de produtos cosméticos, “cosmecêuticos” e farmacológicos, além de novas tecnologias, as quais estão disponíveis para a proteção e o tratamento em função da melhoria do aspecto da pele envelhecida (RAMOS-E-SILVA E CARNEIRO, 2001; PALM e O'DONOGHUE, 2007).

Na tentativa de um tratamento mais eficaz para a pele fotoenvelhecida, tem-se utilizado terapias mais agressivas, através da remoção da pele danificada pra promover a renovação da pele saudável (DRAELOS, 2005). A introdução dos retinóides ocorreu na década de 60, sendo considerada, na época, a nova era para tratamentos dermatológicos (KRAURTHEIM e GOLLNICK, 2004)

As propriedades biológicas de retinóides incluem captura de radicais livres, aumento da proliferação de fibroblastos, modulação da proliferação celular e diferenciação do colágeno, aumento da síntese de hialuronato, e diminuição da matriz metaloproteinase. Segundo DRAELOS (2005), diversos estudos relatam um alto nível de eficácia contra acne, fotoenvelhecimento e psoríase do uso tópico de retinóides.

A tretinoína (Figura 1) é um retinóide natural, derivado ácido da vitamina A, também chamada de ácido *trans*-retinóico, que quando aplicada topicamente é efetiva no tratamento de afecções cutâneas como a acne, fotoenvelhecimento, ictiose, psoríase, câncer de pele, entre outros. Entretanto, é uma substância irritante, e seu uso pode causar descamação e ressecamento da pele e mucosas (BRISAERT e PLAIZIER-VERCAMMEN, 2000; ZHAI e MAIBACH, 2004; ANVISA, 2013).

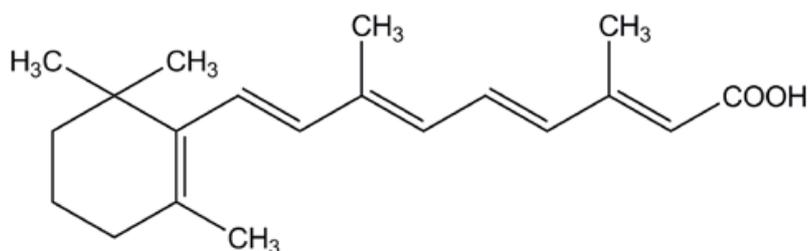


Figura 1: Estrutura molecular do ácido *trans*-retinóico.

A utilização da tretinoína tópica (Retin A[®], Renova[®], Ortho-Neutrogena[®]) no tratamento da pele fotoenvelhecida justifica-se por sua capacidade de melhorar a aparência dos sinais da pele, como linhas finas, rugas e pigmentação. A tretinoína (Retin A[®]) foi originalmente aprovada para uso em concentrações acima de 0,1% no tratamento da acne e, mais tarde, com o nome de Renova[®], a 0,025% e 0,05% (DRAELOS et al., 2005; HELFRICH et al., 2008).

Em 1986 KLIGMAN e seu grupo de pesquisa estudaram a atividade anti-fotoenvelhecimento da tretinoína. Foram realizadas várias aplicações de creme contendo tretinoína nas concentrações de 0,05% e 0,1% e de um creme controle por

um mês. Observou-se, em relação ao creme controle, quatro diferentes efeitos histológicos: aumento da espessura da epiderme, aumento da espessura da camada granular, diminuição do teor de melanina e a compactação do estrato córneo. Os efeitos clínicos relatados foram: textura mais suave da pele com perda ou diminuição das rugas finas, leve eritema (decorrente da irritação), suavização de lentigos, e melhoria das rugas mais grosseiras.

KANG e colaboradores (2005) realizaram um estudo a longo prazo da segurança e eficácia de creme contendo tretinoína a 0,05%. O estudo foi conduzido com uma aplicação ao dia do creme durante dois anos para o tratamento do fotodano moderado a grave fotodano. Os resultados mostraram que a longo prazo a tretinoína a 0,05% apresentou-se segura e eficaz em pacientes com fotodano facial grave. O tratamento com tretinoína resultou, em relação ao grupo placebo, em uma melhora significativamente maior dos sinais do envelhecimento como: enrugamento fino e grosseiro, hiperpigmentação e lentigos. Na avaliação imunohistoquímica, foi mostrado um aumento significativo do marcador procolágeno 1C terminal, responsável pela síntese do colágeno.

3.3. Nanopartículas

3.3.1 Nanopartículas e nanomateriais: definição e regulamentação

Um grande interesse tem sido gerado pela nanotecnologia nas mais variadas áreas, por ser um campo emergente da ciência com ampla gama de aplicações, e devido ao impacto de resultados que a sua utilização pode fornecer ao desenvolvimento tecnológico e econômico. O termo Nanotecnologia vem sendo definido por grupos de pesquisa científicos, órgãos e agências do mundo todo a fim de aprimorá-lo, entretanto não há um consenso internacional sobre sua denominação, tendo as seguintes conceituações:

- “é a integração de nanodispositivos em materiais, sistemas e arquiteturas macroscópicas sem perda das propriedades derivadas da nanoestruturação” (NSF, 2013);

- “o uso de pequenas estruturas menores de 1.000 nm de diâmetro que são projetadas para apresentar propriedades específicas” (EMEA, 2013);

- “o entendimento e controle da matéria e processos em nanoescala, tipicamente, mas não exclusivamente, abaixo de 100 nanômetros em uma ou mais dimensões, onde o aparecimento de fenômenos dependentes de tamanho permite novas aplicações” ou “utilização das propriedades dos materiais em nanoescala que são diferentes das propriedades dos átomos individuais, moléculas, ou dos materiais macroscópicos, criando materiais, dispositivos e sistemas melhores que exploram essas novas propriedades” (ISO TC 229, 2013);

- “é a concepção, caracterização, produção e aplicação de estruturas, dispositivos e sistemas de manipulação controlada de tamanho e forma, à escala nanométrica (atômica, molecular e macromolecular escala) que produz estruturas, dispositivos e sistemas com pelo menos uma nova característica/propriedade superior (BAWA et al., 2005).

- No Brasil, o NBS - Nomenclatura Brasileira de Serviços - no dia 02 de abril de 2012, por meio do Decreto nº 7.708 define a nanotecnologia como termo relativo a um amplo leque de novas tecnologias que objetivam manipular átomos, moléculas e partículas subatômicas para a criação de novos produtos.

Assim como para a nanotecnologia, a definição para os nanomateriais vêm sendo discutida internacionalmente. Contudo, atualmente a definição mais difundida é a divulgada pela European Commission (UE) em 2011 que considera como “Nanomaterial todas as partículas que possuam pelo menos uma das suas dimensões em escala entre 1 e 100 nm e que estas partículas sejam estudadas em número”. Contudo, a definição mais consensual estabelece que “Nanomaterial é um material natural, obtido acidentalmente ou fabricado, que contém partículas livres ou agregadas onde, para 50% ou mais das partículas, considerando a sua distribuição em número, possui uma ou várias dimensões externas na escala entre 1 nm e 100 nm”. A UE relata que em certas circunstâncias especiais prevalentes para certos dispositivos farmacêuticos ou médicos, incluindo nanopartículas lábeis (lipossomas, nanoemulsões, nanopartículas lipídicas), a definição não deve excluir o termo “nano” para estruturas especializadas já em uso com diâmetro médios entre 100 e 1.000 nm, uma vez que alguns tipos de nanopartículas apresentam suas propriedades especiais em faixas de tamanhos maiores que 100 nm (ABDI, 2013).

Independente da definição adotada, os elementos nanotecnológicos devem ter propriedades únicas e especiais que são exclusivamente devido às suas

proporções nanométricas, sendo que a relação entre as propriedades dos materiais e seu desempenho como produto deve ser estabelecido para justificar seu uso. Para isso, no caso das indústrias, é necessário demonstrar os benefícios das nanopartículas e dos produtos comerciais antes de sua comercialização (YOKOYAMA e HUANG, 2005; HASSAN e ELSHAFFEEY, 2010; FDA 2012b). Além dos benefícios, há uma grande preocupação quanto aos riscos que a exposição à nanotecnologia pode exercer.

Em se tratando de nanocosméticos, de acordo com o *Scientific Committee on Consumer Products da Comissão Européia* (2007), o risco está associado ao uso de nanoestruturas cujas partículas tenham diâmetro abaixo de 100 nm. Segundo esse mesmo comitê as nanoestruturas deveriam ser classificadas em dois grupos: lábeis e insolúveis. As nanoestruturas lábeis são aquelas que se dissolvem física ou quimicamente após sua aplicação sobre a pele, não oferecendo riscos maiores que os produtos convencionais à saúde e ao meio ambiente, considerando que as avaliações convencionais de risco podem ser suficientes para garantir sua segurança. Enquanto que as nanoestruturas insolúveis são incapazes de se desestruturar nos meios biológicos, sendo necessárias outras medidas de avaliação, tais como, número de partículas, área superficial, bem como sua distribuição e penetração. Já que essas podem trazer maiores riscos, devido à sua possibilidade de captura, podendo tornar-se sistematicamente disponível e levar a um acúmulo em órgãos-alvo secundários. Esses efeitos podem ser agravados com a aplicação repetida de produtos nanocosméticos contendo nanopartículas insolúveis. Devido aos riscos que essas nanopartículas podem causar ao consumidor e ao meio ambiente, esses nanocosméticos devem ser avaliados caso a caso (SCCP, 2007).

A segurança de nanomateriais, além de considerar a utilização pelo consumidor, deve ser estudada e avaliada de forma a considerar toda a exposição que pode ocorrer desde as etapas de fabricação de nanoingredientes e eventual exposição dos trabalhadores, até à eliminação dos produtos contendo nanomateriais e a sua persistência e efeitos no meio ambiente. Para que este amplo estudo seja possível, torna-se fundamental uma avaliação e caracterização dos nanomateriais que exige uma definição rigorosa e métodos adequados (ITEHPEC, 2012) e a regulamentação específica para este tipo de tecnologia.

Em se tratando de regulação do setor nanotecnológico, a nanotecnologia que vem sendo considerada como a nova “Revolução Tecnológica” e, relativamente nova, nem todos os países possuem uma legislação específica para este ramo, sendo que a União Européia foi a primeira a instituir normas específicas no ano de 2011. Entretanto, já há alguns anos instituições como: Environmental Protection Agency (EPA), Food and Drug Administration (FDA), National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH), Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), International Organization for Standardization (ISO), entre outras, vem formando encontros e fóruns nacionais e internacionais e transformando as discussões em literaturas orientativas (guias, relatórios, etc) sobre a definição, caracterização e demais controles mínimos a serem realizados nos produtos contendo nanotecnologia. Esses materiais têm servido de base para que as indústrias desenvolvam seus projetos, produtos e processos (ABDI, 2010; ABIHPEC, 2010). O FDA em 20 de abril de 2012 lançou um guia de orientação às indústrias de cosméticos para o uso da nanotecnologia em seus produtos. O documento estabelece as idéias do FDA sobre a realização de avaliações de segurança para produtos cosméticos, observando que cosméticos com nanomateriais estão sujeitos aos mesmos requisitos que os outros produtos conforme a seguir:

- Os requisitos legais para cosméticos fabricados usando nanomateriais são os mesmos que aqueles para quaisquer outros cosméticos. Enquanto os cosméticos não estão sujeitos a aprovação pré-comercial, empresas e indivíduos que comercializam os cosméticos são legalmente responsáveis pela segurança dos seus produtos e eles devem estar devidamente rotulados;

- Para realizar as avaliações de segurança de produtos cosméticos que contenham nanomateriais, testes-padrão de segurança podem precisar ser modificados ou novos métodos desenvolvidos.

Segundo a ANVISA (2004) as metodologias para avaliação dos fármacos contendo o ativo na forma livre já estão bem estabelecidas, porém para os produtos que contém nanotecnologia ainda faltam legislações e estudos que garantam a segurança dos mesmos. Na literatura científica, autores sugerem algumas análises importantes a serem realizadas em produtos de base nanotecnológica como: tamanho das partículas e distribuição do seu tamanho; biodegradabilidade em

meios biológicos ou ambiente; estrutura cristalina; estado de agregação; revestimentos de superfície; reatividade de superfície; pureza, pH e potencial zeta (SCHAFFAZICK, 2003; PARDEIKE et al., 2009; MÜ e SPRANDO, 2010). MÜ e SPRANDO (2010) discutem em um de seus trabalhos que a avaliação das características físico-químicas das nanopartículas constitui uma compreensão do nanomaterial e da interação deste com o meio ambiente, mas que combinada com o entendimento da via de exposição fornece informações úteis sobre o destino biológico dos nanossistemas e de sua toxicidade. PARDEIKE e colaboradores (2009) relatam a importância de estudar a influência da absorção percutânea e da liberação de um ativo a partir nanossistemas, sendo importante para sua segurança e eficácia.

Em agosto de 2012 a Comissão Européia publica a segunda revisão para nanomateriais com indicações do Regulamento de Registro, Avaliação, Autorização e Restrição de Produtos Químicos (REACH) para os nanomateriais (NIA, 2013). A legislação para a nanotecnologia está deixando de ser voluntária para ser mandatória (legalmente obrigatória) (ADBI, 2010). A União Européia já consta de regulação para os nanomateriais, os quais são regulamentados pelo REACH - Regulation on Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals – que instituiu o conceito de nanomaterial, testes mínimos para comprovação do tamanho e outras obrigatoriedades para a comercialização de produtos contendo estes a fim de garantir a saúde, a segurança e a proteção ambiental (JOUE, 2011). A Agência Européia de Medicamentos segue os mais recentes desenvolvimentos em nanotecnologia, que são relevantes para o desenvolvimento de medicamentos. Recomendações da Comissão da Agência de Medicamentos para Uso Humano (CHMP) já levaram à aprovação de uma série de medicamentos à base de nanotecnologia. São exemplos de medicamentos em lipossomas: Caelyx (doxorubicina); MEPACT (mifamurtida) e Myocet (doxorubicina); e em outros sistemas nanoestruturados: Abraxane (paclitaxel), Emend (aprepitante) e Rapamune (sirolimus).

A ITEHPEC (2012) informou que as normas a serem adotadas para o estudo da segurança e a regulamentação internacional encontram-se em debate nas principais regiões econômicas. Vale dizer que o Brasil é membro integrante dos fóruns de discussão participando na ISO (International Organization for

Standardization) e no ICCR (International Cooperation on Cosmetic Regulation). Uma harmonização e alinhamento internacional são importantes para o setor produtivo brasileiro que exporta produto acabado, para que não sejam acrescentadas barreiras à livre circulação de mercadorias. A nível nacional, no Brasil a definição de nanotecnologia adotada é a descrita pela ISO TC 229 e para nanomaterial da ISO/TR 12885-2008 nanomaterial engenheirado é um material nanoestruturado e/ou é o que contém nano-objetos). Além disso, o grupo formado pelo Ministério de Desenvolvimento Industrial e Comércio (MDIC) em 2007, desenvolveu um algoritmo que relaciona perguntas para direcionar a classificação de diferentes nanomateriais, os quais teriam diferentes graus de risco ou perigo em potencial, por exemplo, nanotubos de carbono e lipossomas.

Em maio de 2012 o ITEHPEC (Instituto de Tecnologia e Estudos de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos) criou o *Documento de Referência “Nanotecnologia em Cosméticos”* derivado do Encontro Internacional “Os Pilares Fundamentais da Nanotecnologia na Indústria Cosmética” realizado em São Paulo, SP, Brasil. Esse documento exhibe os apontamentos e recomendações do setor com o objetivo de auxiliar a construção de políticas públicas adequadas para o desenvolvimento da nanotecnologia para a Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos no Brasil. A seguir algumas orientações importantes, para indústrias fabricantes de nanoingredientes e produtos que os contenham, descritas no Documento de Referência:

- A análise de segurança de cosméticos que incorporam nanotecnologias deve ser desenvolvida no produto final se as tecnologias aplicadas forem solúveis e lábeis; ou então, diretamente nos nanoingredientes, se estes forem insolúveis e persistentes. No entanto, todos os produtos cosméticos, independentemente das tecnologias que incorporem, devem sempre ser objeto de todas as análises exigidas pelas normas e requerimentos regulatórios da ANVISA;

- A análise específica de segurança dos cosméticos contendo nanomateriais não exclui as normas de segurança comuns aos produtos de higiene pessoal, perfumaria e cosméticos;

- A segurança dos nanoingredientes para o consumidor depende da exposição destes através da pele, inalação e ingestão. Os métodos atualmente utilizados para a avaliação da exposição devem ser adaptados às nanotecnologias,

utilizando técnicas de estudo que considerem, além da exposição sistêmica, a penetração através da pele, a inalação e deposição pulmonar e a absorção/translocação intestinal.

A fim de poder caracterizar nanomateriais e avaliar a qualidade de produtos que os contenham, um projeto da ABDI, no âmbito da Agenda Tecnológica Setorial (ATS) de Cosméticos, desenvolvido em parceria com ITEHPEC/ABIHPEC e INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia) desenvolverá, para nanomateriais, métodos de caracterização padronizados com metodologias de análise de execução rápida, a custo controlado e que atendam aos requerimentos regulatórios. Uma vez padronizada, esta tecnologia será difundida com o apoio de laboratórios de referência para os fabricantes de insumos e cosméticos, permitindo a caracterização, reprodutibilidade e rastreabilidade; além da certificação de laboratórios de referência.

O Japão compartilha a opinião de outras Agências como a Americana (FDA) ou da Comissão da Comunidade Europeia de que a legislação existente é adequada para avaliar os riscos da maioria dos nanomateriais. No Reino Unido, a British Standards Institution (BSI) tem um comitê sobre Nanotecnologias (NTI/1), que analisa o trabalho da ISO TC229 e de outras comissões competentes. NTI/1 também desenvolveu uma série de documentos nacionais, que podem ser vistos e baixados de seu site. Na Alemanha, o *Deutsches Institut für Normung* e. V. (DIN) também tem uma comissão sobre Nanotecnologias (NA 062-08-17 AA) que analisa o trabalho da ISO TC229 e de outras comissões competentes como o CEN TC 352 (NIA, 2013).

Diante dos fatos citados acima, observa-se que a questão da regulação da nanotecnologia está sendo fruto de grandes discussões, debates e comitês, e mesmo com alguns países sem legislação específica, estes vem comercializando diversos produtos com nanotecnologia sem ter uma comprovação da segurança, desempenho/eficácia e da própria característica do produto. Na Cartilha da ABDI (2011) “Nanotecnologias: subsídios para a problemática dos riscos e regulação” é relatado que a comercialização de produtos contendo nanotecnologias é avaliada pela legislação vigente de cosméticos convencionais, o que tem causado grandes discussões em vários segmentos da sociedade, comunidade científica, organismos não-governamentais e mesmo nas empresas com produtos comerciais em fase de

elaboração, finalização ou pré-comercialização, ressaltando a necessidade de legislação específica para os produtos e insumos nanotecnológicos.

3.3.2 Produtos e Insumos cosméticos contendo nanotecnologia: panorama nacional e mundial

É muito difícil saber exatamente quantos produtos obtidos por nanotecnologia ou que contêm nanotecnologia são comercializados atualmente no Brasil e no mundo. Entretanto, é possível acompanhar atualmente um grande aumento dos registros e lançamentos de novos produtos cosméticos, e conseqüentemente o acesso crescente de diversos produtos à população. Isso demonstra que esta nova tecnologia representa potencialmente um enorme mercado mundial.

Os países que mais investem em nanotecnologia são os Estados Unidos da América, Europa e Japão, e os países como a Rússia, China, Índia e Brasil têm feito investimentos significativos no setor nos últimos anos (ROSSI-BERGMANN, 2008; ZANETTI E CRECZYNSKI-PASA, 2008). Segundo um estudo realizado por SANT'ANNA e colaboradores (2013) o Brasil tem demonstrado um grande potencial para o desenvolvimento nanotecnológico, entretanto avaliando o número de patentes registradas no Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI) em relação a outros países ainda não é expressivo. Dessa forma, o Brasil caracteriza-se como um país em estágio intermediário de desenvolvimento tecnológico, mesmo com a ampliação significativa do investimento em atividades de Ciência e Tecnologia (C&T) nos últimos anos.

O Projeto PEN (*The Project on Emerging Nanotechnologies*) da Woodrow Wilson (EUA) vem relatando desde 2005 informações voluntárias dos fabricantes em seu banco de dados, onde são registradas algumas informações dos produtos comercializados pelas indústrias que se cadastram no PEN: empresa fabricante ou fornecedor; país de origem; categoria e subcategoria; imagem do produto; descrição do produto; hiperlink a página do produto e data de atualização (PEN, 2013). A partir desses dados é realizada uma estatística do crescimento do número de produtos no determinado período, que embora seja subjetiva, é observado no mercado um crescimento da disponibilização de produtos de base nanotecnológica.

Apenas um inventário desses produtos com dados dos anos de 2005 até 2011 foi divulgado pelo PEN. A Figura 2, apresenta uma adaptação do inventário divulgado pelo PEN, onde apresenta uma regressão linear dos produtos registrados em seu banco de dados.

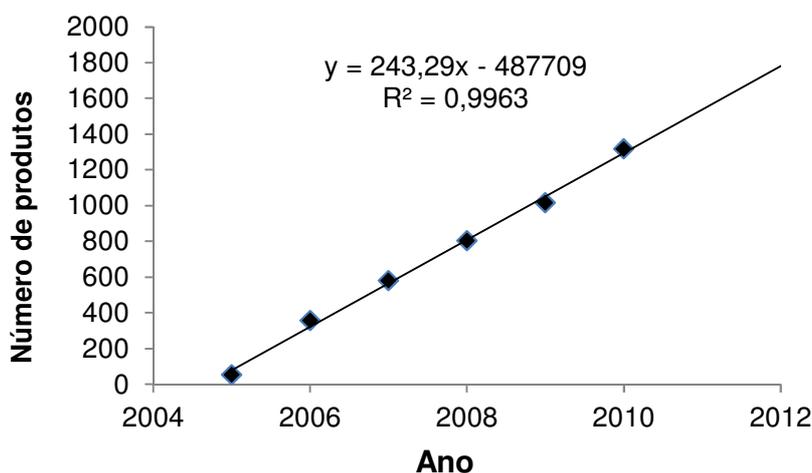


Figura 2: Crescimento do número de produtos de base nanotecnológica no mercado mundial entre março de 2005 e março de 2011. (Adaptado de <http://www.nanotechproject.org/inventories>).

A Figura 2 mostra uma regressão linear entre os anos, com coeficiente de determinação próximo a 1, caracterizando uma tendência de mercado com aumento na comercialização de produtos contendo algum tipo de nanotecnologia. O Projeto PEN relata que os produtos foram agrupados de acordo com as categorias mais relevantes, baseado nas informações disponibilizadas pelas empresas. Segundo PEN a categoria com maior número de produtos foi a de Saúde e *Fitness*, com um total de 738 produtos.

A categoria Saúde e *Fitness* foi ainda, dividida em sub-categorias, conforme Figura 3, a qual mostra que os produtos com nanotecnologia mais comercializados são de cuidados pessoais e cosméticos.

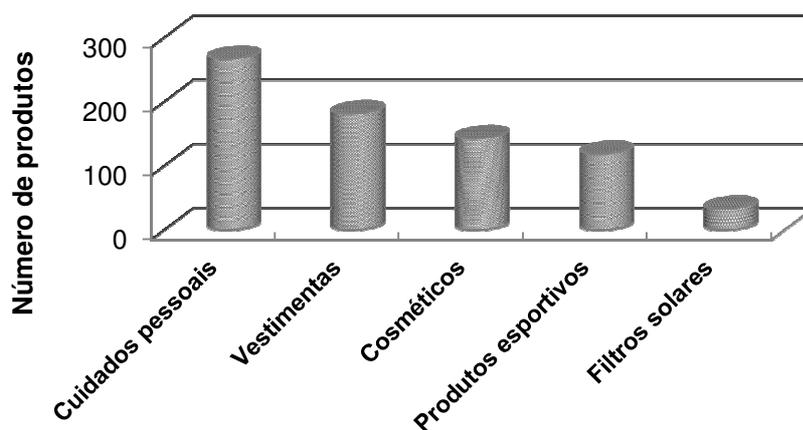


Figura 3: Número de produtos de base nanotecnológica comercializados para área de Saúde e *fitness* (dados entre março de 2005 e março de 2011) (Adaptado de <http://www.nanotechproject.org/inventories>).

O Brasil ainda não possui uma base de dados sistematizados sobre o mercado de produtos, processos e serviços nanotecnológicos oferecidos pelas empresas no País, entretanto o MCT divulgou em 2007 uma relação de produtos (matérias-primas/insumos e produtos acabados) de nanotecnologia desenvolvidos por empresas brasileiras em diversos segmentos como a Braskem; Nanocore; Faber Castell; Embrapa; Nanox Tecnologia S.A., O Boticário (ADBI, 2010); Chemyunion (ABDI, 2008). Por outro lado, a ABIHPEC divulgou no Panorama do Setor de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos (HPPC) no ano de 2006, que identificou no País 22 empresas, sendo que destas, nenhuma é produtora exclusiva de nanocosméticos e que 15 delas fabricam o produto e 7 os obtêm por importação. Nas publicações do ano de 2010 da ABIHPEC no documento: Panorama do setor de HPPC e no II Caderno de Tendências, não há uma relação de produtos contendo nanotecnologia no Brasil, entretanto é relatado que há um aumento no número de patentes para produtos de base nanotecnológica e que esta vem sendo explorada no mercado nacional através da comercialização de uma grande variedade de produtos.

De acordo com o relatório divulgado em 2006 dos “Friend of The Earth, Nanomaterials, Sunscreens and Cosmetics: Small Ingredients, Big Risks”, as nanopartículas estão presentes em diversos produtos cosméticos e que dentre as empresas fabricantes estão a L’Oréal com fabricação de lipossomas (em 1995),

Procter & Gamble, Shiseido, Chanel, Revlon, Dermazone solutions, dentre outras (FRONZA, 2006; ABDI, 2009). No Brasil, empresas como Natura e O Boticário desenvolvem projetos na área de Nanotecnologia em parceria com o Ministério da Ciência e Tecnologia e já comercializam cosméticos contendo estas estruturas (FRONZA, 2006), sendo que dentre elas encontram-se nanopartículas de diversas variedades (niossomos, lipossomos, nanopartículas lipídicas, nanocristais, nanoemulsões, etc.) que, como sistema de distribuição de ativos tem sido utilizado com grande interesse pela indústria cosmética (MU e SPRANDO, 2010).

Em novas pesquisas realizadas em sites da *internet*, encontrou-se nos sites de indústrias e distribuidoras de cosméticos e dermocosméticos, e através do Caderno Panorama Nanotecnologia (ADBI, 2010) indústrias que incorporam nanotecnologia em seus produtos. São exemplos de indústrias que possuem produtos cosméticos contendo nanotecnologia no Brasil: Viemed; Dermage; Armazén Botânico; Rishon Cosméticos; BioCode Cosméticos; Essência DiFiori Cosméticos; Pharmapele; Videlli Cosméticos; Acquis Cosmética; Vita Derme Hipoalergênica; Botanik Kostetics; Maquel; Phytotratha; Kolt; Go.Business; Biomátika; De Sírius; Neez; Kosmoscience; O Boticário; Dailus Pró; NK Cosméticos; Leviale; Avon; Natura; Biolab (em parceria com a UFRGS); BioPowerLine`s; etc. A variedade de produtos fabricados está entre xampus, condicionadores, máscaras capilares, finalizadores capilares, antirrugas, anticelulíticos, esmaltes, bloqueador solar; hidratantes corporais e faciais, maquiagens, dentre outros.

No Brasil também há empresas fabricantes de insumos nanoestruturados para cosméticos e medicamentos. Dentre elas cita-se a indústria Inventiva localizada em Porto Alegre, RS, a qual fabrica insumos nanotecnológicos para cosméticos no país e inovou com a produção de nanopartículas lipofílicas contendo óleos vegetais provenientes do estado do RS. Outras empresas como Chemyunion; a Nanovetores e a Infnitec também produzem insumos para cosmético contendo nanopartículas.

3.3.3 Aplicação das nanopartículas lipofílicas em cosméticos

De forma crescente, os produtos cosméticos e dermocosméticos tem sido fabricados com algum tipo de tecnologia. A aplicação dermatológica de produtos nanotecnológicos apresenta diversas vantagens como a capacidade de proteção a

compostos lábeis contra a degradação fotoquímica (OURIQUE et al., 2011), a possibilidade de controlar a liberação de fármacos (CONTRI et al., 2010), a atuação como agentes oclusivos (WISSING e MÜLLER, 2003), a potencial ação com bloqueadores das radiações UV (ALMEIDA et al., 2009), a melhora da eficácia dermatológica (FONTANA et al., 2011), a redução da irritação dérmica (LIU et al., 2007), um baixo potencial alergênico (PAESE et al., 2009) e como sistemas de depósito no folículo piloso (LADEMANN et al., 2007).

A partir da década de 90, verificou-se um crescimento no número de publicações referentes ao uso de nanomateriais no desenvolvimento de produtos cutâneos. A empresa francesa L'Oreal foi a pioneira a lançar, em 1995, produtos cosméticos contendo nanoestruturas, hoje chamados de nanocosméticos. Nanocosméticos por definição são formulações cosméticas que contém e conduzem ativos ou outros ingredientes nanoestruturados que atuarão de forma controlada, podendo modular a liberação do ativo em camadas mais profundas da pele, tornando-o mais efetivo que os produtos convencionais (POLETTTO et al., 2008).

Sistemas nanoestruturados, tais como lipossomas, nanoemulsões, nanopartículas lipídicas (sólidas e carreadores lipídicos) e nanopartículas poliméricas (nanocápsulas e nanoesferas) são propostos como carreadores para a liberação de ativos cosméticos na pele, visa modificar e controlar os perfis de liberação, permeação e oclusão (MÜLLER, 2002; JIMÉNEZ et al., 2004). Na área cosmética, geralmente, as nanopartículas apresentam diâmetros compreendidos entre 100 e 600 nm, podendo variar tanto para cima quanto para baixo desses diâmetros, dependendo do tipo de nanoestrutura utilizada (MÜLLER et al., 2002; JIMÉNEZ et al., 2004).

As nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) e os carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) têm sido profundamente estudados como sistemas carreadores de substâncias. As NLS e os CLN são nanoestruturas preparadas com lipídeos biodegradáveis e biocompatíveis (TEERANACHAIDEEKUL et al., 2008). As NLS foram desenvolvidas no início da década de 90 como um sistema alternativo para nanoemulsões, lipossomas e nanopartículas poliméricas, formadas por uma matriz lipídica, através da combinação de lipídeos sólidos tanto a temperatura ambiente quanto à temperatura corporal. As NLS são compostas de 0,1 a 30% de lipídeos sólidos dispersos em uma solução aquosa, estabilizada com 0,5 a 5% de

tensoativo (MÜLLER et al., 2004; VILLAFUERTE et al., 2008; PARDEIKE et al., 2009).

Os CLN são considerados como a segunda geração de nanopartículas lipídicas, sendo produzidos a partir de uma mistura de lipídeos sólidos e lipídeos líquidos (óleos). A partícula lipídica resultante apresenta ponto de fusão inferior a dos lipídeos sólidos. Os CLN foram desenvolvidos para solucionar possíveis limitações associadas às NLS, pois os CLN apresentam uma maior capacidade de incorporação de compostos ativos, além de eliminar ou minimizar eventuais expulsões de compostos ativos durante o armazenamento. Dessa forma, os CLN foram desenvolvidos com o objetivo de aumentar a quantidade de substância ativa associada às nanoestruturas e evitar sua segregação durante o armazenamento (MEHNERT E MÄDER, 2001).

Os CLN possuem 3 modelos de estruturas: imperfeito, amorfo e múltiplo (MÜLLER et al., 2002; PARDEIKE et al., 2009). As diferenças entre elas residem na produção de blendas de lipídeos diferentes, os lipídeos líquidos e os lipídeos sólidos. Essa blenda é formada por diferentes comprimentos de cadeia de ácidos graxos e a mistura de mono-, di-, e triglicerídeos que não é capaz de formar uma estrutura altamente ordenada, apresentando como resultados muitas imperfeições na partícula, o que favorece a melhor acomodação do fármaco nessas imperfeições (WISSING E MÜLLER, 2003; MÜLLER et al., 2004).

Os CLN imperfeitos são produzidos com uma mistura de glicerídeos compostos por diferentes ácidos graxos, o que gera um aumento na distância entre as cadeias de ácidos graxos levando a imperfeições no cristal. Os CLN amorfos são produzidos com uma mistura de lipídeos sólidos com lipídeos líquidos como triglicerídeo cáprico/caprílico. A alta quantidade de óleo misturado com o lipídio sólido gera partículas em um estado amorfo, evitando assim a expulsão do ativo das partículas durante a armazenagem, já que o processo de cristalização do lipídeo para a forma β não ocorre nessas condições. OS CLN múltiplos é formado por uma dispersão de óleo em lipídeo sólido em água. Nesta estrutura, a quantidade das moléculas de óleo no lipídio sólido é exercida levando a uma separação de fase e formação de nanocompartimentos de óleo dentro da matriz lipídica sólida (MÜLLER et al., 2007).

Alguns cosméticos comercializados atualmente já possuem nanopartículas lipídicas em sua composição, visa melhorar as características de hidratação cutânea. Isto é possível porque as nanopartículas lipídicas formam um filme oclusivo que dificulta a perda transepidermal de água, aumentando a quantidade da mesma nas camadas viáveis da pele. A oclusão mais eficiente é atingida utilizando lipídeos com baixo ponto de fusão, partículas altamente cristalinas e de tamanho extremamente reduzido (WISSING; MÜLLER, 2003; PARDEIKE et al., 2009).

WISSING E MÜLLER (2003) estudaram após 28 dias de tratamento o aumento da hidratação da pele *in vivo*, comparando a utilização de cremes contendo NLS, com cremes (óleo em água) sem as nanopartículas. O creme contendo as NLS apresentou maior hidratação do que o creme sem as nanopartículas, sendo que este efeito foi explicado pela formação do filme na superfície cutânea a partir das NLS. As forças capilares dos poros nanométricos entre as NLS podem promover a fusão das partículas formando um denso filme sobre a pele. Esse estudo demonstra o efeito oclusivo de nanopartículas lipídicas e o eficiente uso desse carreador em cremes cosméticos com o intuito de aumentar a hidratação da pele.

LIU e colaboradores (2007) investigaram o uso de NLS no encapsulamento de isotretinoína, que é um ativo utilizado no tratamento de acne. Os autores observaram que o ativo encapsulado evitou a absorção sistêmica, aumentando o tempo de residência do ativo na pele, demonstrando que as NLS são promissores carreadores em aplicações tópicas.

3.3.4 Nanopartículas lipofílicas contendo vitamina C

O insumo nanoestruturado utilizado neste trabalho (NanoVit C) é composto de nanopartículas lipídicas que encapsulam a vitamina C na forma de tetraisopalmitato de ascorbila (INVENTIVA, 2010).

A vitamina C ou ácido ascórbico é uma vitamina muito utilizada em produtos tópicos para a pele, pois, permite alcançar níveis da vitamina que não seriam possíveis através da ingestão diária desta por meio da alimentação. Em cosméticos é indicada como antienvhecimento e clareador da pele (AUSTRIA et al., 1997), pois desempenha um papel muito importante na melanogênese inibindo a produção de melanina, reduzindo oquinonas e, assim, evitando a formação de melanina por

ação da tirosinase até que todo ácido ascórbico esteja oxidado (DALCIN et al., 2003). Contudo, seu uso em produtos acabados é limitado por sua alta instabilidade química podendo apresentar eficácia bastante reduzida quando em condições aeróbicas (AUSTRIA et al., 1997), em exposição à luz (AUSTRIA et al., 1997), em altas temperaturas de armazenagem (AUSTRIA et al., 1997; GALLARATE et al., 1999) e em valores elevados de pH (AUSTRIA et al., 1997; GALLARATE et al., 1999).

A fim de melhorar a estabilidade do ácido ascórbico quando veiculados em cosméticos, derivados lipofílicos e hidrofílicos da vitamina C originados pela modificação química deste, por esterificação do grupo hidroxila, com ácido orgânico de cadeia longa (na posição 6), ou pela introdução de um grupamento fosfórico (na posição 2), envolvendo o sistema enediol têm sido amplamente empregados (AUSTRIA et al., 1997; ŠPICLIN et al., 2001; ŠPICLIN et al., 2003). Exemplos desses derivados são: o palmitato de ascorbila, o ascorbilfosfato de magnésio e de sódio, palmitato de ascorbila e tetraisopalmitato de ascorbila.

Assim, a vitamina C, em sua forma lipossolúvel é amplamente utilizada em cosméticos, pois apresenta além das mesmas propriedades que o ácido ascórbico (NIKKOL, 2002), boa absorção pela pele, onde atua estimulando a renovação celular e aumentando a hidratação cutânea nas camadas mais profundas da epiderme. Além disso, devido principalmente às suas ações antioxidantes, a vitamina C aplicada topicamente pode retardar significativamente os danos causados pelos raios UVA à pele, agindo como um fotoprotetor biológico (ALMEIDA, 2008).

O tetraisopalmitato de ascorbila quando aplicado sobre a pele, ao ser absorvido, será clivado por ação enzimática originando o ácido ascórbico livre. Além disso, essa molécula possui melhor estabilidade, em pHs entre 4 e 6, e frente ao calor, podendo ser aquecida até 80 °C. Possui aspecto incolor a amarelo claro (NIKKOL, 2002).

Segundo a empresa fabricante, o Nanovit C[®] é uma suspensão de carreadores lipídicos nanoestruturados contendo vitamina C na forma de tetraisopalmitato de ascorbila. Apresenta característica levemente ácida, de coloração branca e aspecto leitoso, com tamanho de partícula em torno de 140 nm, sendo indicado para a incorporação em diversos tipos de bases cosméticas com ação hidratante, clareadora e antienvelhecimento. Além disso, devido a

característica manométrica do insumo, este proporciona ao produto final uma hidratação superior de longa duração, com sensorial sedoso e agradável, sem residual graxo. Não obstante, proporciona maior estabilidade á vitamina C (INVENTIVA, 2010).

4. Materiais e Métodos

4.1 Materiais

4.1.1 Matérias-primas

- NanoVit C (Inventiva, Porto Alegre – RS, Brasil);
- Carbopol Ultrez 10 NF (Deg, São Paulo – SP, Brasil);
- Imidazolidinil uréia (Delaware, Porto Alegre – RS, Brasil);
- Trietanolamina (Delaware, Porto Alegre – RS, Brasil);
- Propilenoglicol (Delaware, Porto Alegre – RS, Brasil);
- Tretinoína (PharmaNostra, São Paulo – SP, Brasil);
- Metilparabeno (Delaware, Porto Alegre – RS, Brasil);
- Propilparabeno (Delaware, Porto Alegre – RS, Brasil);
- Monoestearato de glicerila (Delaware, Porto Alegre – RS, Brasil);
- Miristato de isopropila (Delaware, Porto Alegre – RS, Brasil);
- Ácido esteárico (Delaware, Porto Alegre – RS, Brasil);
- Óleo de amêndoas doces (Delaware, Porto Alegre – RS, Brasil);
- Vaselina líquida (Delaware, Porto Alegre – RS, Brasil);
- Polietilenoglicol 400 (Delaware, Porto Alegre – RS, Brasil);
- Polissorbato 80 (Henrifarma, São Paulo – SP, Brasil).

4.1.3 Solventes e outros materiais

- Água Milli-Q (Destilador/deionizador Milli-Q - Millipore, Billeria – MA, EUA);
- Acetonitrila grau CLAE (Tédia Brazil, Rio de Janeiro – RJ, Brasil);
- Ácido acético glacial p.a (LabSynth, Diadema – SP, Brasil);
- Álcool etílico absoluto p.a (Nuclear, Diadema – SP, Brasil);
- Membranas de polivideno HVLP 0,45 µm (Millipore, Billeria – MA, EUA);
- Algodão hidrofílico (Cremer, Blumenau – SC, Brasil);
- Fita adesiva 3M (Durex, Sumaré – SP, Brasil);
- Membrana de diálise de celulose - M.W = 12,400 kDa - (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA);
- Tubos de ensaio falcon (TPP, Switzerland, Suíça);
- Metanol grau CLAE (Tédia Brazil, Rio de Janeiro – RJ, Brasil);

- Cloreto de sódio (Nuclear, Diadema – SP, Brasil);
- Fosfato de potássio (KH₂PO₄) (Nuclear, Diadema – SP, Brasil);
- Lâminas de bisturi número 24 (Feather, Osaka, Japão);
- Bisturi número 4 (Feather, Osaka, Japão);
- Grids de cobre com revestimento carbono-formvarm (Electron Microscopy Science, Hatfield – PA, EUA)

4.1.4 Aparelhos e Equipamentos

- Balança analítica modelo APX-200 (Denver Instrument, Bohemia – NY, EUA);
- Centrífuga modelo 5417R (Eppendorff, São Paulo – SP, Brasil);
- Zetasizer[®], zetasizer nanoseries, modelo ZEN 3600 (Malvern instruments, Southborough - MA, EUA):
 - Correlator Série 7032 Multi-8;
- Ultrassom - 1400A Ultracleaner, (Unique, Indaiatuba - SP, Brasil);
- Potenciômetro B474 (Micronal) e Ultra-Basic (Denver Instrument, Bohemia – NY, EUA);
- Nanosight[®] LM10 (NanoSight, Salisburg, Reino Unido)
- Martersizer 2000[®] (Malvern - Worcestershire, Reino Unido)
- Turbiscan[®] LAb (Formulaction, França):
 - Software: TLab EXPERT 1.13;
- Viscosímetro LV-DV-II+Pro (Brookfield Engineering Laboratories, Middleboro – MA, EUA):
 - Spindle SC4-25 e ULA
 - Software: Rheocalc[®];
- Microscópio eletrônico de transmissão JEM-1200 ExII (Jeol, Tóquio, Japão);
- Célula de difusão de *Franz* Automatizada (Célula de *Franz* Microette Plus-Hanson Research[®] - Chatsworth, EUA);
- Medidor de espessura (Mitutoyo, Kanagawa, China);
- Pele de abdômen de porcas (Abatedouro Araldi, Nova Roma do Sul – Brasil)
- Mixer (Britânia, Joinvile – SC, Brasil)
- Vórtex (Certomat MV, B. Braun Biotech)
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) (Shimazu[®] - Tóquio, Japão):

- Auto-injetor (LC-20A prominence)
- Detector UV-Vis
- Bomba S-200
- Software: Lab Solutions®;
- Coluna RP-18 (5 µm, 150 mm x 4,60 mm), (Phenomenex, Torrance –CA, EUA);
- Pré-coluna (Phenomenex, Torrance –CA, EUA);

4.2 Métodos

4.2.1 Produção das bases semissólidas e incorporação dos ativos

Foram preparados emulsões (cremes) não-iônicos e géis aniônicos, conforme descrição a seguir. Todas as formulações foram preparadas em triplicata e mantidas sob proteção da luz e calor até o momento da sua caracterização e/ou avaliação *in vitro*.

4.2.1.1 Produção das formulações de emulsões

Inicialmente foi produzido um creme branco (sem ativo), não-iônico, dividido em quatro porções, às quais foram adicionadas (ou não) de tretinoína e/ou insumo nanoestruturado sendo denominados:

- Creme base: **CB**
- Creme contendo insumo nanoestruturado: **CN**
- Creme contendo tretinoína: **CT**
- Creme contendo tretinoína e insumo nanoestruturado: **CTN**

Tabela 1 apresenta a composição quali-quantitativa das quatro formulações de creme.

Tabela 1: Composição quali-quantitativa das formulações de creme

Componentes	CB	CN	CT	CTN
Ácido esteárico *	4g	4g	4g	4g
Monoestearato de Glicerila*	6 g	6 g	6 g	6 g
Miristato de Isopropila*	2 g	2 g	2 g	2 g
Vaselina Líquida*	1 g	1 g	1 g	1 g
Óleo de Amêndoas*	0,5 g	0,5 g	0,5 g	0,5 g
Propilparabeno*	0,2 g	0,2 g	0,2 g	0,2 g
Metilparabeno**	0,1 g	0,1 g	0,1 g	0,1 g
Propilenogicol**	3 g	3 g	3 g	3 g
Trietanolamina**	0,2 g	0,2 g	0,2 g	0,2 g
Água Milli-Q**	qsp 100 g	qsp 100 g	qsp 100 g	qsp 100 g
TTN	----	----	0,05 %	0,05 %
Insumo Nanoestruturado	----	5 %	----	5 %

* Fase oleosa; ** Fase aquosa. TTN = tretinoína.

O creme base (CB) foi preparado através de um sistema emulsionado pela técnica de sabão nascente (PRISTA et al., 1995) contendo ácido esteárico e trietanolamina para obtenção de uma emulsão de estearato de trietanolamina. A emulsão foi preparada aquecendo-se a fase oleosa a 70 °C e a fase aquosa a uma temperatura próxima a 75 °C. Em seguida a fase aquosa foi vertida sobre a oleosa sob constante agitação, com o auxílio de um pistilo e gral de porcelana, até que a consistência típica de emulsão fosse obtida à temperatura de aproximadamente 30 °C.

Após a preparação do creme base uma porção foi mantida para caracterização e outra porção para adição dos ativos. A preparação da formulação semissólida CN (creme contendo insumo nanoestruturado) foi preparada pela simples adição e mistura do insumo nanoestruturado na concentração de 5% (p/p) ao creme branco, devido à facilidade de incorporação do produto. Para obtenção do

creme contendo tretinoína (CT), reduziu-se a tretinoína a um pó fino em gral de vidro e então se acrescentou a emulsão aos poucos, homogeneizando-se por aproximadamente 10 minutos até obter uma formulação homogênea. Para a preparação do creme com tretinoína e insumo nanoestruturado (CTN) a tretinoína foi triturada, assim como para a formulação CT, e após adicionou-se o insumo nanoestruturado seguido de homogeneização.

4.2.1.2 Produção das formulações de gel

Inicialmente foi produzido o gel aniônico branco (sem ativo). Este foi dividido em quatro porções às quais foram adicionadas (ou não) tretinoína e/ou insumo nanoestruturado e denominadas:

- Gel base: **GB**
- Gel contendo insumo nanoestruturado: **GN**
- Gel contendo tretinoína: **GT**
- Gel contendo tretinoína e insumo nanoestruturado: **GTN**

A Tabela 2 apresenta a composição quali-quantitativa das quatro formulações de gel.

Tabela 2: Composição quali-quantitativa das formulações de gel

Componentes	GB	GN	GT	GTN
Carbopol Ultrez [®]	0,5 g	0,5 g	0,5 g	0,5 g
Imidazolidinil uréia	0,6 g	0,6 g	0,6 g	0,6 g
Trietanolamina	0,12 g	0,12 g	0,12 g	0,12 g
Água Milli-Q	qsp 100 g	qsp 100 g	qsp 100 g	qsp 100 g
Propilenoglicol	3%	3%	3%	3%
Insumo nanoestruturado	----	5%	----	5%
Tretinoína	----	----	0,05%	0,05%

TTN = tretinoína; IN = insumo nanoestruturado.

O gel foi preparado através da dispersão do carbômero em água Milli-Q. Para tanto, deixou-se o polímero em contato com a água até a sua total dispersão. Após misturou-se com o auxílio de um mixer até a formação de uma dispersão gelatinosa e então adicionou-se o conservante com posterior homogeneização. A dispersão foi neutralizada com 120 µL de trietanolamina para formação da rede polimérica em pH próximo a 6,0.

Para a incorporação da tretinoína no gel base, reduziu-se a tretinoína a um pó fino em gral de vidro e acrescentou-se propilenoglicol, na mesma proporção utilizada no creme (3%). Homogeneizou-se por alguns minutos com auxílio de um pistilo e aos poucos acrescentou-se o gel base, obtendo a formulação GT. Para a formulação GTN após a incorporação da tretinoína adicionou-se o insumo nanoestruturado.

Para fins de comparação nas diversas análises de caracterização e estudos de permeação acrescentou-se propilenoglicol aos géis que não continham tretinoína (GB e GN) na mesma proporção (3%). Na preparação do GN acrescentou-se primeiramente o propilenoglicol e após o insumo nanoestruturado.

4.2.2 Caracterização físico-química

A caracterização físico-química foi realizada para o insumo nanoestruturado (Nanovit C) e para as bases dermatológicas contendo os ativos tretinoína e o insumo nanoestruturado.

O produto comercial Nanovit C, denominado como insumo nanoestruturado neste trabalho, é uma suspensão de carreadores lipídicos nanoestruturados contendo vitamina C na forma de tetraisopalmitato de ascorbila e foi adquirido da indústria Inventiva, situada em Porto Alegre, RS, Brasil. Três lotes do produto foram adquiridos para contemplar as análises.

4.2.2.1 Características organolépticas

As avaliações das características físicas de aspecto e coloração foram realizadas após transferir a amostra do frasco original para copo graduado transparente. As análises foram realizadas visualmente sob iluminação natural para a identificação da cor, presença ou ausência de precipitados ou separação de fases

(heterogeneidade/homogeneidade). As análises foram realizadas em triplicata de lote.

Os resultados obtidos para o insumo nanoestruturado e formulações semissólidas foram comparados com certificado de análise do fornecedor e/ou apoio bibliográfico científico para fim de comparações.

4.2.2.2 Determinação do pH

A determinação dos valores de pH foram realizadas por técnica de potenciometria (Ultrabasic, Denver Instrument – NY) em triplicata de lote.

A determinação do pH das amostras do insumo nanoestruturado foram realizadas sem diluição da amostra. As formulações semissólidas foram previamente diluídas em água Milli Q na proporção de 1:10 (p/v). Os resultados foram obtidos através da média das determinações do pH apresentando-se o desvio-padrão entre elas.

4.2.2.3 Determinação do potencial zeta (ξ)

O potencial zeta foi determinado, apenas para as amostras contendo insumo nanoestruturado, através de mobilidade eletroforética (Zetasizer[®] nano-ZS modelo ZEN 3600 - Malvern, EUA) em triplicata de lote. As amostras foram previamente diluídas 500 vezes, v/v, em solução de NaCl 10 mM (filtrada em filtro 0,45 μ m, Millipore Millex-HP). O resultado foi obtido através da média das determinações apresentando-se o valor médio com o desvio-padrão.

4.2.2.4 Determinação do diâmetro médio de partícula e distribuição granulométrica

Para determinação do diâmetro médio e distribuição granulométrica do insumo nanoestruturado e das formulações semissólidas contendo insumo nanoestruturado foram utilizadas as seguintes técnicas: análise por difratometria de laser (Mastersizer[®] 2000 - Malvern); análise por espalhamento múltiplo de luz

(Zetasizer - Nano-ZS) e Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) (NanoSight - LM10, V. 2.3). As análises por NTA foram realizadas apenas para o insumo nanoestruturado.

Os resultados foram obtidos pela análise em triplicata de lote e apresentados seus valores de diâmetro com o respectivo desvio-padrão.

4.2.2.4.1 Análise por difratometria de laser

Para a determinação do diâmetro médio e distribuição do tamanho de partícula das amostras, por difratometria de laser (Mastersizer[®] 2000 – Malvern) utilizou-se como parâmetro o índice de refração disponibilizado pela empresa fabricante do insumo nanoestruturado, equivalente a 1,456 e um espectro de leitura compreendido entre 0,02 – 2000 µm. O diâmetro médio baseado no volume (D[4,3]) foi utilizado como parâmetro para a distribuição de tamanho das nanopartículas da amostra. Medidas do diâmetro de partículas correspondentes a 10 %, 50 % e 90 % da distribuição acumulada (d0,1, d0,5 e d0,9, respectivamente) também foram realizadas. Por meio dessas medidas foi realizada a determinação do *span*, definido como uma medida da dispersão granulométrica, a qual relaciona os valores encontrados do diâmetro das partículas correspondentes a 10 %, 50 % e 90 % da distribuição acumulada para uma amostra, sendo calculado através da (Equação 1 (CHEN E DAVIS, 2002)).

Para a realização da análise do insumo nanoestruturado, as amostras foram transferidas, sem diluição prévia, para o compartimento dispersor do equipamento, contendo água destilada. Já as formulações semissólidas foram previamente dispersadas em água destilada com auxílio de vórtex. Essas foram previamente filtradas em filtro de porosidade 1,2 µm (Millipore Millex-HP) para eliminação de partículas de tamanho superior que poderiam interferir na análise. As análises foram conduzidas à temperatura ambiente em triplicata de lote.

A distribuição do tamanho de partícula foi analisada com base na concentração numérica e volumétrica de partículas da amostra e os resultados expressos em nanômetros ou micrômetros com o respectivo desvio-padrão.

(Equação 1)

$$Span = \frac{d_{0,9} - d_{0,1}}{d_{0,5}}$$

4.2.2.4.2 Análise por espalhamento de luz dinâmico

As análises foram conduzidas através da técnica de espalhamento de luz dinâmico (Zetasizer Nano ZS, modelo ZEN 3600 - Malvern Instruments). Para esta análise o insumo nanoestruturado foi diluído 500 vezes, v/v, em água Milli-Q, filtrado em filtro 0,45 µm (Millipore Millex-HP). As formulações semissólidas foram diluídas 2.000 vezes (p/v) em água Milli-Q previamente filtrada em filtro 0,45 µm (Millipore Millex-HP) e, então, levadas à agitação em vórtex para a completa dispersão. Posteriormente, essas amostras foram centrifugadas a 2.500 x g por 15 minutos e então filtradas em filtro 1,2 µm (Millipore Millex-HP) para eliminar partículas de tamanho superior que poderiam interferir na análise. Depois de preparadas, as amostras foram colocadas em cubetas e analisadas em triplicata.

Através desta técnica foram determinados os diâmetros médios e índices de polidispersão (PDI) das partículas das amostras. Os resultados dos diâmetros médios obtidos foram analisados por número e volume, sendo expressos através da média das determinações com o desvio-padrão dos três lotes.

4.2.2.4.3 Análise por rastreador de partículas a laser

Para a determinação da distribuição de tamanho de partículas e contagem de partículas, dos lotes de insumo nanoestruturado, foram conduzidas análises por NTA (NanoSight[®] LM10, v 2.3). As amostras foram previamente diluídas 20.000 vezes (v/v) em água Milli-Q (filtrada em filtro 0,45 µm, Millipore Millex-HP). O resultado foi obtido através da média da triplicata de análise com o desvio padrão correspondente por número de partículas em solução.

4.2.2.5 Avaliação morfológica

As amostras foram analisadas morfológicamente por microscopia eletrônica de transmissão (MET, JEM 1200 ExII, operando a 120 kV, Centro de Microscopia Eletrônica, UFRGS, Brasil).

As formulações semissólidas contendo insumo nanoestruturado foram previamente diluídas 50 vezes (p/v) em água Milli-Q e a amostra do insumo

nanoestruturado diluída 10 vezes (v/v). Depois de realizadas as diluições, a amostra foi colocada em *grid*, de aproximadamente 200 mesh composto de cobre e revestido com filme de absorção de elétrons de Formvar-Carbono (Electron Microscopy Sciences). Após a adição das amostras, os grids foram deixados em repouso por cerca de 3 minutos e o excesso foi retirado com papel filtro. Em seguida, foi adicionada uma solução de acetato de uranila a 2 % (m/v), previamente filtrada em filtro 0,45 µm, para que pudesse carregar negativamente a amostra. Após, o excesso do agente de contraste foi retirado com papel filtro. As amostras foram armazenadas por 24 horas em dessecador, e então, submetidas à análise. As magnitudes utilizadas para as análises microscópicas foram de 50.000, 100.000 e 200.000 vezes.

4.2.2.6 Comportamento Reológico

As determinações das viscosidades e dos comportamentos reológicos do insumo nanoestruturado e das formulações semissólidas foram realizadas através de viscosímetro rotacional de Brookfield, modelo LV-DV-II+Pro.

Para o insumo nanoestruturado as análises foram conduzidas utilizando-se *spindle* ULA, com 10 velocidades. Para as formulações semissólidas utilizou-se *spindle* SC4-25, sendo 10 velocidades para análise das formulações de gel e 17 velocidades para as formulações de creme. Todas as análises foram conduzidas com controle de temperatura ($25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$) através do acoplamento de um banho termostaticado ao viscosímetro. A escolha da velocidade de rotação dos *spindles* foi realizada através de testes preliminares considerando torque superior a 10 e inferior a 100%. A construção dos reogramas foi realizada através da representação gráfica da taxa de cisalhamento, em função da tensão de cisalhamento média das determinações dos três lotes. Para a construção dos reogramas utilizou-se o software Rheocalc (versão 3.1-1, Brookfield, EUA). O resultado da viscosidade foi expresso em cP com o respectivo desvio-padrão relacionado com os 3 lotes analisados.

A escolha do modelo matemático mais adequado para o comportamento reológico das formulações semissólidas foi determinado através do Software Rheocalc (versão 3.1-1, Brookfield, EUA) o qual determinou os coeficientes de

regressão (r) para os modelos matemáticos propostos para fluidos não-newtonianos: Bingham, Casson, Ostwald e Hershel-Bulkley (Tabela 3). O modelo que apresentou maior coeficiente de regressão foi escolhido para representação do comportamento reológico das formulações semissólidas.

Tabela 3: Modelos matemáticos que descrevem os tipos de comportamentos não-newtonianos

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

As análises foram realizadas em triplicata de lote de cada formulação semissólida e os resultados apresentados através de gráficos e/ou tabelas. O índice de fluxo e de consistência das formulações foram obtidos pelo Software Rheocalc (versão 3.1-1, Brookfield, EUA). A análise de variância ANOVA com intervalo de confiança de 95% foi utilizada para analisar diferença estatística no índice de fluxo e consistência das mesmas.

4.2.2.7 Avaliação da estabilidade física

A avaliação da estabilidade física do insumo nanoestruturado e das formulações semissólidas foi conduzida no equipamento Turbiscan *LAB* (Formulation, France). Através deste é possível determinar em um menor intervalo de tempo a ocorrência de fenômenos como cremagem, sedimentação e coalescência, baseando-se numa técnica que combina transmissão e retroespalhamento de luz com uma fonte de infravermelho próximo e detectores que medem a intensidade de reflexão ou transmissão a partir da amostra (LEMARCHAND et al., 2003).

Para a realização da análise do insumo nanoestruturado, aproximadamente 20 mL de amostra foi acondicionada, diretamente, sem diluição prévia, em cubeta de

vidro borossilicato de 50 mm de altura e colocadas no porta-amostra do equipamento. O experimento foi realizado durante 1 hora com varreduras a cada 5 minutos para cada lote na temperatura de 25° C. Para as formulações semissólidas aproximadamente 20 g de cada amostra foram adicionados nas respectivas cubetas de vidro e inseridas no porta-amostra do equipamento. As análises foram conduzidas de acordo com protocolos utilizados pelo grupo de estudos do laboratório 405 (FAC/FAR – UFRGS). Dessa forma, as análises das formulações semissólidas foram conduzidas na temperatura de 25° C durante 5 dias, sendo que no primeiro dia escaneamentos a cada 5 minutos durante uma hora foram realizados, já nos demais dias consecutivos apenas 1 escaneamento foi realizado, totalizando 16 escaneamentos. As análises foram realizadas em triplicata e o resultado obtido foi representado através do gráfico de uma das replicatas, uma vez que não é possível fazer uma média dos resultados obtidos. O gráfico representa a variação da transmissão e o retroespalhamento de luz emitida nas amostras.

4.2.2.8 Quantificação da tretinoína nas formulações semissólidas

A quantificação da tretinoína foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) de acordo com metodologia previamente validada (ANEXO 8.1.1 e 8.1.2). As determinações de teor de tretinoína nas formulações semissólidas foram realizadas em triplicata. Os resultados foram expressos em miligrama de tretinoína por grama de formulação, apresentando o desvio-padrão da triplicata de determinações.

4.2.3 Avaliação *in vitro* da permeação/retenção cutânea da tretinoína a partir das bases semissólidas

A avaliação *in vitro* da permeação/retenção cutânea da tretinoína a partir de bases semissólidas de géis e cremes contendo tretinoína foi conduzida utilizando células de difusão verticais do tipo *Franz* (Célula de *Franz* Microette Plus-Hanson Research®), automatizada, com compartimento receptor com capacidade de aproximadamente 7 mL e uma área de difusão de 1,766 cm² (FRANZ, 1975;

VENTER *et al.*, 2001). As formulações testadas para esta avaliação foram: CT, CTN, GT, e GTN.

Para o estudo, foi necessária a escolha de um meio receptor para a tretinoína que atendesse a condição *sink* durante o experimento. Também foram realizadas validações de metodologias para a extração e quantificação da tretinoína nas camadas da pele, no doador (formulação semissólida contendo tretinoína) e no meio receptor selecionado (ANEXO 8.3). Além disso, foi verificada a especificidade das membranas da pele de abdômen de porcas para a utilização em conjunto com o método analítico por CLAE.

4.2.3.1 Escolha do meio receptor

O meio receptor foi escolhido com base na determinação da concentração de saturação da tretinoína, realizado através da solubilização da quantidade total do fármaco presente no volume de solução receptora empregado no teste *in vitro* (7 mL). Para isso, foram selecionadas oito soluções (Tabela 4) que pudessem ter uma boa capacidade de solubilizar o fármaco. Estas foram preparadas adicionando-se quantidade excessiva de tretinoína em *ependorf* contendo 1 mL de solução receptora. As amostras foram agitadas em vórtex por 2 minutos a fim de garantir a solubilização no meio e então foram mantidas durante 24 horas sob o abrigo da luz. Após, essas soluções foram filtradas, em filtro 0,45 µm (Millipore Millex-HP) para *vials* e doseadas por CLAE, de acordo com a metodologia descrita no ANEXO 8.3.

Tabela 4: Soluções testadas como candidatas a meio receptor para os estudos de permeação cutânea.

Solução Receptora	Componentes	Proporção (%)
1	PEG 400:H ₂ O:T80	40:60:0,5
2	EtOH:H ₂ O:T80	10:75:15
3	PEG 400:H ₂ O:EtOH:T80	40:50:10:1
4	PEG 400:H ₂ O:EtOH:T80	40:50:10:0,5
5	Glicerina:H ₂ O:EtOH:T80	40:50:10:1
6	PEG 400:H ₂ O:EtOH:T80	65:25:10:0,5
7	PBS 7,4:EtOH	90:10
8	PBS 7,4:EtOH	70:30

Após a escolha da solução receptora mais adequada validou-se a metodologia para quantificação da tretinoína nas amostras (ANEXO 8.3).

4.3.2.2 Preparação e estocagem da membrana suína

As amostras de pele foram preparadas para uso através da remoção dos pêlos e remoção do tecido adiposo. A camada córnea foi lavada com solução aquosa de lauril sulfato de sódio (LSS) a 1% e o resíduo de tecido adiposo foi retirado com solução de etanol:éter na proporção 1:1 (v/v). O excesso desses solventes foi removido com água Milli-Q e as amostras necessárias para o experimento cortadas em formato esférico. As espessuras foram determinadas com auxílio de um paquímetro, sendo padronizada uma espessura média de $1,7 \pm 0,3$ mm. As membranas limpas foram estocadas sob refrigeração (-4 °C) até a utilização nos ensaios, não permanecendo congeladas por período maior do que 90 dias.

4.3.2.3 Estudo *in vitro* de permeação/retenção cutânea

Foram aplicados na pele 250 mg de cada formulação e a permeação cutânea foi avaliada durante 12 horas em células de difusão (Célula de *Franz* Microette Plus-Hanson Research®). Amostras de 1 mL do meio receptor foram coletadas, automaticamente pelo equipamento nos tempos de 2, 4, 6, 8, 10 e 12 h, sendo igual volume repostado automaticamente. Sequencialmente todas as amostras foram quantificadas por CLAE através de metodologia previamente validada (ANEXO 8.3). Ao final das 12 horas, as células de difusão foram desmontadas para quantificação da tretinoína no compartimento doador, estrato córneo, epiderme viável e derme.

O excesso de formulação (doador) que não foi absorvido pela pele foi removido com um pedaço pequeno de algodão e transferido para tubos de ensaio, aos quais foram adicionados 4 mL de metanol. Após procedeu-se a extração da tretinoína nas formulações para posterior quantificação (ANEXO 8.2.3). A quantificação da TTN presente no excesso foi realizada com a finalidade de verificar o percentual recuperado entre a quantidade de TTN aplicada na pele e o permeado/retido na pele, ao final do experimento. Contudo, a recuperação foi expressa em percentual (%) de TTN recuperada em relação a quantidade inicialmente aplicada.

Os resultados do estudo de permeação, que se apresentaram dentro do limite de quantificação, expressam a média de seis repetições independentes (n=6), em quantidade de TTN permeada por cm² de pele (µg/cm²).

4.3.2.5 Técnica de *tape stripping* – retenção no estrato córneo

Após a retirada do excesso de formulação retida sob a pele, as camadas do estrato córneo foram retiradas aderindo pedaços de fita adesiva na área exposta ao produto. Para tanto, foram utilizados 18 tiras de fita adesiva (3M, Durex), medindo 19 x 24 mm, para remoção do estrato córneo.

As fitas foram pressionadas sobre a membrana e então friccionadas para remoção de todo o estrato córneo. As fitas foram separadas em grupos de 6, cada um contendo 3 fitas. Os grupos contendo as fitas receberam as seguintes denominações: T1, T2, T3, T4, T5 e T6. A cada grupo de fita colocadas em tubos de

ensaio foram adicionados 4 mL de metanol, solvente extrator. As amostras foram submetidas à extração através de agitação com agitador de tubo (vórtex) por 2 minutos, na sequência foram levadas ao banho de ultrassom durante 4 minutos com temperatura controlada de 32 °C e posteriormente centrifugadas durante 30 minutos a 4500 x g. Após, foram filtradas através de membrana com porosidade 0,45 µm para *vials* ambarizados e posteriormente quantificadas por CLAE (Shimadzu®), conforme ANEXO 8.2.2.

4.3.2.6 Técnica de retenção cutânea

Após a remoção do estrato córneo por *tape stripping*, foi realizada a técnica de retenção cutânea descrita por VERMA e FAHR (2004) e TOUITOU e colaboradores (1998). Essa técnica consiste em separar a epiderme da derme através da imersão da membrana em água Milli-Q aquecida à temperatura de 60 °C, por 45 segundos. Posteriormente a epiderme foi removida através de diversas raspagens com o auxílio de lâmina de bisturi, sendo dessa forma separada da derme, e então transferida para tubo de ensaio. A derme foi cortada em pequenos fragmentos com auxílio de pinça e tesoura e transferida para tubo de ensaio. Aos tubos contendo epiderme e derme foram adicionados 9 mL de metanol e procedida a extração com a utilização de agitação em vórtex por 2 minutos, e posterior banho de ultrassom durante 30 minutos sob aquecimento brando (32 °C). As amostras foram centrifugadas durante 30 minutos a 4.500 x g. Após, as amostras foram filtradas utilizando membrana com porosidade 0,45 µm para *vials* e submetidas à doseamento por CLAE, conforme metodologia previamente validada (ANEXO 8.2).

A análise da penetração e permeação cutânea foi realizada comparando-se a quantidade de tretinoína absorvida em µg/cm² de pele nas diferentes camadas (estrato córneo, epiderme viável e derme). A significância estatística das diferenças na penetração *in vitro* da tretinoína, para cada formulação semissólida, foi calculada por teste T student com nível de significância de 5 %. O comparativo do perfil de permeação entre as quatro formulações (GTN e CTN; GT e CT) para as diferentes camadas da pele foi realizado por ANOVA de duas vias, com pós-teste de Bonferroni utilizando intervalo de confiança de 95%. O software GraphPad Prism (versão 5, 2007) foi utilizado para realização da análise estatística.

4.2.4 Estudo da liberação *in vitro* da tretinoína a partir das bases semissólidas

O equipamento de célula de difusão de Franz (Célula de *Franz* Microette Plus-Hanson Research[®]) foi utilizado como aparato para o estudo de liberação *in vitro*, na qual 250 mg de das formulações CT, CTN, GT e GTN foram aplicados sob membrana de diálise (M.W = 12,400 kDa) a fim de determinar a liberação da TTN num período de 12 horas. Amostras de 1 mL do meio receptor (PBS pH 7,4:etanol - 70:30) foram coletadas nos tempos de 2, 4, 6, 8, 10, 11 e 12 h, sendo igual volume do meio receptor repostado automaticamente. Sequencialmente todas as amostras foram quantificadas por CLAE (Shimadzu[®]), através de metodologia previamente validada (ANEXO 8.3).

Dos resultados obtidos, após as 12 horas de experimento, calculou-se o fluxo de TTN, quando possível, empregando-se a primeira lei de Fick. Os resultados foram expressos em $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ da triplicata de análise (n=3). Para avaliar a homogeneidade da liberação da TTN, foi realizada a análise estatística dos valores numéricos desvios-padrão apresentados entre as replicatas de cada formulação semissólida. A análise estatística foi realizada através de T student, utilizando o software GraphPad Prism (versão 5, 2007). O intervalo de confiança utilizado foi de 95 %.

4.2.5 Descarte de resíduos químicos e biológicos

O descarte de resíduos químicos seguiu procedimento padrão realizado pela Faculdade de Farmácia – UFRGS. Os resíduos químicos foram acondicionados em galões plásticos de 5 ou 10 litros e preenchidos até 80 % da sua capacidade. Os recipientes foram rotulados com informações sobre o tipo de resíduo contido.

Os resíduos químicos convenientemente acondicionados e devidamente rotulados foram entregues à Comissão de Saúde e Ambiente de Trabalho (COSAT/FAR) desta Faculdade, que é responsável pelo envio dos resíduos ao Instituto de Química da UFRGS, onde são realizados os procedimentos adequados de reciclagem e/ou descarte do material químico.

Após a limpeza das peles suínas, os restos foram segregados em sacos plásticos brancos opacos e armazenados em freezer utilizado exclusivamente para

esta finalidade até o recolhimento semanal realizado pela coleta especial para resíduos biológicos.

Os materiais perfurocortantes (lâminas de bisturi) foram acondicionados em recipientes rígidos tipo Descarpack para evitar rupturas, sendo recolhidos semanalmente pela coleta especial de resíduos biológicos.

5. Resultados e Discussão

5.1 Caracterização físico-química do insumo nanoestruturado

5.1.1 Características organolépticas

Os três lotes do insumo nanoestruturado analisados apresentaram-se como um líquido de aparência leitosa, homogênea e opalescente, característica da presença de nanopartículas em suspensão (MEZZALIRA, 2005). A suspensão apresentou-se ainda com reflexo azulado, decorrente do movimento browniano das nanopartículas em suspensão (efeito *Tyndall*), característico de sistemas coloidais. O resultado obtido está em concordância com o certificado de análise do fabricante, para os parâmetros avaliados (ANEXO 8.3).

5.1.2 Determinação do pH

Os três lotes avaliados do insumo nanoestruturado apresentaram reprodutibilidade neste parâmetro, com valores levemente ácidos. Os valores de pH para os lotes 3060, 3081 e 3256 foram de $6,2 \pm 0,3$, $6,3 \pm 0,09$ e $6,2 \pm 0,2$ respectivamente. Esses valores estão de acordo com o certificado de análise do fabricante (pH médio = 6,2) e adequados para serem veiculados em bases semissólidas para posterior aplicação dermatológica. Segundo SOUTO e MULLER (2008) nanopartículas lipídicas sólidas possuem a vantagem de serem produzidas com pH ótimo para aplicação tópica, além disso sistemas coloidais com valores de pH levemente ácidos são adequados para serem veiculados em sistemas semissólidos para aplicação cutânea (ALVES et al., 2007).

5.1.3 Determinação do potencial zeta (ξ)

O potencial zeta médio resultante dos três lotes analisados foi de $-9,55 \pm 1,16$ mV. Sistemas coloidais quando suspensos em água, em baixa concentração iônica, e pH entre 5 e 10, como no caso do insumo nanoestruturado avaliado, adquirem carga negativa (RIDDICK et al., 1981). Além disso, os nanossistemas lipídicos costumam ser carregados negativamente (SOUTO et al., 2004).

O potencial zeta está intimamente ligado à estabilidade física das nanopartículas e que dependendo do seu valor em módulo evitam parcialmente a aglomeração e aumento de tamanho das nanopartículas, sendo considerado um bom indicador da estabilidade física destes sistemas (MEHNERT E MADER, 2001). Contudo, existem outros mecanismos que promovem a estabilização de partículas, como o impedimento estérico. Nesse caso, a arquitetura espacial da molécula anfifílica (tensoativo) provoca o impedimento da aproximação e consequente coalescência das partículas. Mesmo com potencial zeta próximo a zero a partícula pode apresentar alta estabilidade em suspensão (ÜNER, 2006), uma vez que tensoativos não-iônicos tendem a gerar potencial zeta com valores (em módulo) baixos para formulações e suspensões como as de nanopartículas lipídicas (MÜLLER et al., 2007; ÜNER, 2006).

O insumo nanoestruturado analisado é um produto comercial composto por um carreador lipídico nanoestruturado, entretanto para divulgação neste trabalho não se teve acesso a todos componentes que fazem parte do produto, não podendo assim discorrer melhor acerca da influência dos componentes em relação ao baixo valor de potencial zeta. Contudo acredita-se que o produto contenha tensoativos aniônicos (fosfolipídeos, estearato de sorbitano, etc), como muito relatado na literatura para produção de nanopartículas lipídicas sólidas (ZUR MÜHLEN et al., 1998).), resultando em um potencial zeta com valores baixos, devido a carga negativa derivada do tensoativo.

5.1.4 Determinação do diâmetro médio de partícula e distribuição granulométrica

A Tabela 5 apresenta os resultados das análises de diâmetro médio e distribuição granulométrica do insumo nanoestruturado, em triplicata, para cada uma das técnicas utilizadas.

Tabela 5: Diâmetro médio e distribuição granulométrica do insumo nanoestruturado medido pelas diferentes técnicas (n=3)

Difratometria de laser			Espalhamento múltiplo de luz		NTA	
D[4,3]	d _{0,5} nm**	Span*	Z average	PDI	σ nm ^a	Span
144±14	63±0,6	1,4±0,1	150±7	0,11±0	202±19	0,8±0,06

Valores representam a média dos três lotes ± desvio padrão

* por volume das partículas ;** número de partículas; ^a 3,0 x 10¹³±0,4 partículas/mL.

Os três lotes do insumo nanoestruturado avaliados apresentaram diâmetros nanométricos de partícula e baixa polidispersão, o que demonstra homogeneidade do tamanho das partículas do produto avaliado. Os lotes analisados estão em concordância com o certificado de análise fornecido pelo fabricante onde relata que as partículas dos seus produtos possui diâmetro médio entre 100 e 300 nm (ANEXO 8.3).

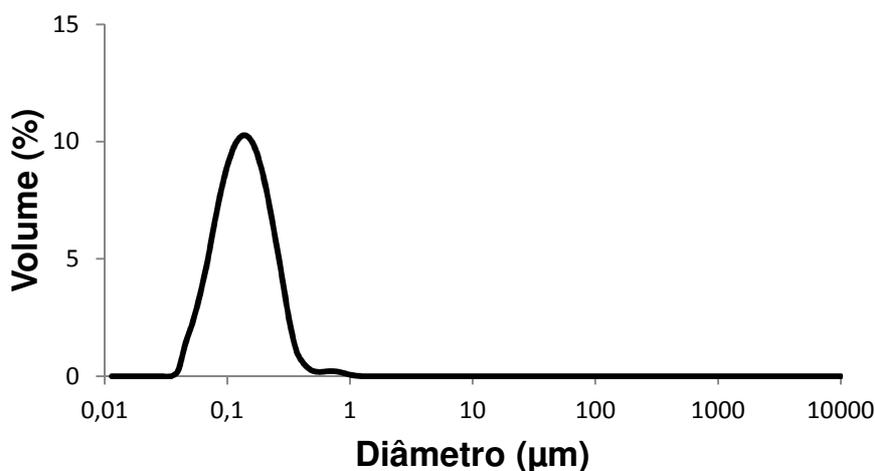


Figura 4: Distribuição do tamanho de partícula, por difratometria de laser, da média da triplicata de lote do insumo nanoestruturado analisados pelo volume das partículas.

Os lotes analisados por difratometria de laser (Mastersizer[®] 2000 – Malvern) apresentaram distribuição granulométrica monomodal com diâmetro médio de 144 nm quando avaliados pelo volume das partículas. Por outro lado, quando analisados pelo número de partículas o diâmetro médio foi igual 63 nm (Figura 4).

O diâmetro de partícula do insumo nanoestruturado, determinado pela técnica de espalhamento de luz dinâmico (Zetasizer Nano ZS, modelo ZEN 3600 - Malvern Instruments), foi de aproximadamente 150 nm com baixo índice de polidispersão (0,11), sendo similar a análise feita por difratometria a laser (Mastersizer® 2000 - Malvern). Há uma grande importância em reproduzir produtos em uma faixa de tamanho pré-determinada, não apenas pela homogeneidade do sistema, mas também devido à potencialidade do produto quando é dependente do seu tamanho e área de superfície onde vai exercer a sua função (WEISS, 2004).

Através da distribuição de tamanho e contagem de partículas analisados pela técnica de NTA obteve-se resultados de diâmetro médio de 202 nm com *span* abaixo de 1, corroborando os dados anteriores que apontam a homogeneidade de tamanho das nanopartículas em suspensão. Na Figura 5 está representado graficamente o perfil granulométrico do insumo nanoestruturado obtido por análise de NTA.

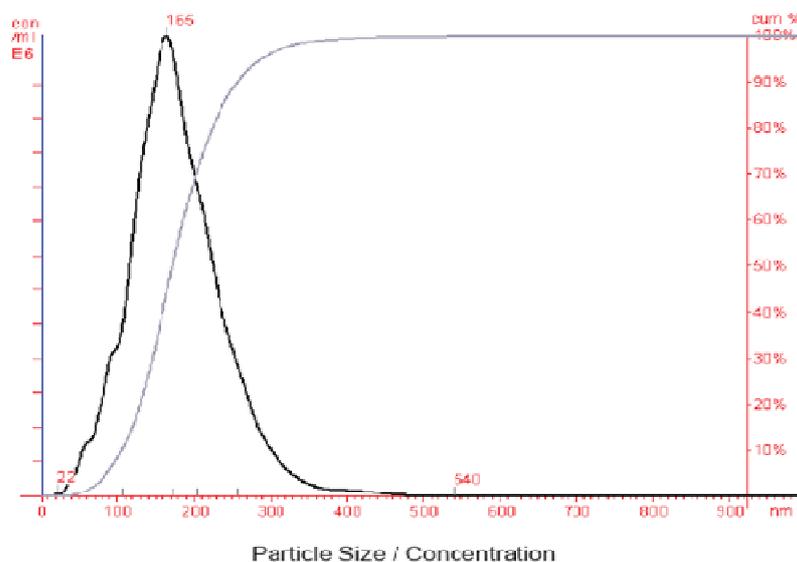


Figura 5: Distribuição do tamanho de partícula do insumo nanoestruturado analisado por NTA.

De acordo com a recomendação da EU (2011) para classificar nanomateriais, sugere que nanopartículas lábeis (lipossomas, nanoemulsões, nanopartículas lipídicas), já em uso e, com diâmetro médio entre 100 e 1.000 nm são consideradas nanométricas, uma vez que alguns tipos de nanopartículas apresentam suas propriedades especiais em faixas de tamanhos maiores que 100 nm. Avaliando o diâmetro médio determinado para os lotes do insumo nanoestruturado (IN), por

número ou pelo volume das nanopartículas, poderia considerar o IN como um nanomaterial.

Comparando os diâmetros determinados pelas três metodologias utilizadas, observa-se resultados semelhantes, porém, não iguais para a mesma amostra, podendo ser explicado pela metodologia matemática de cálculo do tamanho de partícula em cada técnica. NTA é uma técnica inovadora, que combina as vantagens de uma única partícula (MET) em conjunto (PCS) com outras técnicas abordadas. Esta técnica permite a visualização directa e em tempo real das nanopartículas em líquidos, e considera-se um método que é complementar espectroscopia de correlação de fótons, na determinação da média diâmetro da partícula. Dessa forma, a utilização de diversas técnicas para uma análise garante confiabilidade no resultado obtido. Através dos resultados de tamanho de partícula do insumo nanoestruturado, compreendido entre 100 e 200 nm, o produto apresentou características compatíveis com materiais nanoestruturados e de acordo com o certificado de análise fornecido pelo fabricante.

Grupos de pesquisa vem estudando a influência do diâmetro de nanocarreadores na penetração cutânea de substâncias de interesse cosmético ou dermatológico (LADEMANN et al., 2011). SHIM e colaboradores (2004) estudaram em célula de *Franz* a taxa de permeação do minoxidil em nanopartículas poliméricas, com tamanhos compreendidos entre 40 e 130 nm, na pele. Os resultados do estudo demonstraram que as nanopartículas estudadas liberaram o minoxidil mais eficientemente na pele e que as formulações que continham nanopartículas com menor diâmetro apresentaram maior penetração do ativo.

No caso das nanopartículas com composição lipídica básica como NSL e CLN a redução do tamanho da partícula melhora a permeação dos fármacos nanoencapsulados, devido ao aumento do número de partículas disponíveis para fazer a oclusão. Em geral, as nanopartículas lipofílicas não penetram na camada córnea, mas dependendo de sua composição e conseqüentemente da localização do ativo na partícula, seu perfil de liberação é aperfeiçoado e, além disso, há um aumento da superfície de contato entre o composto ativo e os corneócitos. Portanto, os ativos incorporados em nanopartículas lipofílicas conseguem penetrar mais profundamente pelas camadas da pele (MULLER et al., 2007).

No caso de cosméticos e produtos dermatológicos onde se deseja uma ação no estrato córneo, epiderme viável ou derme é importante que as nanopartículas tenham um tamanho que não permita atuação sistêmica como forma de segurança. Além disso, conforme já relatado na literatura, o “efeito nano”, de maior hidratação pela formação de um justo filme oclusivo formado pelas nanopartículas, em cosmético é conseguido com partículas de menor tamanho, do contrário podem ter efeito similar a produtos convencionais (WISSING et al., 2001).

5.1.5 Avaliação morfológica

A técnica de MET possibilitou reafirmar o tamanho e polidispersão das partículas, além da morfologia das mesmas.

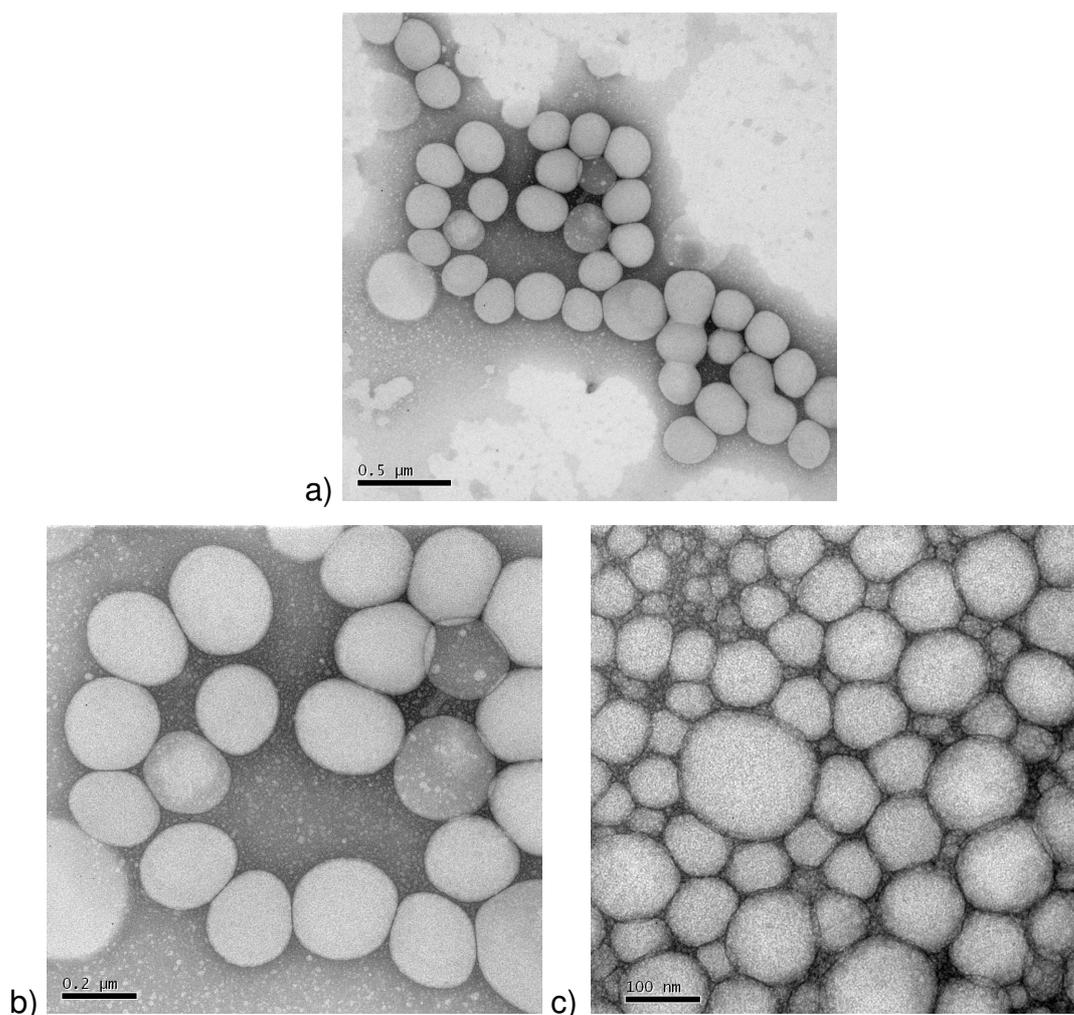


Figura 6: Fotomicrografias das partículas do insumo nanoestruturado obtidas por MET com magnitudes de: (a) 50.000x (b) 100.000x (c) 200.000x.

Observando a Figura 6, representante das fotomicrografias obtidas por MET, verifica-se a presença de estruturas esféricas com diâmetro em torno de 130 nm, indicando homogeneidade do sistema, corroborando os resultados obtidos e apresentados pelas técnicas anteriores. Segundo KRAUR E AGRAWAL (2007) nanopartículas lipídicas são esféricas quando apresentam diâmetro compreendido entre 20 e 1.000 nm.

5.1.6 Comportamento reológico

A Figura 7 apresenta o reograma obtido a partir da triplicata de análise dos lotes do insumo nanoestruturado (n=3). O produto apresentou comportamento reológico newtoniano, sendo que a viscosidade média para os lotes avaliados foi de $1,83 \pm 0,13$ cP.

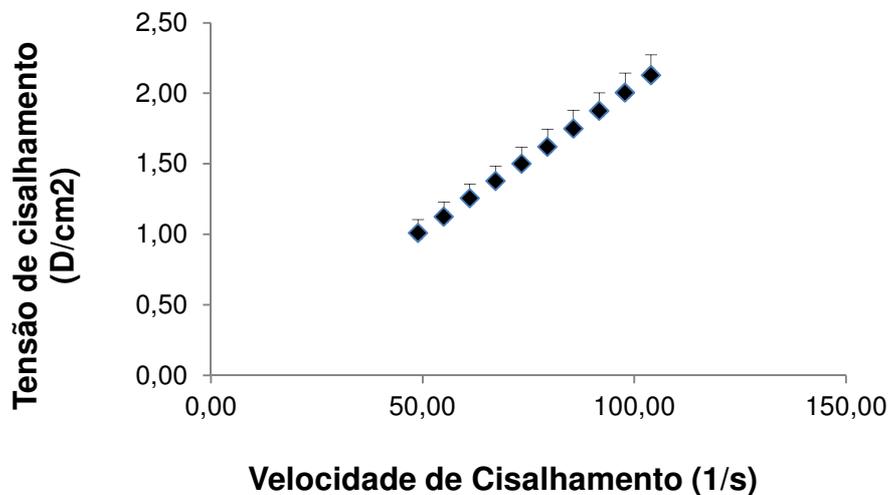


Figura 7: Reograma de tensão *versus* velocidade de cisalhamento referente a análise em triplicata do insumo nanoestruturado.

Fluidos newtonianos caracterizam-se por apresentarem viscosidades constantes independentemente da taxa de cisalhamento. Geralmente, materiais quimicamente puros ou soluções muito diluídas apresentam comportamento newtoniano (MARTIN, 1993; ANSEL, 1999), como é o caso do insumo nanoestruturado avaliado neste trabalho. ILLINGA e UNRUHB (2004) estudaram nanosuspensões lipídicas com diversas proporções de fase dispersa e relataram que

aumentando a quantidade de lipídios nas nanopartículas lipídicas é possível mudar o comportamento do sistema de newtoniano para não-newtoniano podendo assim, influenciar no seu potencial para aplicações farmacêuticas (ILLINGA e UNRUHB, 2004; SHAH et al., 2011). Desta forma, os resultados de reologia observados neste trabalho, demonstram que as proporções de lipídio presente na fase dispersa do insumo nanoestruturado garantem o seu comportamento newtoniano, o que torna uma vantagem no caso deste insumo, pois, facilita para o formulador a preparação do cosmético final pela simples incorporação na base.

5.1.7 Análise de fenômenos de instabilidade pela técnica de espalhamento múltiplo de luz

A técnica de espalhamento múltiplo de luz tem sido utilizada com sucesso no estudo de estabilidade de emulsões (LEMARCHAND et al., 2003) e dispersões coloidais concentradas (MENGUAL et al., 1999). Para estas formulações, devido à própria composição do sistema, uma desestabilização física pode ocorrer através de processos irreversíveis, como coalescência ou floculação, ou de processos reversíveis, como cremagem ou sedimentação.

Esta técnica é capaz de detectar os fenômenos de instabilidade de forma mais rápida e segura do que por observação visual do analista, especialmente no caso de sistemas opacos e concentrados (MENGUAL et al., 1999; LEMARCHAND et al., 2003) No caso de sistemas opacos as desestabilizações serão obtidas através de alterações no retroespalhamento de luz, que é o caso do insumo nanoestruturado.

O resultado das análises de estabilidade física, do insumo nanoestruturado, efetuadas pela técnica de espalhamento múltiplo de luz (Turbiscan LAb) está apresentado na Figura 8 representando o perfil da intensidade da luz retroespalhada nas amostras do insumo nanoestruturado.

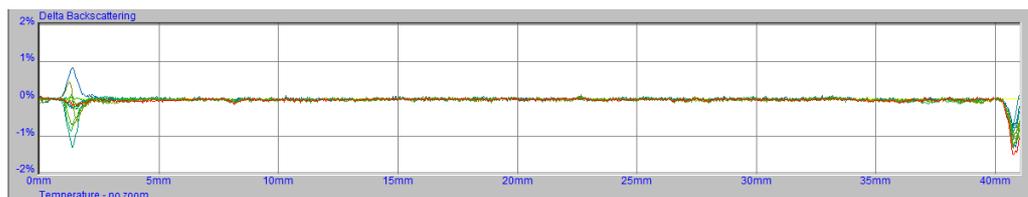


Figura 8: Gráfico de variação de backscattering do insumo nanoestruturado.

O lado esquerdo do gráfico indica a base da cubeta, o lado direito o topo e o meio representa a altura desta. No gráfico é possível verificar uma pequena variação do *backscattering* no início e no final, menor que 1%, conforme manual de instruções do equipamento indica estabilidade da amostra. O fenômeno de cremagem é considerado reversível e esperado para este tipo de sistema, devido a menor densidade dos componentes lipídicos que constituem a partícula.

A técnica de espalhamento múltiplo de luz possibilita a detecção mais rápida de possíveis fenômenos de instabilidade, como cremagem, sedimentação e coalescência. O princípio dessa análise baseia-se na avaliação das variações da transmissão e do retroespalhamento (*backscattering*) emitidos pela amostra devido a uma variação da fração volumétrica da gotícula/partícula. A medida é feita a partir de uma fonte de luz de infravermelho próximo e de dois detectores que agem de forma sincronizada. O detector de transmissão recebe informações da luz transmitida através do produto (*T*) e o detector de *backscattering* mede a luz refletida (*BS*) pelo produto (LEMARCHAND et al., 2003).

O insumo nanoestruturado analisado mostrou-se, nos ensaios de caracterização, de acordo com o certificado de análise do fabricante e semelhante a alguns estudos da literatura (ANEXO 8.3; WISSING E MULLER, 2002; HOU et al., 2003; SOUTO et al., 2004) Assim, o produto foi aprovado em todas as análises efetuadas, demonstrando a sua qualidade nos parâmetros pré-determinados no que tange às suas características nanoscópicas, mostrando-se apto para a veiculação em bases dermatológicas com o intuito de avaliar sua influência sobre o perfil de permeação/penetração da tretinoína. De acordo com PARDEIKE e colaboradores (2008) os nanocarreadores lipídicos são carreadores coloidais com características vantajosas para aplicação dérmica, proporcionando uma liberação controlada de muitas substâncias. Além disso, podem ser compostos de lipídios fisiológicos e biodegradáveis, exibindo baixa toxicidade e uma excelente tolerabilidade.

5.2 Caracterização físico-química das formulações semissólidas

5.2.1 Incorporação dos ativos

Após a produção do creme e gel base foram adicionados os ativos (insumo nanoestruturado e/ou tretinoína) (item 4.2.1). O insumo nanoestruturado por apresentar-se como uma dispersão líquida, possui a vantagem de ser facilmente incorporado em bases semissólidas pela simples adição e mistura.

As nanodispersões lipídicas apresentam-se como líquidos de baixa viscosidade, tendo a necessidade de serem incorporadas em formas semissólidas para facilitar a aplicação tópica e permitir que tenham contato e permanência na pele (LIPPACHER; MULLER E MADER 2000; ALAVAREZ-ROMÁN et al., 2001; JIMENEZ et al., 2003). De acordo com os autores MULLER (2002), PADEIKE e colaboradores (2008), nanopartículas lipídicas podem ser incorporadas em bases como cremes e hidrogéis durante a preparação destas, substituindo parte dos componentes graxos no caso de cremes e parte da água no caso dos géis pela suspensão de nanopartículas. Entretanto, essas formulações também podem ser adicionadas após o preparo da base cosmética ou dermatológica.

Neste trabalho optou-se por incorporar o insumo nanoestruturado após o preparo das bases conforme indicado pelo fabricante (ANEXO 8.4). A metodologia de incorporação do insumo nanoestruturado está descrita no item 4.2.1.

A tretinoína foi incorporada no creme após ser triturada, então adicionou-se aos poucos o creme base, homogeneizando até que não tivesse partículas sólidas/cristalinas visíveis a “olho nú” e obtivesse um creme de coloração homogênea.

A formulação de creme utilizada neste trabalho possui propilenoglicol, um álcool que segundo HADGRAFT (1999) pode atuar como promotor de permeação cutânea de substâncias. Dessa forma decidiu-se utilizar para os géis a mesma proporção da formulação dos cremes, evitando interferência de substâncias no estudo de permeação cutânea. Foi realizada pós sua trituração e solubilização no propilenoglicol. No gel contendo insumo nanoestruturado, adicionou-se primeiramente o propilenoglicol ao gel e após o insumo.

A escolha da concentração de tretinoína a ser incorporada nas formulações foi baseada na concentração usual do produto Vitacid (IGÉfarma) (ANEXO 8.5) e para fornecer ação anti-fotoenvelhecimento. Já a concentração do insumo nanoestruturado foi de acordo com a concentração média recomendada pelo fabricante (5%), para que este tivesse ação clareadora de manchas e *antiaging*. A concentração de 5% do carreador nanoestruturado (independente do ativo utilizado) na formulação final também é sugerida por MÜLLER e colaboradores (2005), estando a concentração de acordo com a literatura.

É importante mencionar que as formulações contendo o insumo nanoestruturado (indicado para cosmético), com ou sem a presença de tretinoína, devem ser consideradas como dermocosmético contendo nanotecnologia, pois ambas as substâncias ativas (vitamina C e tretinoína) tem ação biológica. Cosméticos de grau 2, são também chamados de cosmecêutico, termo criado por Kligman há mais de 25 anos, e tem por definição "produtos cosméticos contendo componentes "biologicamente ativos" (DRAELOS, 2005).

É um termo bastante difundido no mundo todo, e a indústria cosmética usa o termo para se referir a produtos cosméticos que tem propriedades medicinais ou benefícios como medicamento. Entretanto, não é um termo oficial e o FDA não o reconhece, e sugere que se um produto tem propriedade medicamentosa deve ser aprovada como tal (FDA, 2010). No Brasil o ácido retinóico ou tretinoína é medicamento de controle especial (portaria 344 ANVISA). Dessa forma, as formulações CTN e GTN se classificam como dermocosmético de uso tópico contendo nanotecnologia, que diferem das formulações CT e GT que são consideradas apenas como cosmecêuticos.

5.2.2 Características organolépticas

A Tabela 6 apresenta as características organolépticas das formulações de gel e creme, antes e após a incorporação dos ativos (insumo nanoestruturado – IN - e tretinoína - TTN).

Tabela 6: Características organolépticas das formulações semissólidas

Formulação	Aspecto	Cor
CB	Semissólido homogêneo, opaco	Branco
CN	Semissólido homogêneo, opaco	Branco
CT	Semissólido homogêneo, opaco	Amarelo claro
CTN	Semissólido homogêneo, opaco	Amarelo claro
GB	Semissólido homogêneo, transparente	Incolor
GN	Semissólido homogêneo, opaco	Branco
GT	Semissólido homogêneo, translúcido	Amarelo
GTN	Semissólido homogêneo, opaco	Amarelo

As formulações analisadas visualmente apresentaram-se homogêneas, sem a presença de grumos ou separação de fases. O creme base, sem ativos, apresentou-se como um semissólido consistente, de coloração branca, com aparência física característica das emulsões e das matérias-primas utilizadas para sua produção. A coloração do creme não foi alterada com a adição do insumo nanoestruturado, devido a este possuir coloração branca; também não houve alteração aparente da consistência. Por outro lado, os cremes que receberam a tretinoína tiveram sua

coloração alterada para amarelo claro e não foi observada diferença de cor entre as formulações CT e CTN. Além disso, não foi observada nenhuma alteração visual na consistência dessas formulações.

Segundo MÜLLER e colaboradores (2005) a aparência do produto é um fator importante para o consumidor o qual muitas vezes possui uma preferência por produtos não coloridos. Além disso, os autores afirmam que produtos coloridos, como aqueles que possuem Coenzima Q10, de coloração amarelada, podem ter sua coloração enfraquecida ou “desbotada” quando misturados a suspensões de nanopartículas. Entretanto, nas formulações CT e CTN não foram observados tais modificações na tonalidade do amarelo.

Através da análise visual das formulações de gel, observou-se um semissólido de aparência homogênea. O gel sem ativos, que apresentava-se inicialmente transparente, tornou-se de coloração amarela e com fraca opacidade, ou seja, que não permitiu identificar objetos através do frasco. Por sua vez, o gel contendo IN e TTN apresentou coloração amarela de aspecto com alta opacidade. A formulação GN, devido a presença do IN ter coloração branca, apresentou coloração esbranquiçada, com aparência de gel-creme de média opacidade. As formulações de gel não apresentaram diferença aparente da consistência após a incorporação dos ativos.

5.2.3 Determinação do pH

Tabela 7: Valores de pH das formulações semissólidas

Formulação	pH (média ± DP)	Formulação	pH (Média ± DP)
CB	7,5±0,00	GB	5,7±0,11
CN	7,4±0,09	GN	5,7±0,09
CT	7,3±0,08	GT	5,9±0,08
CTN	7,3±0,11	GTN	5,8±0,11

Os valores de pH das formulações dos cremes e dos géis apresentaram-se próximos a neutralidade (Tabela 7) e não foi observada variação significativa quando foram adicionados os ativos de características ácidas e levemente ácidas (tretinoína e insumo nanoestruturado, respectivamente). Contudo, observa-se que o valor do

pH dos cremes apresentou um discreto decréscimo com a adição dos ativos, uma vez que o creme base é neutro teve seu pH reduzido ao ser adicionado de dos ativos com caráter ácido. Provavelmente essa redução do pH é dada pela TTN tendo em vista que os valores de pH para as formulações CT e CTN foram iguais, não tendo alteração pelo insumo nanoestruturado que tem caráter levemente ácido.

Segundo SZNITOWSKA e colaboradores (2001), formulações que apresentam valores de pH entre 3,0 e 10,0 não possuem interferência na permeação de moléculas lipofílicas. Dessa forma, os valores de pH das formulações preparadas neste trabalho estão adequados para aplicação tópica. É importante destacar que o grau de acidez da pele varia com fatores como a idade e sexo de indivíduo para indivíduo, e torna-se alcalino à medida que se penetra nos tecidos. Tanto para a cosmetologia como para a dermatologia, é primordial ter em conta as variações do pH cutâneo, pois pode ser fundamental para a boa tolerância dos produtos cosméticos (BARATA, 2002).

5.2.4 Quantificação da tretinoína nas formulações semissólidas

O teor de tretinoína determinado por CLAE, a partir das formulações semissólidas, foi de $0,52 \pm 0,08 \mu\text{g/g}$ para a formulação CT, $0,48 \pm 0,08 \mu\text{g/g}$ para a formulação CTN $0,53 \pm 0,04 \mu\text{g/g}$ para GT e $0,49 \pm 0,03 \mu\text{g/g}$ para a formulação GTN. Observa-se que os teores de TTN para todas as formulações apresentaram-se em torno de 100% em relação ao valor teórico planejado $0,5 \mu\text{g/g}$, com baixo desvio padrão entre as análises, demonstrando confiabilidade na metodologia empregada, reprodutibilidade na preparação dos géis e cremes, bem como ausência de degradação da tretinoína por incompatibilidade com o sistema nanoestruturado.

5.2.5 Determinação do diâmetro médio de partícula e distribuição granulométrica e morfologia das partículas

Segundo LIPPACHER e colaboradores (2000), técnicas como espectroscopia de correlação de fótons ou difratometria a laser podem ser utilizadas para determinação do tamanho das nanopartículas veiculadas em semissólidos como géis e emulsões.

Neste sentido, as análises foram realizadas para todas as formulações de creme (CB, CT, CN e CTN) a fim de verificar se as formulações sem ativo não interfeririam nas medidas de diâmetro das amostras contendo nanopartículas. Entretanto, para todas as formulações, quando analisadas por ambas as técnicas, não foi possível determinar diâmetros que estivessem de acordo com o tamanho das nanopartículas antes da incorporação nas formulações. O perfil médio da distribuição de tamanho de partícula apresentou-se micrométrico quando analisado por volume e por número, apresentando gráficos de perfil bimodal.

O $D[4,3]$ que representa o diâmetro médio em volume das partículas teve como resultado obtido um valor em micrômetros. O índice de polidispersão medido por espalhamento de luz dinâmico (Zetasizer Nano ZS, modelo ZEN 3600 - Malvern Instruments) apresentou-se entre 0,4 e 0,8, indicando amostra com várias populações de tamanho com diâmetro em torno de 1 μm para todas as formulações.

Tendo em vista a dificuldade de observação da presença das nanopartículas nas formulações de creme por essas técnicas, poderia sugerir algumas hipóteses para estes resultados, como: a pequena quantidade de nanopartículas em relação às partículas micrométricas (gotículas) que compõem a emulsão; e/ou a desestruturação do arranjo molecular lipídico das nanoestruturas com consequente formação de aglomerados micrométricos.

Entretanto, através das fotomicrografias da formulação CN obtidas por microscopia eletrônica de transmissão (MET), observou-se a integridade das nanoestruturas incorporadas no semissólido (Figura 9), além da morfologia esférica. Com a obtenção das imagens via MET poderia ainda, sugerir que a população micrométrica apresentada pelas formulações de creme seja inerente a própria composição do creme.

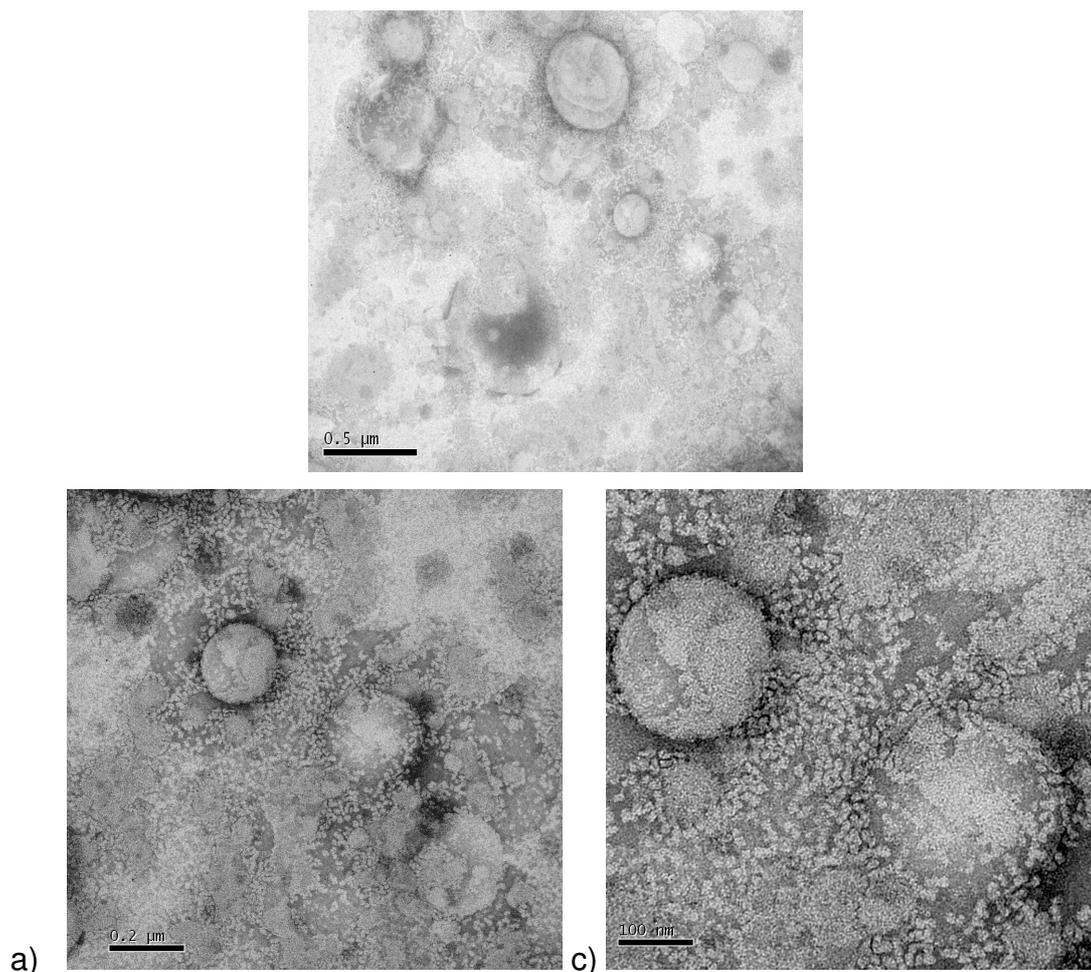


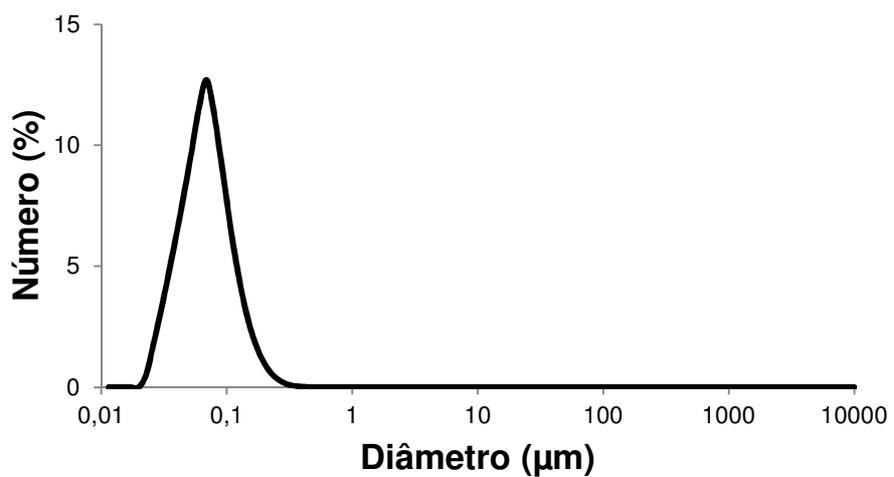
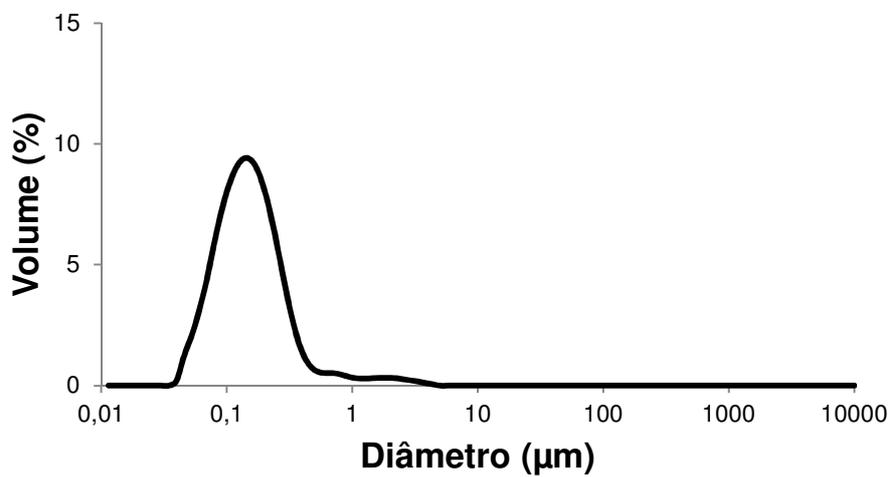
Figura 9: Fotomicrografias das nanopartículas na formulação CTN obtidas por MET com magnitudes de: (a) 50.000x (b) 100.000x (c) 200.000x.

JENNING e colaboradores (2000a) incorporaram NLS em creme O/A e também tiveram dificuldades na determinação do diâmetro das NLS pelas técnicas de PCS e DL. Os autores justificam que não foi possível analisar o tamanho de partículas por essas técnicas devido à coexistência de nanopartículas e gotículas de óleo do creme, resultando em uma distribuição de tamanho bimodal, tendo em vista que as gotículas menores de óleo e os agregados maiores NLS estavam em uma gama de tamanho idêntico (500 -1.000 nm). Como alternativa utilizaram microscopia de luz associado à difração de R-x, esta técnica permitiu a observação das nanopartículas. Neste trabalho as ferramentas disponíveis para observação foram MET, DL e PCS.

Diferente dos cremes, os géis pela sua estrutura e composição foi possível analisar o diâmetro das nanopartículas nas formulações contendo o insumo nanoestruturado (GN e GTN). A Figura 10 representa a distribuição do tamanho de

partícula, por difratometria de laser (Mastersizer[®] 2000 – Malvern), das formulações GN e GTN.

a)



b)

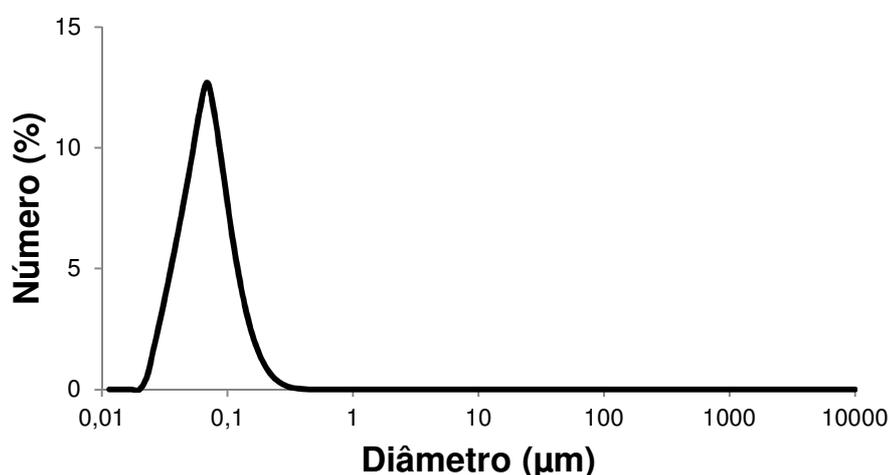
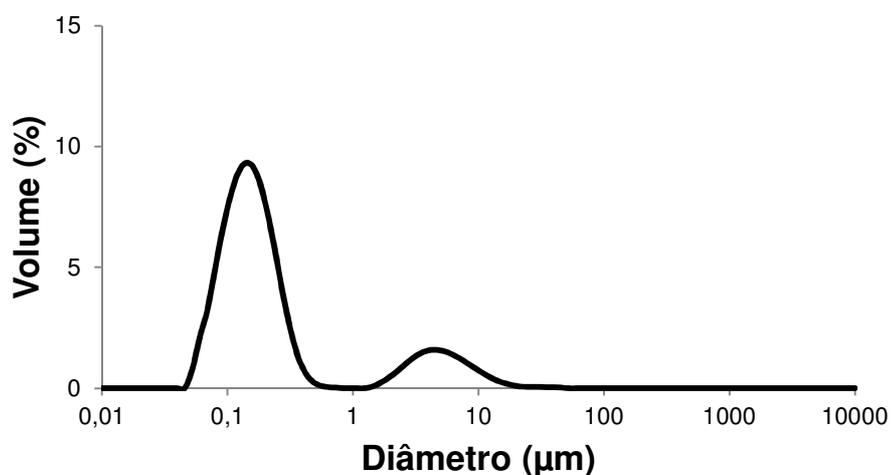


Figura 10: Distribuição do tamanho de partícula, por difratometria de laser, das formulações: (a) GN e (b) GTN analisadas pelo volume e por número de partículas respectivamente.

Quando o perfil granulométrico é analisado pelo volume das partículas apresenta-se como bimodal, sendo o maior pico representante da população nanométrica, referente à presença do insumo nanoestruturado e o menor pico representante da população macrométrica relativa a formulação do gel. O $D[4,3]$, obtido por difratometria de laser (Mastersizer[®] 2000 - Malvern), quando analisado por volume das partículas apresentou um tamanho de $209 \pm 2,50$ nm para a formulação GN e $195,7 \pm 14$ nm para a formulação GTN. Quando analisadas por número de partículas o diâmetro médio para as mesmas formulações foi de $63 \pm 0,08$ e $64 \pm 0,05$ nm, respectivamente.

As médias de diâmetro (*Z average*) e índice de polidispersão obtidos por espalhamento de luz dinâmico (Zetasizer Nano ZS, modelo ZEN 3600 - Malvern Instruments) foram de $136,6 \pm 2,50$ nm com PDI de $0,2 \pm 0,01$ para a formulação GN e de $180,5 \pm 2,82$ nm com PDI de $0,23 \pm 0,01$ para a formulação GTN. É observado um discreto aumento no tamanho das nanopartículas na formulação GTN em relação a GN, levando a sugestão de duas hipóteses para poder explicar: a TTN poderia não estar bem solubilizada no propilenoglicol, entretanto visivelmente não haviam partículas sólidas dispersas na formulação; a segunda hipótese seria a afinidade da TTN pela partícula, pois ambas são lipofílicas e não tem afinidade pela formulação hidrofílica, podendo a TTN se aderir a superfície da nanopartícula.

Através da análise de diâmetro, por difratometria de laser Mastersizer[®] 2000 – (Malvern), verifica-se um discreto aumento no tamanho das nanopartículas e, na análise de espalhamento múltiplo de luz, aumento no índice de polidispersão após sua incorporação nas formulações de gel. Segundo os autores GUTERRES e colaboradores (1995) e CALVO e colaboradores (1996) um valor aumentado para o índice de polidispersão de nanopartículas incorporadas em formulações semissólidas pode indicar a presença de diferentes populações de partículas dentro da mesma formulação. Mudanças na distribuição do diâmetro das mesmas podem indicar uma tendência à agregação e sedimentação das partículas do sistema. Entretanto, as variações de diâmetro e do índice de polidispersão foram relativamente baixas para considerar fenômenos de instabilidade.

JENNING e colaboradores (2000a) incorporaram NLS em diferentes tipos de hidrogéis. Foi analisado o diâmetro das nanopartículas e o índice de polidispersão (IP) destas, antes e após a incorporação no gel através das técnicas de PCS, DL e microscopia de luz. Foi observado um aumento do diâmetro e IP para todos os géis, contudo, nos géis de carbopol[®] que foram neutralizados com NaOH foi observada maior agregação das partículas, pois reduziram o potencial zeta das partículas. O gel de carbopol[®] neutralizado com trometamina teve um discreto aumento no diâmetro da partícula e aumento do IP. Os autores afirmam que em termos gerais as NLS podem ser incorporadas em hidrogel constituídos de polímeros com uma ou mais cargas, sem alterações significativas das características de tamanho de partícula. No caso dos agentes espessantes com grupos muito polares, as possíveis

interações entre a carga superficial negativa das NLS e os grupos polares do polímero deve ser levado em consideração.

SOUTO e colaboradores (2004) analisaram o diâmetro de carreadores lipídicos nanoestruturados sem fármaco, pelas técnicas de DL e PCS, antes e após a incorporação em hidrogéis de Carbopol®, no primeiro dia e após 90 dias de armazenamento a 20° C. Os autores relatam não haver agregação das nanoestruturas no período do estudo, no entanto, quando analisados pela técnica de PCS, o índice de polidispersão teve um discreto aumento no primeiro dia, e um aumento significativo após os 90 dias de armazenamento.

Comparando-se o estudo realizado por SOUTO e colaboradores (2004) com o presente trabalho, a diluição das amostras para a determinação pela técnica de PCS foi realizada até que a amostra apresentasse baixa opalescência. Neste trabalho as formulações foram diluídas em 2.000 vezes seguida de centrifugação e o sobrenadante filtrado em membrana de 1,2 µm, garantindo a fraca opalescência das amostras. O poro da membrana utilizada na filtragem permite a passagem de populações de variados tamanhos presentes nas amostras, referentes a própria estrutura do gel e que podem ter contribuído para o aumento do diâmetro. É importante ressaltar que a formulação que apresentou perfil bimodal e discreto aumento de tamanho da nanopartícula foi GTN, o perfil para a formulação GN corrobora os dados do estudo realizado por SOUTO e colaboradores (2004).

A Figura 11 representa o perfil granulométrico de todas as formulações de gel, possibilitando a diferenciação entre as elas.

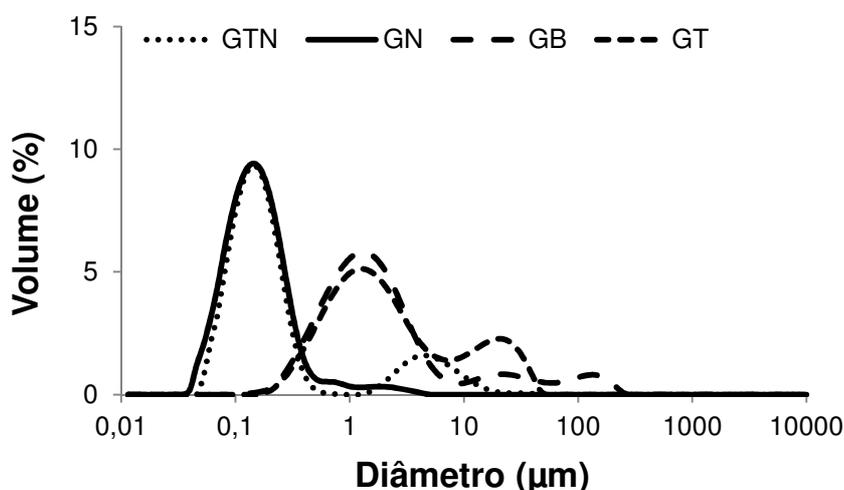


Figura 11: Perfil granulométrico das formulações de gel (GB, GT, GN e GTN) analisadas por difratometria de laser.

Uma vez verificada a presença das nanopartículas após sua incorporação nos géis através da determinação do diâmetro das partículas por difratometria de laser e espalhamento de luz dinâmico, a mesma amostra foi submetida à análise por microscopia eletrônica de transmissão com o objetivo de visualizar a presença do insumo nanoestruturado nos géis. Como pode ser observado na Figura 12, foi possível visualizar a presença de nanopartículas íntegras e esféricas de tamanhos semelhantes na matriz do gel.

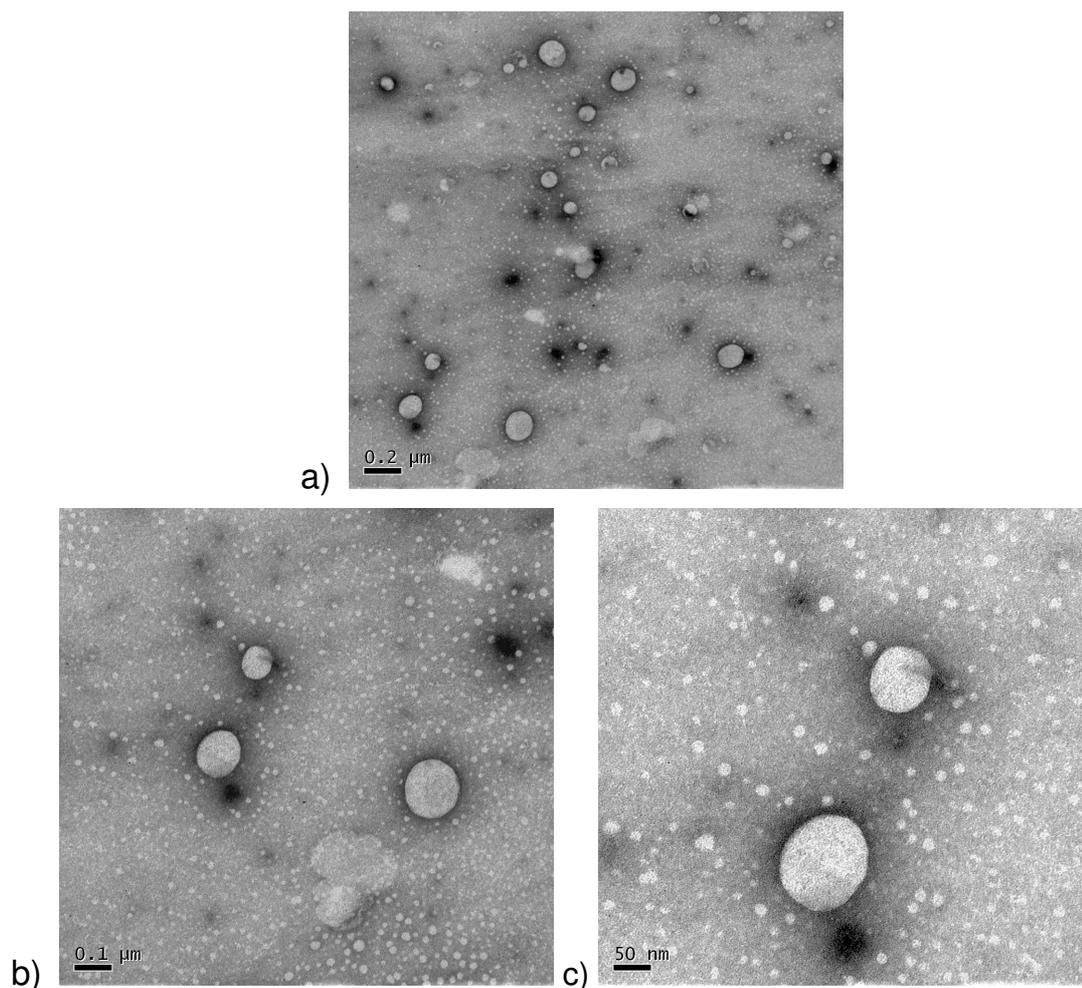


Figura 12: Fotomicrografias das nanopartículas na formulação GTN obtidas por MET com magnitudes de: (a) 50.000x (b) 100.000x (c) 200.000x.

5.2.6 Comportamento reológico

Os reogramas apresentados pelas Figura 13 e Figura 14 mostram que as formulações semissólidas apresentaram caráter não-newtoniano, pois não houve relação linear entre os valores das tensões de cisalhamento com os das velocidades de cisalhamento aplicados.

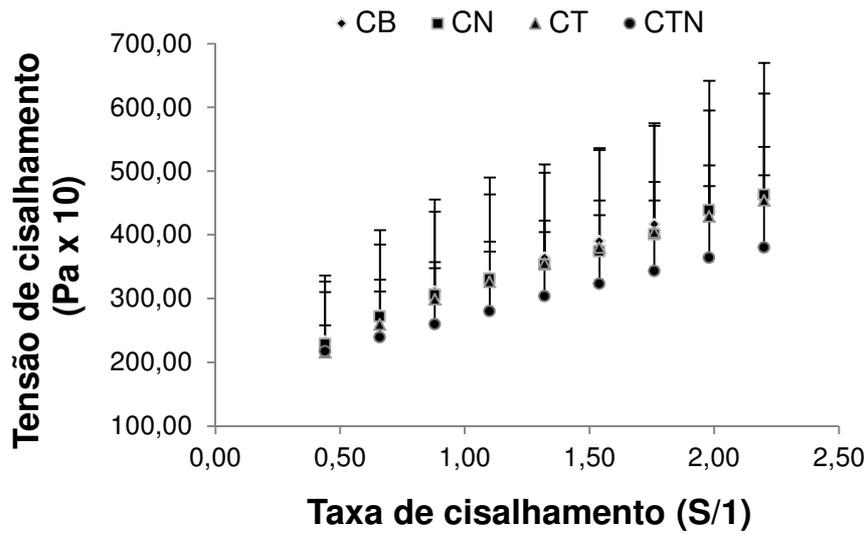


Figura 13: Perfil reológico das formulações de cremes de acordo com o modelo de Herschel-Bulkley.

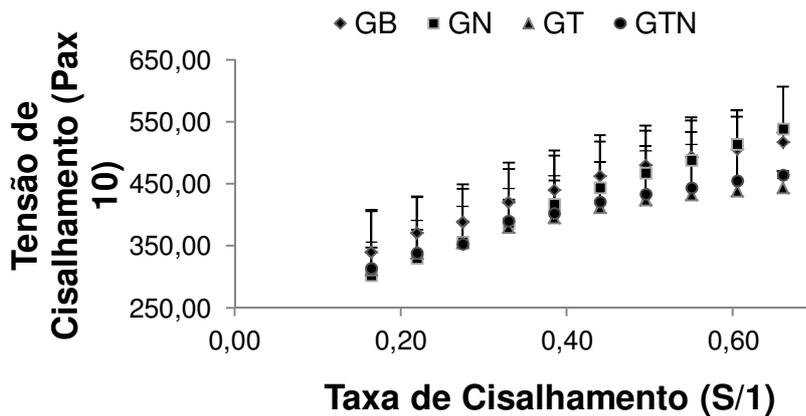


Figura 14: Perfil reológico das formulações de gel descritas pelo modelo de Casson.

O reograma (Figura 13) resultante da tensão de cisalhamento em função da taxa de cisalhamento apresentou-se como uma curva convexa devido à velocidade de deformação aumentar em proporções maiores que a tensão tangencial. Durante o ensaio estes fluidos perdem viscosidade com o aumento da taxa de cisalhamento (ALMEIDA E BAHIA, 2003).

Dentre os quatro modelos matemáticos que descrevem os materiais não-newtonianos, o maior coeficiente de regressão apresentado por todas as formulações de creme (com e sem ativos) foi para o modelo de Herschel-Bulkley (Tabela 8).

Tabela 8: Coeficiente de regressão (r^2) para os modelos de fluxo da triplicata dos lotes dos cremes (CB, CT, CN e CNT)

Formulação	Bingham	Casson	Ostwald	Herschel-Bulckley
CB	0,979 ± 0,01	0,994 ± 0,08	0,982 ± 0,01	0,995 ± 0,01
CT	0,973 ± 0,01	0,991 ± 0,10	0,989 ± 0,04	0,998 ± 0,03
CN	0,979 ± 0,01	0,992 ± 0,09	0,985 ± 0,03	0,998 ± 0,02
CTN	0,976 ± 0,01	0,993 ± 0,03	0,982 ± 0,07	0,996 ± 0,03

O modelo matemático de Herschel-Bulkley descreve um comportamento reológico do tipo pseudoplástico e é descrito pela Equação 2.

(Equação 2)

$$(\tau = \tau_0 + \kappa\dot{\gamma}^n)$$

Onde τ é a tensão de cisalhamento, τ_0 é a tensão de cisamento limite (Pa), η é a viscosidade, n é o índice de fluxo, κ é o índice de consistência ($\text{Pa}\cdot\text{s}^n$), $\dot{\gamma}$ é a taxa de cisalhamento, n é o índice da lei da potência (KIM et al., 2003).

O estudo do comportamento reológico pode fornecer variadas informações de formas farmacêuticas e cosméticas utilizadas topicamente, em principal, de suas propriedades estruturais (KORHONEN et al., 2000; GASPAR e CAMPOS, 2003). A determinação do comportamento reológico de formulações semissólidas, antes e após a incorporação de nanoestruturas é importante para avaliar o seu potencial na aplicação tópica (GUIMARÃES E RÊ, 2011), visto que a consistência dos produtos deve ser reproduzida a cada lote, assegurando assim, a qualidade tecnológica do produto acabado. Para um comportamento pseudoplástico a formulação deve apresentar valores de índice de fluxo (n) menores que 1, e quanto mais próximo de zero for o valor maior o comportamento pseudoplástico da formulação (ALMEIDA & BAHIA, 2003; PAESE, 2008).

O comportamento pseudoplástico é adequado e o mais desejado para produtos tópicos, pois sua viscosidade aparente diminui com o aumento da tensão, tornando-se mais fluida, facilitando seu escoamento, refletindo a facilidade de aplicação (CORRÊA et al., 2005; MORAIS et al, 2005).

Diversos estudos têm demonstrado que nanopartículas lipofílicas, ou nanopartículas de outras naturezas, não alteraram o comportamento reológico de formulações semissólidas (ALVES et al., 2007; PAESE, 2008; BRUSCHI, 2010). Entretanto a quantidade de lipídeos empregada pode ter influência na consistência destas (LIPPACHER et al., 2004). Nas formulações de creme estudadas no presente trabalho, a adição do insumo nanoestruturado não modificou o comportamento reológico dessas, entretanto, o índice de escoamento e a consistência foram alterados.

A Tabela 9 apresenta os índices de escoamento e os valores de consistência das formulações de creme estudadas.

Tabela 9. Índices de escoamento (n) e de consistência (K) das formulações dos cremes (CB, CT, CN e CTN)

Formulação	n^a	K (Pa. sⁿ)^a
CB	0,44 ± 0,01 ^b	35642 ± 9863 ^b
CT	0,65 ± 0,19 ^{cf}	23779 ± 1269 ^{cf}
CN	0,83 ± 0,08 ^d	18070 ± 9328 ^{de}
CTN	0,67 ± 0,12 ^f	18450 ± 1011 ^{de}

^a de acordo com o modelo Herschel-Bulkley. Letras diferentes nas colunas indicam diferença significativa ($p < 0,05$) por ANOVA, pós teste de Tukey.

Os índices de fluxo foram significativamente diferentes (ANOVA, $p < 0,05$) para as formulações contendo IN em relação as que não continham e não observou-se diferença no índice de fluxo entre as formulações CT e CTN, demonstrando que tanto o IN quanto a TTN modificam o fluxo de escoamento dos cremes preparados neste trabalho. Quanto aos valores de consistência, verificou-se diminuição significativa ($p < 0,05$) quando o IN foi adicionado nos cremes. A presença da TTN também reduziu a consistência dos cremes. Não foi observado alteração na consistência entre as formulações CN e CTN.

Para as formulações de gel, através da realização de modelagem matemática, o modelo de reologia que apresentou-se mais adequado foi o plástico, do tipo Casson, determinado através dos coeficientes de regressão apresentados para cada formulação (Tabela 10). A adição dos ativos IN e TTN no gel base não tiveram influência sobre o seu perfil reológico, o qual manteve-se inalterado (Figura 14).

Tabela 10: Coeficiente de regressão (r) para os modelos de fluxo da triplicata dos lotes das formulações de gel

Formulação	Bingham	Casson	Ostwald	Herschel-Bulckley
GB	0,980 ± 0,06	0,995 ± 0,06	0,989 ± 0,01	0,993 ± 0,02
GT	0,988 ± 0,13	0,995 ± 0,10	0,981 ± 0,08	0,992 ± 0,04
GN	0,989 ± 0,24	0,995 ± 0,04	0,985 ± 0,03	0,998 ± 0,02
GTN	0,996 ± 0,04	0,998 ± 0,83	0,982 ± 0,07	0,996 ± 0,03

Embora a maioria dos estudos reológicos realizados com géis de carbopol apresentarem comportamento pseudoplástico, há relatos na literatura de géis com comportamento reológico do tipo plástico. PAVELIC e colaboradores (2001) incorporaram lipossomas de calceína em gel de Carbopol[®] dos tipos 974P NF e 980 NF. Ambos os géis apresentaram comportamento reológico plástico antes e após a incorporação dos lipossomas, sendo que para o gel de Carbopol[®] do tipo 974P NF o modelo matemático apresentado foi Casson e para o tipo 980 NF foi modelado como plástico de Bingham.

MILÃO (2003) realizou um estudo reológico de hidrogéis onde foi verificado comportamento plástico e, após a incorporação de suspensão de nanocápsulas de diclofenaco o perfil reológico não sofreu alteração. ALVES e colaboradores (2005) incorporaram nanocápsulas, nanoesferas e nanoemulsões de nimesulida em gel de carbopol. A modelagem matemática determinada pelo melhor coeficiente de regressão caracterizou para os géis contendo nanocápsulas e nanoesferas de nimesulida um comportamento reológico do tipo plástico de Casson, embora, os reogramas tenham sido ajustados pelo modelo pseudoplástico de Ostwald. OURIQUE e colaboradores (2011) desenvolveram hidrogéis contendo ou não nanocápsulas poliméricas contendo tretinoína e concluíram que a adição das nanopartículas estudadas não altera o comportamento reológico dos géis. Os resultados obtidos pelos autores citados acima, corroboram os resultados obtidos para os géis estudados neste trabalho que apresentaram comportamento reológico semelhante.

As formas farmacêuticas para administração dérmica devem apresentar alta viscosidade e um comportamento de fluidez plástica para auxiliar em uma melhor

aderência sobre a pele durante um tempo suficiente para ação do produto. Além disso, o comportamento plástico apresenta importância em formulações dermocosméticas, pois a resistência ao fluxo é baixa (WELING-BERGER, et al., 2001; ALVES et al., 2005), garantindo assim uma boa espalhabilidade da formulação quando aplicada sobre a pele. Dessa forma, verifica-se que as formulações apresentaram perfil reológico adequado à aplicação tópica. Formulações semissólidas de caráter hidrofílico, como o Carbopol[®], têm sido amplamente utilizadas como bases dermatológicas por apresentarem boa espalhabilidade, pouco sensorial oleoso e capacidade de veiculação para diferentes fármacos (CORRÊA et al., 2005).

As determinações das características reológicas das formulações semissólidas além de prever a espalhabilidade e aderência sobre a pele estão estreitamente relacionadas com o seu enchimento e sua retirada do material de acondicionamento, com a estabilidade física, com a liberação do fármaco a partir da formulação semissólida e, conseqüentemente com a biodisponibilidade biológica (MARTIN et al., 1993; WELING-BERGER, et al., 2001).

5.2.7 Análise de fenômenos de instabilidade pela técnica de espalhamento múltiplo de luz

A estabilidade física avaliada por analisador óptico (Turbiscan *LAB*[®]) mostra (Figura 15 a Figura 22) que as formulações preparadas neste estudo são relativamente estáveis, entretanto algumas formulações apresentaram tendência a algum tipo de instabilidade. Observando o gráfico referente ao CB (Figura 15) há um aumento do *backscattering* (*BS*) no topo e uma variação ao longo da cubeta, indicando discreta tendência à cremagem e variação no tamanho de partícula.



Figura 15: Gráfico de variação de *backscattering* da formulação CB.

Essa variação no tamanho de partícula poderia ser explicada pelo fenômeno de maturação de Ostwald, uma vez que pela técnica de espalhamento múltiplo de luz, partículas com diâmetros maiores que 600 nm, (como no caso do creme) que apresentam uma diminuição no *backscattering*, considera-se um aumento de tamanho de partícula (TAYLOR, 1998). No caso da análise em questão, a formulação demonstrou um aumento no *backscattering*. Oscilações com aumento e diminuição de *backscattering* simultaneamente, podem indicar alterações no diâmetro de partícula, havendo presença tanto de partículas da ordem de nanômetros como da ordem de micrômetros. Entretanto, essa alteração nos diâmetros não é significativa uma vez que a porcentagem apresentada é de aproximadamente 5%.



Figura 16: Gráfico de variação de *backscattering* da formulação CN.

Segundo CELIA et al., variações do tamanho de partículas ocorre quando o perfil de retroespalhamento está dentro do intervalo de $\pm 2\%$. Variações superiores a 10%, positivas ou negativas na escala gráfica de retroespalhamento são representativos de uma formulação instável.

A Figura 16 apresenta o gráfico referente a formulação CN analisadas por espalhamento múltiplo de luz. Observa-se um aumento do *backscattering* no topo da cubeta e diminuição na base, indicando leve tendência a cremagem. Também há uma leve variação ao longo da cubeta, indicando migração de partículas. A variação do *backscattering* foi menor que 5% indicando estabilidade do sistema.

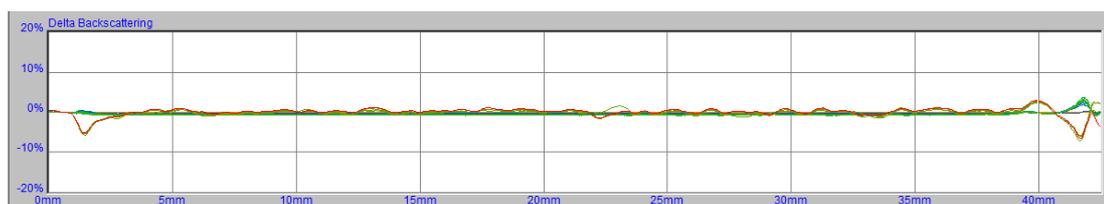


Figura 17: Gráfico de variação de *backscattering* da formulação CT.

Observa-se na Figura 17, para a formulação CT, que nos primeiros tempos de análise há um aumento do *backscattering* no topo e na base da cubeta representando uma leve tendência a cremagem (fenômeno reversível das gotículas da fase interna). No meio da cubeta observa-se uma variação do *BS* ao longo dos dias indicando variação do tamanho de partícula. Uma hipótese para explicar essa variação do *BS* no meio da cubeta, seria que a tretinoína por ser um sólido poderia estar sedimentando, não representando assim variação no tamanho de partículas, mas sim a sedimentação dos sólidos incorporados. A presença dessa variação também pode ocorrer quando há presença de diminutas bolhas, que em um sistema opaco como a formulação de creme torna-se difícil de ser visualizada a olho nú.

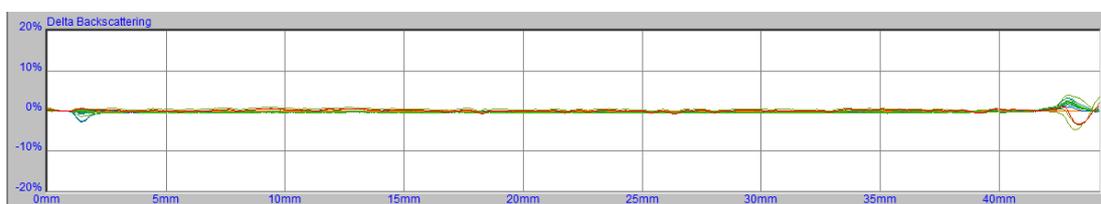


Figura 18: Gráfico de variação de *backscattering* da formulação CTN.

Na Figura 18 referente à formulação CTN, observa-se uma tendência à cremagem e com o decorrer das análises diárias, uma provável tendência à sedimentação indicada por uma diminuição do *backscattering* no topo da cubeta. Esse fenômeno poderia ser explicado pela adição de partículas sólidas de tretinoína, as quais poderiam estar precipitando. Contudo, as variações não foram superiores a 5%, podendo se considerar que a formulação é estável, além de possuir um melhor perfil quando esse é comparado aos perfis das formulações anteriores, sugerindo uma melhor estabilidade do produto.

A Figura 19 apresenta o gráfico de variação do *backscattering* para a formulação GB.

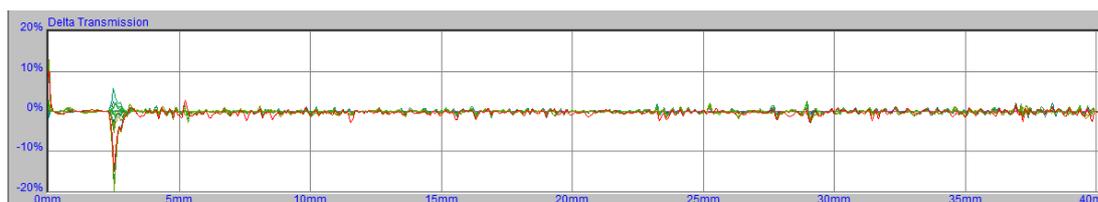


Figura 19: Gráfico de variação de transmitância da formulação GB.

Nesta formulação verifica-se que o sinal de transmissão (T) não é nulo e, portanto, a reflexão da luz atravessa a parede do frasco contendo a amostra, sendo justificado pela transparência do gel base. Para esses casos somente os sinais de T deverão ser avaliados (LEMARCHAND et al., 2003). A ocorrência de transmissão do feixe através desta formulação se deve a seu aspecto translúcido e incolor.

As análises realizadas com o GB não apresentaram nenhuma tendência significativa à desestabilização, uma vez que as variações da transmissão foram de baixa intensidade e que estas pequenas variações na base da cubeta poderiam derivar de diminutas bolhas de ar comumente presente em géis. PAESE (2008) verificou variação na transmissão relatando a presença de bolhas na amostra.



Figura 20: Gráfico de variação de *backscattering* da formulação GT.

Para a formulação de gel contendo TTN – GT - (Figura 20), a qual apresenta coloração levemente amarelada, com aspecto entre translúcido e opaco não houve passagem de luz através da amostra, sendo analisado o retroespalhamento. A amostra apresentou uma discreta diminuição do *backscattering* no topo da cubeta representando leve tendência à sedimentação, a qual pode ser atribuída às partículas dispersas de tretinoína, ou de diminutas bolhas de ar presentes no gel.



Figura 21: Gráfico de variação de *backscattering* da formulação GN.

As análises realizadas com as formulações de gel contendo insumo nanoestruturado (Figura 21), que apresentaram-se com aspecto opaco médio e de coloração branca, apresentaram sinais de retroespalhamento no gráfico obtido pela

análise de espalhamento múltiplo de luz (Figura 21). A estabilidade pode ser considerada adequada para formulação, uma vez que a mesma apresentou apenas uma discreta variação (menor que 5%) no *BS*, sendo esse apenas no topo da cubeta, o qual pode ser atribuído a bolhas ou ainda a um menisco irregular.

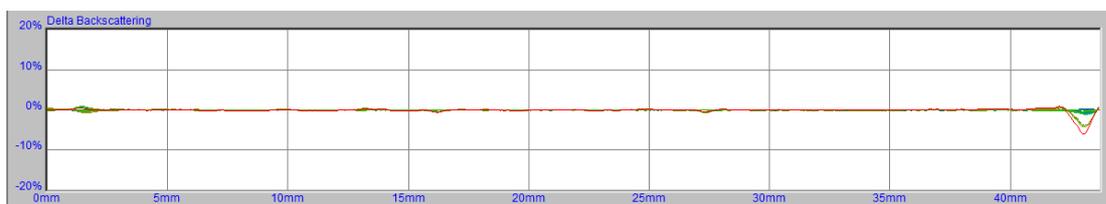


Figura 22: Gráfico de variação de *backscattering* da formulação GTN.

Através da avaliação do gráfico da análise de estabilidade da formulação GTN (Figura 22), observou-se que nos primeiros tempos de análise houve um aumento do *BS* no topo da cubeta, com sinal de retroespalhamento de luz, e nos sequenciais, uma diminuição do *BS*, contudo, a variação não foi superior a 5%, demonstrando estabilidade da formulação.

Mediante a análise dos gráficos obtidos pelo equipamento Turbiscan LAb[®] sugere-se que a adição do IN no gel tenha conferido melhor homogeneidade do sistema, uma vez que as maiores variações de retroespalhamento ou transmitância foram para as formulações sem o insumo. Sugere-se neste trabalho algumas possíveis hipóteses:

- a) O insumo nanoestruturado por conter tensoativo, poderia conferir maior estabilidade à formulação
- b) A presença do líquido (IN) pode ter ocupado lugar de diminutas bolhas de ar presente na rede do gel no momento em que a formulação foi adicionada à cubeta, apresentando assim, um perfil com menores variações
- c) As nanopartículas pelo seu tamanho submicrométrico expõem grande superfície de contato entre as gotículas do creme facilitando seu deslizamento, e conseqüentemente um preenchimento de espaço entre as gotículas dispersas do creme e os ativos.

5.3 Avaliação *in vitro* da permeação e penetração/retenção cutânea da tretinoína a partir das bases semissólidas

Fatores como a escolha da membrana e do meio receptor, responsável por solubilizar o fármaco na concentração utilizada, são de grande importância para o sucesso de experimentos de permeação cutânea (SHAH et al., 1994). O meio receptor que melhor atendeu às condições necessárias para a execução do estudo proposto foi a solução composta por tampão PBS pH 7,4 e etanol (70:30, v/v) (USP, 2006). De acordo com o FDA (FDA/CDER, 1997), quando são testadas substâncias muito lipossolúveis, como no caso a TTN que apresenta um LogP de aproximadamente 5 (DRUGBANK, 2012), é permitido o uso de soluções hidroalcoólicas como meios receptores para estudos de liberação *in vitro*.

Foi observado nesse estudo que não houve permeação cutânea da TTN a partir das formulações semissólidas testadas com ou sem insumo nanoestruturado, no tempo de 12 horas, pois, através da quantificação do meio receptor não foi detectada a presença da TTN nem de produtos de degradação desta, como a isotretinoína. Este resultado mostra que a presença do insumo nanoestruturado não favoreceu a permeação dessa substância no tempo e condições utilizadas neste estudo. Em vista do potencial tóxico da TTN via sistêmica é importante que esta não tenha sido detectada no meio receptor, o qual representaria a chegada do fármaco na circulação sanguínea.

Em um estudo de permeação da tretinoína e isotretinoína em pele de ratos, realizado por MOGHIMI e colaboradores (2004), foi relatada uma baixa permeação da tretinoína, pois esta não foi detectada no meio receptor. JENNING e colaboradores (2000b) estudaram a permeação da dispersão do retinol em NLS, em 24 horas de experimento as concentrações de retinol estavam abaixo do limite de quantificação. Os autores explicaram que a alta lipofilia do retinol preveniu a sua difusão pela pele impedindo que chegasse até o meio receptor. Diferentemente de JENNING e colaboradores (2000b) neste trabalho optou-se por estudar a permeação da TTN um período menor (12h), devido esta ser substância fotoinstável, prevenindo dessa forma a degradação da mesma.

Como parte dos resultados para o estudo de penetração cutânea da TTN, a Figura 23 apresenta o gráfico da distribuição da tretinoína nas diferentes camadas

de *tape stripping* (representantes das camadas do estrato córneo) a partir das formulações CTN e CT.

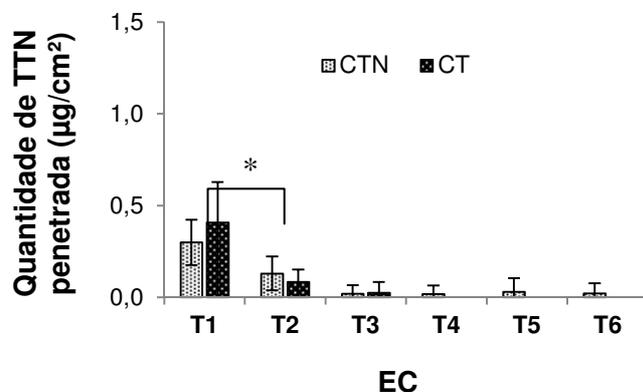


Figura 23: Distribuição da TTN ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) nas camadas de *tape* no EC, a partir de CTN e CT, através da técnica do *tape stripping* (n=6).

* significativo para $p < 0,05$.

Observa-se na Figura 23 que não há barra do gráfico representando as camadas de *tape* T4, T5 e T6 para CT. Isso porque a concentração de TTN que foi detectada nesses grupos de *tape* estava abaixo do LQ ($< 0,0495 \mu\text{g}$), logo não puderam ser representadas graficamente. Para as camadas de *tape* onde a concentração de TTN pode ser quantificada (dentro do LQ) foram avaliadas estatisticamente par a par (T1 - CT *versus* T1 - CTN; T2 - CT *versus* T2 - CTN e T3 - CT *versus* T3 - CTN) e verificou-se diferença significativa ($p < 0,05$) na quantidade de TTN presente na camada de *tape* 1 de GT e GTN em relação às demais camadas de *tape* (T2, T3, T4, T5 e T6). Contudo, verifica-se maior propensão da TTN em ficar retida mais superficialmente no EC a partir das formulações de creme. Apesar de não haver diferença significativa na concentração de TTN entre os demais grupos de *tape* (T2 a T6) e derme e epiderme, sugere-se que a presença do insumo nanoestruturado presente na formulação CTN pode ter contribuído para uma penetração mais profunda da TTN nas camadas do EC, mesmo que em quantidades muito pequenas.

Conforme já mencionado, a técnica de *tape stripping* permite determinar a distribuição de fármacos nas diferentes camadas do estrato córneo. (TOUITOU et

al., 1998; VERMA & FAHR, 2004). O experimento deste trabalho foi planejado, através da divisão das 18 fitas de *tape* em 6 grupos, com a finalidade de verificar modificações da penetração/retenção da TTN nas diversas camadas do EC.

Ainda no experimento de penetração cutânea da TTN, obtiveram-se como resultado a detecção de concentrações de TTN ligeiramente abaixo do LQ nas camadas derme e epiderme para ambas as formulações de creme estudadas, mostrando uma redução do fluxo do fármaco para as camadas subjacentes ao EC.

A maior quantidade de TTN na camada mais externa (EC) pode ser explicada pela maior semelhança da a TTN, com LogP próximo a 5 (alta lipofilia), pela camada córnea, de constituição lipídica

Diversos autores relatam que uma redução no fluxo de um fármaco lipofílico, através da pele e a sua chegada até a derme, em estudos *in vitro* pode representar baixa ou nenhuma permeação, sendo importante no caso da TTN a qual apresenta potencial de toxicidade sistêmica (BRISAERT e PLAIZIER-VERCAMMEN, 2000; MOSER et al., 2001; ZHAI & MAIBACH, 2004; CHIVOT, 2005). A presença da TTN na epiderme (EC e epiderme viável) e derme é interessante quando se trata de retinóides, pois estes desempenham sua função antifotoenvelhecimento nessas camadas (DRAELOS, 2005). Segundo SILVA & BARBOSA (2008) a nível epidérmico atuam como estimulante da proliferação e diferenciação dos queratinóticos e na derme fazem a dilatação dos vasos sanguínea associada à angiogênese e ao aumento da síntese de colágeno nas papilas dérmicas.

A fim de melhor demonstrar as quantidades de TTN no EC (determinadas através da técnica de *tape stripping*) foram somadas as concentrações de TTN ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) quantificadas nas camadas de *tape* T1 a T6, para ambas as formulações e representou-se graficamente através da Figura 24.

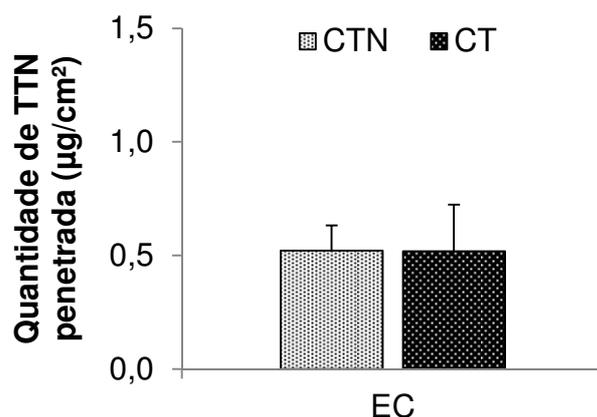


Figura 24: Distribuição da TTN ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) no estrato córneo, a partir de CTN e CT, através da técnica do *tape stripping* (n=6).

A figura permite corroborar não haver diferença significativa entre as formulações de creme ($p = 0,1388$). As quantidades de TTN penetrada no EC para as formulações foram: $0,520 \pm 0,1$ e $0,517 \pm 0,2$ $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ para CTN e CT respectivamente. Em vista destes resultados, reforça-se a hipótese de que a TTN teria uma maior tendência a ficar retida mais superficialmente.

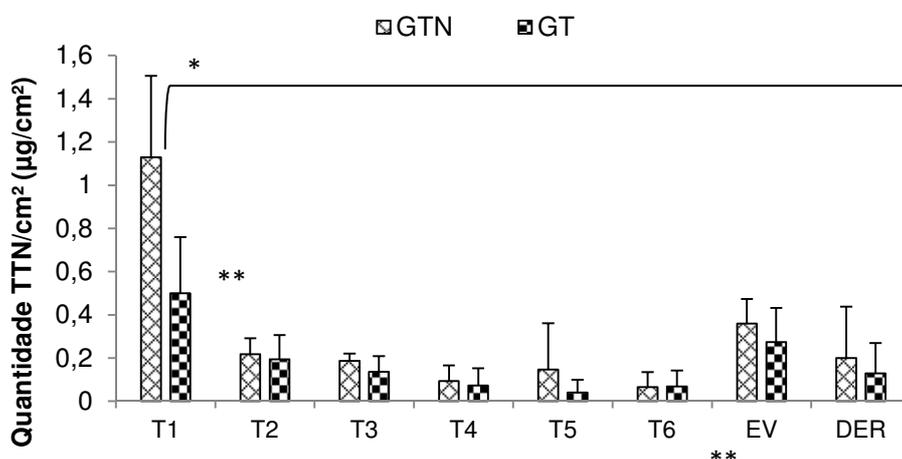
Em relação ao percentual de TTN recuperada entre o início e o final do experimento foi de 81% e 80% para CTN e CT respectivamente. O percentual de TTN que penetrou no EC foi de $0,520 \pm 0,3$ % para CTN e $0,520 \pm 0,28$ % para CT. Segundo ANVISA no Parecer nº 4, de 21 de dezembro de 2010 (atualizado em 05/07/2011) a absorção percutânea do ácido retinóico, quando utilizado em cremes a 0,05% é de aproximadamente 2% corroborando o resultado apresentado neste estudo.

JENNING e colaboradores (2000b) estudaram a permeação do retinol em NLS incorporadas em creme O/A em comparação com nanoemulsão de retinol. Após 6 horas de experimento encontraram maior quantidade de fármaco nas camadas mais superiores, reduzindo a quantidade na chegada a derme. Os autores relatam esse fato como uma vantagem na prevenção da chegada do fármaco para o meio receptor, onde não foram encontradas quantidades de retinol após 48 horas de experimento. Embora as quantidades de TTN encontradas na derme, neste trabalho, estejam abaixo do LQ, os resultados de JENNING e colaboradores corroboram os

resultados deste trabalho, uma vez que na derme havia pouca quantidade do fármaco não chegando ao meio receptor.

Os dados (não mostrados) obtidos no estudo de permeação cutânea da TTN a partir das formulações de gel mostraram que não houve permeação do fármaco estudado no tempo de 12 horas, pois nos cromatogramas referentes não foi detectada a presença de TTN nas amostras do meio receptor.

A Figura 25 apresenta os resultados da penetração e retenção cutânea da TTN sendo demonstrada a distribuição da TTN nas diferentes camadas da pele, a partir das formulações de gel, sendo explorada a distribuição do fármaco no EC pelos grupos de *tape*.



EV = Epiderme viável; DER = derme.

Figura 25: Distribuição da TTN ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) nas diferentes camadas da pele, a partir de GTN e GT, através da técnica de *tape stripping* e retenção cutânea (n=6).

* significativo para $p < 0,05$.

É observado que dentre as camadas de *tape* avaliadas (T1 a T6) houve diferença estatística significativa na quantidade de TTN penetrada entre os grupos, sendo maior no grupo T1 – GTN em relação ao grupo T1 - GT ($p = 0,071$) e em relação a todos os outros grupos de *tape*: (T1 – GTN > T2, T3, T4, T5 e T6 – GT e GTN) e às camadas epiderme viável (EV) e derme (DER) da formulação GT (T1 – GTN > EV - GT e DER – GT). O grupo de *tape* T1 – GT apresentou diferença

significativa na quantidade de TTN penetrada apenas para T5 da mesma formulação (GT). Observa-se ainda, uma redução gradativa do fluxo do fármaco para as camadas mais profundas do EC, mas que aumenta na epiderme viável fazendo-se presente também na derme.

JENNING e colaboradores (2000b) estudaram a permeação de nanoemulsão e NLS de retinol. Após 6 horas de experimento observaram uma maior concentração de retinol nas camadas superiores da pele para em comparação com nanopartículas de retinol livre. Assim como neste trabalho, as quantidades de fármaco nas camadas mais profundas eram menos pronunciadas em relação às primeiras camadas. Os autores sugerem que assim como para a dispersão de NLS, as nanopartículas do gel teriam uma penetração folicular ou a aderência das partículas para a camada córnea, fazendo com que o fármaco ficasse em maior quantidade nas camadas superiores.

A fim de melhor poder comparar as quantidades de TTN penetrada nas camadas da pele, plotou-se em gráfico o EC (somatório das camadas de tape T1 a T6), a epiderme viável e a derme, sendo representada a distribuição do fármaco pela Figura 26.

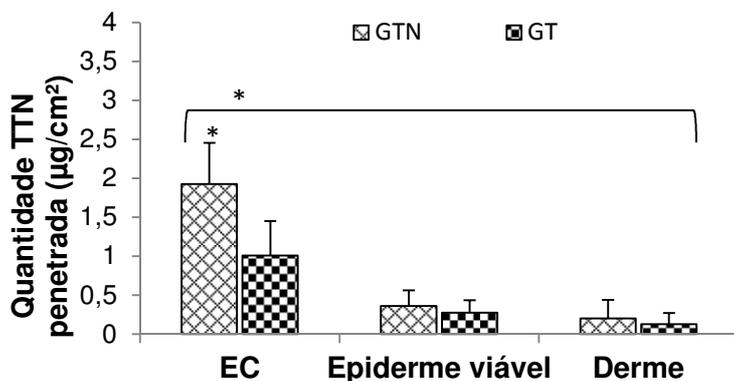


Figura 26: Distribuição da TTN ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) nas diferentes camadas da pele, a partir de GTN e GT, através da técnica do *tape stripping* (n=6).

* significativo para $p < 0,05$.

Verifica-se que houve diferença estatística na quantidade de TTN ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) presente no EC total em relação às demais camadas, sendo maior na formulação GTN em relação a GT (GTN > GT). As quantidades de TTN ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)

presentes na epiderme viável e derme não foram significativamente diferentes ($p > 0,05$) entre elas, apontando que a TTN se distribuiu de forma semelhante nessas camadas independente da presença do IN. A figura também mostra que há maior quantidade de TTN ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) no estrato córneo, mas que vai se diluindo para as camadas subjacentes (epiderme e derme), para ambas as formulações.

Mediante a observação dos resultados apresentados para as formulações de gel sugere-se que a adição do insumo nanoestruturado não modificou o perfil de penetração da TTN a partir da formulação de gel. No entanto, sugere-se que a maior quantidade de TTN ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) presente no EC a partir da formulação contendo o IN em relação a formulação sem o mesmo, deriva de uma afinidade da TTN pelas nanopartículas, ou pelo tensoativo que as estabilizam, e que quando presentes no gel hidrofílico, na qual os ativos não tem afinidade, este tende a favorecer a retenção da TTN no estrato córneo.

Diversos autores relatam que uma redução no fluxo de um fármaco lipofílico, através da pele e a sua chegada até a derme, em estudos *in vitro* pode representar baixa ou nenhuma permeação, sendo importante no caso da TTN a qual apresenta potencial de toxicidade sistêmica (BRISAERT e PLAIZIER-VERCAMMEN, 2000; MOSER et al., 2001; ZHAI & MAIBACH, 2004; CHIVOT, 2005). A presença da TTN na epiderme (EC e epiderme viável) e derme é interessante quando se trata de retinóides, pois estes desempenham sua função antifotoenvelhecimento nessas camadas (DRAELOS, 2005).

Quanto ao percentual de TTN recuperado após os experimentos, verificou-se uma recuperação de 84% para GTN e 94% para GT, sendo que $4,69 \pm 1,68$ e $2,08 \pm 0,39$ foram os percentuais de TTN que penetraram nas camadas da pele para as formulações GTN e GT, respectivamente.

A fim de comparar a distribuição da TTN a partir das diferentes bases (GTN versus CTN e GT versus CT), realizou-se análise estatística através de ANOVA de duas vias com pós-teste de Bonferroni, representados pela Figura 27 para o estrato córneo.

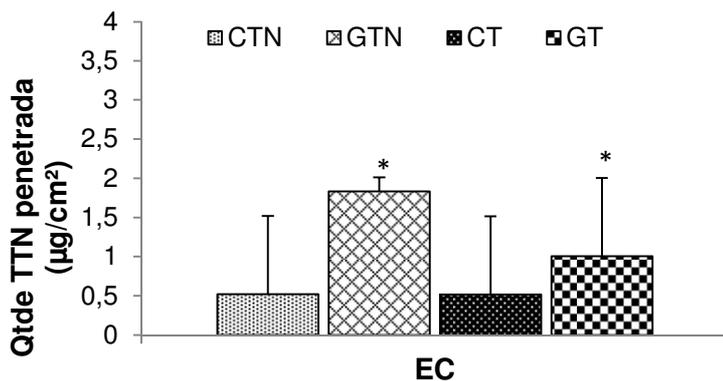


Figura 27: Distribuição da TTN ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) no estrato córneo a partir das formulações de gel e creme (n=6).

* significativo para $p < 0,05$.

Foi observada diferença estatística significativa ($p > 0,05$) na quantidade de TTN ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) distribuída no EC. A figura mostra claramente a diferença na quantidade de TTN penetrada a partir das formulações de gel em relação às formulações de creme, independente da presença do IN.

A Figura 28 apresenta os resultados da distribuição da TTN nas diferentes camadas do estrato córneo (T1 a T6) a partir das formulações semissólidas de gel e creme.

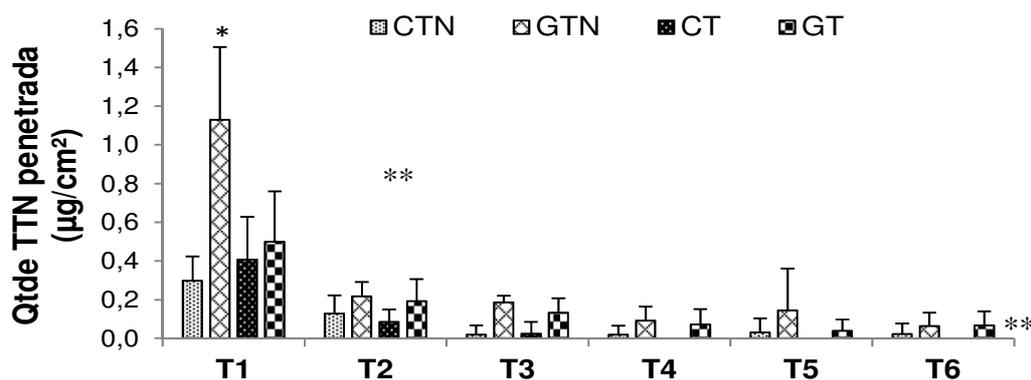


Figura 28: Distribuição da TTN ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) nas camadas de *tape*, do EC a partir das formulações de gel e de creme (n=6).

* significativo para $p < 0,05$.

Observa-se diferença estatística significativa apenas na quantidade de TTN ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) presente na primeira camada de *tape* (assim como houve para o EC), estando em maior quantidade nesta camada para a formulação GTN em relação a formulação CTN. As camadas epiderme e derme não puderam ser comparadas devido a impossibilidade de quantificação da TTN nessas camadas para as formulações de creme.

Esse perfil de distribuição do gel, diferente daquele apresentado pela formulação de creme, pode ser devido ao caráter mais hidrofílico que a formulação apresenta. Na presença do gel (hidrofílico) a tretinoína (lipofílica) e as nanopartículas (lipofílicas), apresentam uma maior propensão a se difundir para a pele, devido a afinidade química (lipofilia). Já no creme, a maior afinidade dos insumos é pela formulação, o que pode ter diminuído sua difusão para pele e conseqüentemente reduzido as quantidades de ativo liberadas.

Ainda, no presente trabalho, foi observado que a presença de um insumo nanoestruturado foi capaz de modificar o perfil de distribuição da tretinoína na camada córnea nos experimentos *in vitro* (conforme observado principalmente nos resultados da primeira camada de *tape*). Possíveis explicações para esse resultado seriam:

- a) a presença das nanoestruturas aumenta o fluxo de penetração da formulação na pele;
- b) a tretinoína, devido ao seu caráter altamente lipofílico, associa-se físico-quimicamente às nanoestruturas, ou a cauda lipofílica do tensoativo que as estabilizam, tendo a sua penetração facilitada pelas mesmas;
- c) as nanopartículas formaram uma barreira oclusiva e de hidratação para a pele, deixando-a mais propícia à penetração de ativos como a tretinoína.

A menor penetração da TTN a partir das formulações de creme pode ser explicada a partir de um estudo com retinol realizado por JENNING e colaboradores (2000b) onde fase oleosa do creme foi considerada como um bom solvente para vitamina A, tornando a atividade termodinâmica do retinol mais baixa e reduzindo conseqüentemente a penetração do fármaco. Além disso, o estrato córneo e sua estrutura compacta constitui o principal obstáculo para penetração de compostos aplicados topicamente na pele (HADGRAFT, 2001; TING et al., 2004).

Em 1996, SANTOYO e colaboradores observaram que a liberação *in vitro* de piroxicam diminuía quando a concentração de propilenoglicol na formulação aumentava. O propilenoglicol era um excipiente da formulação que agia como solubilizador. A formulação onde o piroxicam encontrava-se em concentração próxima a saturação (menor quantidade possível de propilenoglicol adicionada), e logo, com maior atividade termodinâmica, foi a que demonstrou maior liberação *in vitro* (SANTOYO et al., 1996).

Essas hipóteses apresentadas sugerem maiores investigações uma vez que neste trabalho a TTN não está nanoencapsulada e não se encontrou na literatura estudos de fármacos livres incorporados em formulações semissólidas contendo nanopartículas para comparar com este trabalho.

5.4 Estudo de liberação da TTN *in vitro*

Para avaliar se a hipótese de que há uma maior penetração da tretinoína nas camadas da pele a partir dos géis em comparação com os cremes devido a maior liberação do fármaco das bases é verdadeira, estudos de liberação *in vitro* empregando membranas de diálise foram realizados. Após as 12 horas do experimento de liberação da TTN foi possível determinar o percentual de tretinoína liberado a partir das formulações semissólidas. A Figura 29 representa graficamente o percentual de liberação da TTN a partir das formulações CTN e CT após 12 horas de experimento.

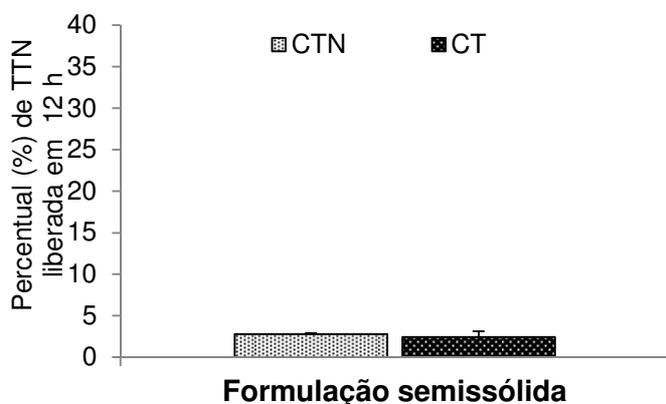


Figura 29: Percentual (%) de liberação da TTN a partir das formulações CTN e CT.

Observa-se que a quantidade total de TTN liberada no tempo de experimento foi relativamente baixa (CT = $2,42 \pm 0,72$ % e CTN = $2,79 \pm 0,12$ %) não sendo possível construir um perfil de liberação. Utilizou-se dos mesmos resultados para a construção de gráficos da concentração *versus* tempo ($\mu\text{g}/\text{cm}^2 \times t(\text{h})$), onde foi traçada uma linha de tendência que permitiu observar fraca correlação entre as variáveis quantidade de TTN ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) e tempo (h). O coeficiente de correlação médio para a formulação CT foi igual a $0,725 \pm 0,13$ e para a formulação CTN $r = 0,212 \pm 0,05$. Com base no observado, optou-se por não expressar o valor de fluxo a partir desses dados. É possível observar que no tempo de experimento utilizado não houve diferença estatística ($p > 0,05$) no percentual de liberação da TTN entre as formulações de creme estudadas.

Foi verificado que as concentrações de TTN obtidas entre as triplicatas das amostras das coletas no meio receptor eram inconstantes para CT em relação a CTN e que calculando os valores numéricos de desvio-padrão estes apresentavam-se maiores. Diante disso, e de forma não usual, a partir dos resultados da liberação da TTN, (quantidade ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) *versus* tempo (h)), calculou-se a média dos valores numéricos de desvio-padrão para cada formulação de creme (Figura 30).

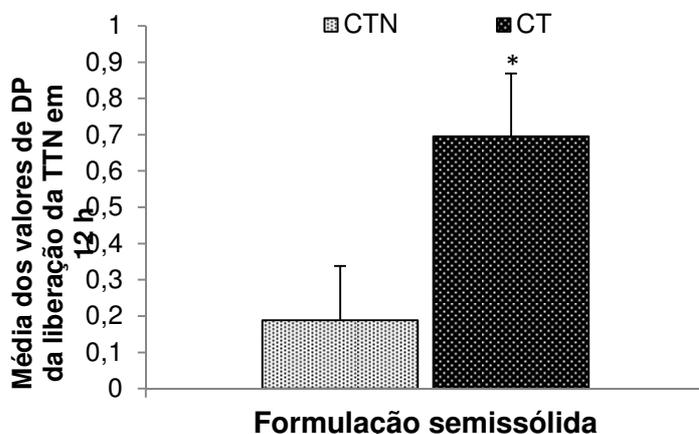


Figura 30: Representação gráfica da média de valores de DP obtidos na avaliação da liberação da TTN a partir das formulações CTN e CT.

* significativo ($p < 0,05$).

Através da análise estatística foi possível observar diferença estatística nos valores numéricos de desvio-padrão da formulação de creme sem insumo nanoestruturado (CT), em relação à formulação de creme contendo IN (CTN) ($p =$

$7,87 \times 10^{-5}$), sendo um menor valor médio de desvio-padrão encontrado para a formulação de creme contendo insumo nanoestruturado. Com base nessa observação sugere-se que a adição do insumo nanoestruturado, na formulação do creme contendo TTN, proporcionou uma liberação mais homogênea do fármaco incorporado na formulação semissólida. Segundo BOUCHEMAL e colaboradores (2004) sistemas nanométricos proporcionam uma liberação homogênea da substância encapsulada. Embora neste trabalho a TTN não esteja encapsulada no sistema nanométrico utilizado, acredita-se que este foi capaz de promover uma liberação homogênea da TTN. Na literatura não foram encontrados estudos prévios a este que avaliassem a homogeneidade da liberação de fármacos livres em presença de nanopartículas em uma mesma formulação semissólida.

O estudo de liberação da TTN também foi realizado para as formulações de gel, com os mesmos parâmetros utilizados para as formulações de creme. A Figura 31 representa o percentual de TTN liberado a partir das formulações GTN e GT após 12 horas de experimento.

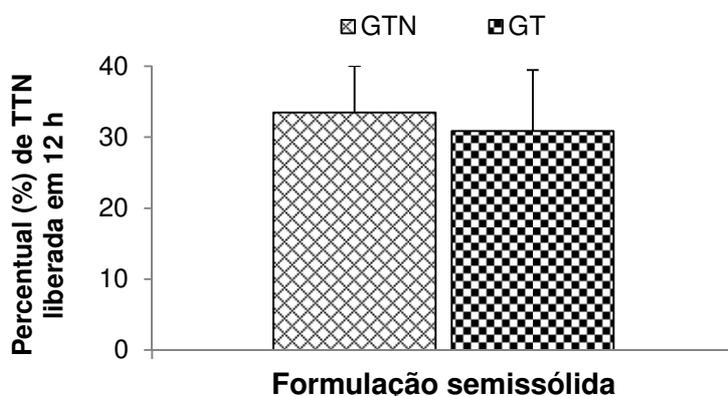


Figura 31: Representação gráfica do percentual de liberação de TTN a partir das formulações GTN e GT.

Mediante a representação gráfica acima verifica-se que não houve diferença estatística significativa ($p > 0,05$) no percentual de TTN liberado entre as formulações GT e GTN. Numericamente os percentuais de TTN liberado a partir de GT e GTN respectivamente são de $30,83 \pm 8,62$ e $33,42 \pm 6,62\%$.

Da mesma forma que para os cremes, os resultados dos géis foram empregados para a construção de gráficos da concentração *versus* tempo ($\mu\text{g}/\text{cm}^2 \times t(\text{h})$), onde foi traçada uma linha de tendência que permitiu observar forte correlação entre as variáveis quantidade de TTN ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) e tempo (h). O coeficiente de correlação médio (r) foi de $0,970 \pm 0,013$ e $0,963 \pm 0,01$ para GT e GTN respectivamente. A partir desses dados utilizando a primeira lei de Fick calculou-se o fluxo da TTN a partir das formulações de gel. Os valores médios encontrados foram de $1,68 \pm 0,53 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ para a formulação GT e de $1,85 \pm 0,40 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ para a formulação GTN. Através da análise estatística é possível constatar que não houve influência do insumo nanoestruturado no fluxo da TTN a partir das formulações de gel avaliadas ($p = 0,69$).

A partir dos resultados da liberação da TTN (quantidade ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) *versus* tempo (h) calculou-se também a média dos valores numéricos de desvio-padrão para cada formulação de gel. Ao contrário do observado anteriormente para as formulações de creme, não foi observada diferença estatística ($p = 0,79$) entre os valores numéricos de desvio-padrão entre os géis contendo e não contendo IN.

A Figura 32 apresenta o comparativo do percentual de TTN liberado a partir de todas as formulações semissólidas estudadas neste trabalho. A avaliação do comparativo de liberação da TTN a partir das formulações semissólidas de cremes e géis permite observar claramente a influência da base na liberação da TTN.

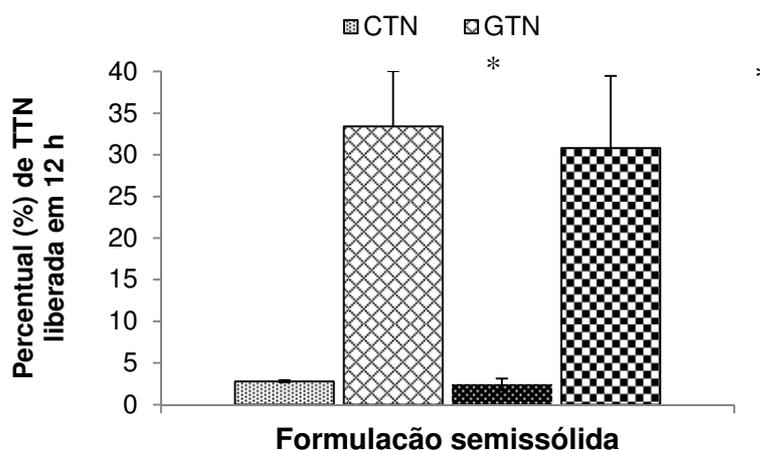


Figura 32: Representação gráfica comparativa do percentual de TTN liberada a partir das formulações semissólidas de cremes e géis.

Os resultados obtidos no estudo de liberação confirmam a hipótese levantada anteriormente, demonstrando que a maior distribuição cutânea da tretinoína a partir dos géis é explicada pela maior liberação do fármaco a partir da formulação semisólida.

Um estudo realizado por JENNING e colaboradores (2000a) o retinol foi nanoencapsulado e incorporado em uma formulação de gel. Após, os autores estudaram sua permeação em células de difusão tipo *Franz* durante 24 horas. É explicado que o gel espesso sobre a superfície da pele pode reduzir a perda de água transepidérmica e, reforçando a oclusão, permite a penetração mais profunda de retinol na pele. Os mesmos autores, em outro trabalho (JENNING et al., 2000b) estudaram a permeação de gel e creme contendo NLS de retinol. Um dos resultados comparativos demonstrou que a penetração na pele da TTN a partir do creme foi de apenas cerca de 35% em comparação com o gel. Como a fase de óleo da formulação atuou como um bom solvente para a vitamina A, a atividade termodinâmica do retinol era menor neste veículo. Por conseguinte, uma penetração reduzida, como observado, era esperada. A TTN é um derivado da vitamina A, ambas substâncias são altamente lipofílicas, além disso as formulações semissólidas utilizadas no trabalho de JENNING e colaboradores também foram géis e cremes. As explicações dos autores servem também para o presente trabalho.

A taxa de liberação de um fármaco a partir de determinada formulação depende diretamente das características físico-químicas do veículo e do fármaco (SANTOYO et al., 1996). A liberação de um fármaco a partir do veículo que o contém é prerrogativa para a penetração na pele. As principais características da formulação que irão governar essa etapa são a solubilidade do fármaco no veículo e a atividade termodinâmica. O fármaco deve estar disponível na superfície da pele para que haja difusão através do estrato córneo. Entretanto, uma vez disponível para penetração na superfície da pele, a penetração e a permeação irão depender da capacidade do fármaco de atravessar a camada córnea da pele, e de características como lipofilicidade e tamanho da molécula, além de modulação da formulação por meio da adição de promotores de penetração (BEM-VINDO, 2006) Os géis poliméricos pela sua constituição não permitem que fármacos se liguem ao polímero, tendo boa capacidade de liberação do fármaco nele incorporado, além

disso, os poros presentes permitem a difusão relativa de moléculas menores (AULTON, 2005).

6. Conclusões

As características físicas e físico-químicas avaliadas para o insumo nanoestruturado (IN) foram reproduzíveis nos lotes avaliados e apresentaram-se de acordo com o certificado de análise do fabricante. Foi possível caracterizá-lo como um nanomaterial e suas características viabilizaram sua incorporação em bases dermatológicas para a investigação do presente estudo;

As formulações semissólidas contendo os ativos mostraram características físico-químicas adequadas para aplicação cutânea. O comportamento reológico das formulações não foi afetado pela presença das nanopartículas. Entretanto, uma diminuição da consistência do gel foi observada. A presença do IN nas formulações de creme parece melhorar a estabilidade das formulações quando analisadas pela técnica de espalhamento múltiplo de luz (Turbiscan LAB);

Os ensaios de permeação cutânea da TTN permitiram verificar que esta não chega até o meio receptor, não havendo influência da presença do IN na permeação cutânea, independente do tipo de formulação. Esse resultado sugere uma segurança relativa desta estratégia de veiculação de fármacos em veículos que contenham partículas lipídicas nanoestruturadas quanto à absorção sistêmica;

Os ensaios de penetração cutânea em células de Franz a partir das formulações de creme demonstraram que a presença do insumo nanoestruturado levou a uma distribuição mais homogênea/constante do fármaco nas camadas do estrato córneo e que a quantidade de fármaco presente no estrato córneo é similar para as formulações de creme com ou sem insumo nanoestruturado;

Os resultados do estudo de penetração/retenção cutânea da TTN a partir das formulações de gel em células de Franz mostraram que o IN favorece uma maior retenção da TTN na camada mais superficial do estrato córneo, com redução do fluxo do fármaco para às camadas adjacentes;

A formulação do gel favoreceu uma liberação mais rápida do fármaco em relação à formulação do creme, não tendo relação com a presença do IN;

Os estudos de liberação *in vitro* da TTN em célula de Franz a partir das formulações semissólidas confirmam a influência do tipo de veículo/base utilizado para liberação da TTN, independente da presença do insumo nanoestruturado;

O conjunto dos resultados permitiu concluir que é possível associar tretinoína livre em formulações contendo nanopartículas sem que haja favorecimento da

permeação cutânea, mas que podem favorecer a maior homogeneidade de sua distribuição através do estrato córneo.

7.Referências

ABDI – Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial. **Panorama Nanotecnologia – Série Cadernos da Indústria**, p.182, 2010.

_____, **Cartilha sobre nanotecnologia**. Brasília, ABDI, 2010.

_____, **Nanotecnologias: subsídios para a problemática dos riscos e regulação**. Brasília, DF, 52 p, 2011.

ABIHPEC – II Caderno de Tendências 2010/2011 HPPC, n.2, v. 2, 2010. Disponível em: http://www.abihpec.org.br/conteudo/caderno_tendencias.pdf. Acesso em: 20 ago.2011.

ALMEIDA, M.M. Determinação e Quantificação das vitaminas C e E Associadas em Produtos Cosméticos. Dissertação de Mestrado, USP, 2008.

ALMEIDA, P.R. O Brasil e a nanotecnologia: rumo à quarta revolução industrial. **Revista Espaço Acadêmico**. N.52, 2005. Disponível em: <http://www.espacoacademico.com.br/052/52almeida.htm>. Acesso em: 20 Jan. 2013.

ALMEIDA, I.F.; BAHIA, M.F. Reologia: interesse e aplicações na área cosmético-farmacêutica. *Cosmetics & Toietries*. v.15, p.97-100, 2003.

ALMEIDA, J. S.; JEZUR, L.; FONTANA, M. C.; PEASE, K.; SILVA, C. B.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S.; BECK, R. C. R. Oil-based nanoparticles containing alternative vegetable oils (grape seed oil and almond kernel oil): preparation and characterization. **Latin American Journal of Pharmacy**, v.28, p.165-172, 2009.

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

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

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

ANSEL, H.C.; POPOVICH, N.G.; ALLEN, L.V. **Farmacotécnica: Formas Farmacêuticas & Sistemas de Liberação de Fármacos**. São Paulo: Editorial Premier, p. 568, 2000.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Brasília, DF, 2004.

_____, Parecer Técnico n. 4, 2010. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/b7ee140047f8ce26bcd7be9f306e0947/Parecer_n_4_etinoides.pdf?MOD=AJPERES. Acesso em: 20 dez. 2012.

_____, Bula do Profissional de Saúde. In: Bulário Eletrônico da ANVISA. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/bularioeletronico/>. Acesso em: 23 de janeiro de 2013.

AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2.ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

AUSTRIA R.; SEMENZATO, A.; BETTERO, A. Stability of Vitamin C Derivatives in Solution and Topical Formulations. **Journal Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 15, p. 795-801, 1997.

BARIL, M.B.; FRANCO, G.F.; VIANA, R.S.; ZANIN, S.M.W. Nanotecnologia aplicada aos cosméticos. **Visão Acadêmica**, v.13, p. 45 -54, 2012.

BARRATT, G.M. Therapeutic applications of colloidal drug carriers. **Pharmaceutical Science & Technology Today**, v.3, p.163-171, 2000.

BAWA, R.M.S.; MAEBIUS, S.J.D.; FLYNN, T.M.P.A.; WEI, C.M.D. Protecting new ideas and inventions in nanomedicine with patents. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v.1, ls.2, p.150-158, 2005.

BECK, R.C.R.; GUTERRES, S.; POHLMANN, A. Nanocosmetics and nanomedicines: new approaches for skin care” p.368, 2011

BRASIL. Resolução n° 899, de 29 maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos [Internet]. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Poder executivo, Brasília, DF, Diário Oficial da União, 02 jun 2003. Disponível em: https://anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm.

BRISAERT, M. G; PLAIZIER-VERCAMMEN, J. Investigation on the photostability of a tretinoin lotion and stabilization with additives. **International Journal of Pharmaceutics**, v.199, p 49-57, 2000.

BRITO, N. M.; JUNIOR, O. P. M.; POLESE, L.; RIBEIRO, M. L. Validação de métodos analíticos: estratégias e discussão. Pesticidas. **Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 13, p. 129-146, 2003.

BRUSCHI, M. Formulações tópicas contendo nanocápsulas de adapaleno: avaliação da estabilidade e permeação cutânea. **Dissertação de Mestrado**. Santa Maria, RS, 2010.

BULCÃO RP, FREITAS FA, VENTURINI CG, DALLEGRAVE E, DURGANTE J, GÖETHEL G, CERSKI CT, ZIELINSKY P, POHLMANN AR, GUTERRES SS, GARCIA SC. Acute and Subchronic Toxicity Evaluation of Poly(ϵ -Caprolactone) Lipid-Core Nanocapsules in Rats. *Toxicological Sciences*, v. 132, p. 162 – 176, 2012

CELIA C, TRAPASSO E, COSCOA D, PAOLINOC D, FRESTA M. Turbiscan Lab® Expert analysis of the stability of ethosomes® and ultradeformable liposomes containing a bilayer fluidizing agent. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v.72, p. 155–160, 2009.

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

CHEN, J.; DAVIS, S. S. The release of diazepam from poly(hydroxybutyrate-cohydroxyvalerate) microspheres. **Journal of Microencapsulation** v. 19, n. 2, p. 191-201, 2002.

CONTRI, R. V.; KATZER, T.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S.S. Chitosan hydrogel containing capsaicinoids-loaded nanocapsules: an innovative formulation for topical delivery. **Soft Materials**, v.8, p.370-385, 2010

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

COUVREUR, P., BARRATT, G., FATTAL, E., LEGRAND, P., VAULTIER, C., Nanocapsule technology. A review. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**. 19, p. 99 – 134, 2002.

DALCIN, K.B.; SCHAFFAZICK, S.R.; GUTERRES, S.S. **Caderno de Farmácia**, v. 19, n. 2, p. 69-79, 2003

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

DRAELOS, Z. D. **Cosméticos em dermatologia**. 2.ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2005.

DRUGBANK. Disponível em: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00755>. Acesso em: 10 nov. 2012.

EMA - European Medicines Agency. http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/special_topics/general/general_content_000345.jsp&mid=WC0b01ac05800baed9. Acesso em 25 jan. 2013.

ERENO, D. Beleza fundamentada. Grupo de pesquisadores em conjunto com empresas prepara nanocosméticos com aplicações variadas. **Revista Fapesp**. Edição Impressa 146 - Abril 2008. Disponível em:

<http://www.revistapesquisa.fapesp.br/?art=3498&bd=1&pg=1>. Acesso em: 22/02/2012.

FABIAN, E.R.; LANDSIEDEL, L.; MA-HOCK, K.; WIENCH, W.; WOHLLEBEN, W.; RAVENSZWAAY, V.B. Tissue distribution and toxicity of intravenously administered titanium dioxide nanoparticles in rats. **Archives of Toxicology**, v.82, p. 151–157, 2008.

FARAGE, M.A.; MILLER, K.W.; ELSNER, P.; MAIBACH, H.I. Intrinsic and extrinsic factors in skin ageing: a review. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 30, p.87–95, 2008.

FDA – **Food and Drug Administration**. NTP Technical Report on the Photocarcinogenesis Study of Retinoic Acid and Retinyl Palmitate, 2012a.

FDA – **Food and Drug Administration**. Guidance for Industry. 2012b.

FISHER, G.J; XU, Y. Ultraviolet (UV) light irradiation induced signal transduction in skin photoaging. **Journal of Dermatological Science Supplement**, v.1 p.1-8, 2005.

FONTANA, M. C.; REZER, J. F. P.; CORADINI, K.; LEAL, D. B. R.; BECK, R. C. R. Improved efficacy in the treatment of contact dermatitis in rats by a dermatological nanomedicine containing clobetasol propionate. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.79, p.241-249, 2011.

FRANZ, T. J. Percutaneous absorption on the relevance of in vitro data. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 64, n. 3, p. 190-195, 1975.

FRONZA, T. Estudo exploratório de mecanismos de regulação sanitária de produtos cosméticos de base nanotecnológica no Brasil. **Dissertação de Mestrado**, Porto Alegre, 2006.

FRONZA, T.; GUTERRES, S. S.; POHLMAMM, A. R.; TEIXEIRA, H. **Nanocosméticos: Em direção ao estabelecimento de marcos regulatórios**. 1 ed. Porto Alegre: Gráfica da UFRGS, 2007.

GALLARATE, M.; CARLOTTI, M. E.; TROTTA, M.; BOVO, S. On the Stability of Ascorbic Acid in Emulsified Systems for Topical and Cosmetic Use. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 188, p. 233-241, 1999.

GASPAR, L. R.; CAMPOS, M. P. M. B. G. Rheological behavior and the SPF of sunscreens. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 250, p. 35-44, 2003.

GILCHREST, B.A.; YAAR, M. Aging and photoaging of the skin. observations at the cellular and molecular level. **British Journal of Dermatology**. v.127, p. 25–30, 1992.

GILCHREST, B.A.; YAAR, M Photoageing: mechanism, prevention and therapy. **British Journal of Dermatology**. v.157, p874–887, 2007.

GODIN, B.; TOUITOU, E. Transdermal skin delivery: predictions for humans from in vivo, ex vivo and animal models. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, p. 1152–1161, 2007.

GONCHOROSKI, D.D.; CORRÊA, G.M.; Tratamento de hiperpigmentação pós-inflamatória com diferentes formulações clareadoras. **Revista Infarma**, v. 17, n. 3/4, 2005.

GOKCE, E.H.; SANDRI, G.; BONFERONI, C.M.; ROSSI, S.B.; FERRARI, F.B.; GUNERI, T.; CAMELLA, C. Cyclosporine A loaded SLNs: Evaluation of cellular uptake and corneal Cytotoxicity. **International Journal of Pharmaceutics**, v.364, p. 76–86, 2008.

HADGRAFT, J. Passive enhancement strategies in topical and transdermal drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v.184, p. 1-6, 1999.

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

HASSAN, A.O.; ELSHAFFEY, A.H. Nanosized particulate systems for dermal and transdermal delivery. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v.6, p. 621-633, 2010.

HELFRICH, Y.R.; SACHS, D.L.; VOORHEES, J.J. Overview of Skin Aging and Photoaging. **Dermatology Nursing**, v. 20, p. 177-183, 2008.

HERNANDEZ, M.; MERCIER-FRESNEL, M.M. **Manual de cosmetologia**. 3.ed. Rio de Janeiro: Revinter, 353p, 1999.

HOU, D.; XIE, C.; HUANG, K.; ZHU, C. The production and characteristics of solid lipid nanoparticles (SLNs). **Biomaterials**, v.24, p. 1781–1785, 2003.

ILLING, A.; UNRUHB, T.; Investigation on the flow behavior of dispersions of solid triglyceride nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, v.284, p. 123-131, 2004.

International Conference on Harmonisation (ICH). Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1), 2005.

ISO - International Organization for Standardization. ISO TC 229 Technologies, 2005. Disponível em: http://www.iso.org/iso/iso_technical_committee?commid=381983. Acesso em: 25 jan. 2013.

ITEHPEC - Instituto de Tecnologia e Estudos de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos. Documento de Referência: Nanotecnologia em Cosméticos de Maio de 2012. Disponível em: <http://www.itehpec.org.br/wp-content/uploads/2012/08/2.DOCUMENTO-REFER%C3%8ANCIA-NANOTECNOLOGIA-PORT.pdf>. Acesso em: 28 jan. 2013.

JALÓN, E.G., BLANCO-PRÍETO, M.J., YGARTUA, P., SANTOYO, S. Topical application of acyclovir-loaded microparticles: quantification of the drug in porcine skin layers. **Journal of Controlled Release**. 75, p. 191–197, 2001a.

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

JENNING, M. SCHÄEFER-KORTING, S. GOHLA, Vitamin A-loaded solid lipid nanoparticles for topical use: drug release properties. **Journal of Controlled Release**, v. 66, p.115–126, 2000a.

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

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

JOUE – Official Journal of the European Union, 2011. Disponível em: <http://eur-lex.europa.eu/JOYear.do?year=2011>. Acesso em: jan. 2013.

JUNQUEIRA & CARNEIRO - **Histologia Básica** – 9 ed – Editora Guanabara Koogan – 1999.

KANG, S.; BERGFELD, W.; GOTTLIEB, A.B.; HICKMAN, J.; HUMENIUK, J.,; et al. Long-term efficacy and safety of tretinoin emollient cream 0.05% in the treatment of photodamaged facial skin: a two-year, randomized, placebo-controlled trial. **American Journal of Clinical Dermatology**. v.6, p.245-253, 2005.

KANIKKANNAN, N; KANDIMALLA, K; LAMBA, SS; SINGH, M. Structure-activity relationship of chemical penetration enhancers in transdermal drug delivery. **Current Medicinal Chemistry**, v. 7, p. 593 – 608, 2000.

KEDE, M.P.V.; OLEG, S. **Dermatologia Estética**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, p. 1054, 2009.

KIM, J-Y.; SONG, J-Y.; LEE, E-J.; PARK, S-K. Rheological properties and microstructures of Carbopol gel network system. **Colloid and Polymer Science**, v.281, p.614-623, 2003.

KLIGMAN, A.M.; GROVE, G.L.; HIROSE R.; LEYDEN J.J. Topical tretinoin for photoaged skin. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v.15, p.836-859, 1986.

KORHONEN, M.; LEHTONEN, J.; HELLÉN, L.; HIRVONEN, J.; YLIRUUSI, J. Rheological properties of three component creams containing sorbitan monoesters as surfactant. **International Journal of Pharmaceutics** 247, 103-114, 2000

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

KUMARI, A.; YADAV, S.K.; YADAV, S.C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.75, p.1-18, 2010.

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

LADEMANN, J.; RICHTER, H, S. SCHANZER, F. KNORR, M. MEINKE, W. STERRY, A. PATZELT. Penetration and storage of particles in human skin: Perspectives and safety aspects. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.77, p.465–468, 2011.

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

LEONARDI, G.R.; CHORILLI, M. **Dermofarmácia: Bases Dermatológicas, Microemulsões e Lipossomas**. 1 ed. p.112, 2008.

LEYDEN, J.J.; GROVE, G.L.; GROVE, M.J.; THORNE, E.G.; LUFRANO L. Treatment of photodamaged facial skin with topical tretinoin. **Journal of the American Academy of Dermatology**. v. 21, 638-644, 1989.

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

LONGSTRETH, J.; GRUIJL, F.R.; KRIPKE, M.L.; Abseck, S.; Arnold, F.; Slaper, H.I.; Velders, G.; Takizawa, Y., Van der Leun, J.C. Health risks. **Journal of Photochemistry and Photobiology B, Biology**, v. 46, n. 1-3, p. 20-39, 1998.

MAGHRABY, G.M.M.; WILLIAMS, A.C.; BARRY, B.W. Oestradiol skin delivery from ultradeformable liposomes: refinement of surfactante concetration. **International Journal of Pharmaceutics** v. 196, p. 63-74, 2000.

MANCONI, M.; SINICO, C.; VALENTI, D.; LOY, G.; FADDA, A. M. Niosomes as carriers for tretinoin. I. Preparation and properties. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 234, p.237-248, 2002.

MARTIN, A. Physical Pharmacy. 4. ed. Philadelphia: Lea & Febiger, p. 153-476, 1993.

MEHNERT, W.; MADER, K. Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, V. 47, p.165–196, 2001.

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

MEZZALIRA, G. Caracterização de suspensões de nanopartículas poliméricas estudadas como carreadores de fármacos através de técnicas de espalhamento de luz e de raios-x a baixo ângulo. **Dissertação de Mestrado**, Porto Alegre – RS, 2005.

MILÃO, D. Desenvolvimento tecnológico e avaliação biológica de formas farmacéuticas plásticas contendo nanocápsulas de diclofenaco. **Dissertação de Mestrado**, Porto Alegre – RS, 2003.

MÜ, L.; SPRANDO, R. L. Application of Nanotechnology in Cosmetics. **Pharmaceutical Research**, v.27, p.1746–1749, 2010.

MÜLLER, R.H.; RADTKE, M; WISSING, S.A. Solid lipid nanoparticles (SLN) and Nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, n. 1, p. 131–155, 2002.

MÜLLER, R.H.; RADTKE, M; WISSING, S.A. Solid lipid nanoparticles (SLN) and Nanostructured lipid carriers (NLC). **Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 10, p. 43-56, 2004.

MÜLLER, R.H.; MEHNERT, W.; SOUTO, E.B. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) for dermal delivery, in: **Percutaneous Absorption: Drugs, Cosmetics, Mechanisms**, Methods, 4th Edition (Drugs and the Pharmaceutical Sciences), New York, Basel, Hong-Kong, R. L. BRONAUGH, H. I. MAIBACH (Eds.), Marcel Dekker, Inc., Chapter 53, p. 719-738, 2005.

MÜLLER, R.H.; PETERSEN, R.D.; HOMMOSS, A.; PARDEIKE, J. Nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic dermal products. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, n. 6, p. 522–530, 2007.

MOGHIMI, H.; NOORANIA, N.; ZARGHI, A. Stereoselective Permeation of Tretinoin and Isotretinoin through Enhancer-Treated Rat Skin. II. Effects of Lipophilic Penetration Enhancers. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v.3, p. 17-22, 2004

MORAIS, G. G.; SANTOS, O. D. H.; MASSON, D. S.; OLIVEIRA, W. P.; ROCHA FILHO, P. A. Development of O/W emulsions with annatto oil (*Bixa orellana*) containing liquid crystal. **J. Dispers. Sci. Technol.**, v.26, n.5, p.591-596, 2005.

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

NEVES, K. Nanotecnologia em cosméticos. **Cosmetics & Toiletries**, v. 20, jan-fev, p.22, 2008.

NETZLAFF, F.; LEHR, C.M.; WERTZ, P.W.; SCHAEFER, U.F. The human epidermis models EpiSkin®, SkinEthic®, and EpiDerm®: an evaluation of morphology and their suitability for testing phototoxicity, irritancy, corrosivity and substance transport. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.60, p.167–178, 2005.

NIA – Nanotechnology Industries Association, 2012. Disponível em: <http://www.nanotechia.org>. Acesso em: 27 jan. 2013.

NIKKOL. Oil soluble Vitamina C derivative. **Thecnical Literature**, Nikkol, Tokyo, Japna, 11p, 2002.

NOHYNEK, G.J.; LADEMANN, J.; RIBAUD, C.; ROBERTS. M.S; Grey goo on the skin? Nanotechnology, cosmetic and sunscreen safety. **Critical Reviews in Toxicology**, v.37, p. 251–277, 2007.

NOHYNEK, G.J. ANTIGNACA, E. EB, H. TOUTAINA, E. Safety assessment of personal care products/cosmetics and their ingredients. **Toxicology and Applied Pharmacology**. v.243, p 239–259, 2010.

NSF - National Science Fondation. Disponível em: http://www.nsf.gov/crssprgm/nano/reports/omb_nifty50.jsp. Acessado em 27 jan. 2013.

OBERDÖRSTER G, OBERDÖRSTER E, OBERDÖRSTER J. Nanotoxicology: an emerging discipline from studies of ultrafine particles. **Environ Health Perspect**, v.113, p.823–39, 2005.

OECD. Test guideline 428: Skin Absorption: In Vitro Method, **OECD**, Paris, 2004.

OJEU - Official Journal of the European Union. L 275/38 (20/10/2011), v. 54, p.44, 2011.

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

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

PAESE, K. Desenvolvimento tecnológico, estudo de fotoestabilidade e avaliação da permeação cutânea in vitro da benzofenona-3 a partir de nanocápsulas poliméricas incorporadas em diferentes veículos semi-sólidos. **Dissertação de mestrado**. UFRGS, 2008.

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

PALM, M.D.; O'DONOGHUE, M.N. Update on photoprotection. **Journal Dermatol Ther.** v. 20, p.360-376, 2007.

PARDEIKE, J., MÜLLER, R.H. Physical stability of Nanostructured Lipid Carriers (NLC) in an o/w Urea Cream. In: **Proceeding of the Annual Meeting of the Controlled Release Society (CRS)**, 2007.

PARDEIKE J, HOMMOSS A, MÜLLER RH. Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. **International Journal of Pharmaceutics**.366:170–184, 2009.

PATHAN, I.B.; SETTY, C.M. Chemical Penetration Enhancers for Transdermal. Drug Delivery Systems Tropical. **Journal of Pharmaceutical Research**, v.8, p.173-179, 2009.

PAVELIC, Z. ŠKALKO-BASNET, N.; SCHUBERT, R. Liposomal gels for vaginal drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 219, p. 139–149, 2001.

PEN – The Project on Emerging Nanotechnologies. Disponível em: <<http://www.nanotechproject.org/inventories/consumer/browse>>. Acesso em: 20 jan. 2013.

POLETTO, F.; JÄGER, E.; CRUZ, L.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S.S. The effect of polymeric wall on the permeability of drug-loaded nanocapsules. **Materials Science & Engineering**, v. 28, p. 472-478, 2008.

POUILLOT, A. DAYAN, N. POLLA, A.S, POLLA, L.L, POLLA, B.S. The stratum corneum: a double paradox. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v.7, 143–148, 2008.

PRISTA, L. N.; ALVES, A. C.; MORGADO, R. **Tecnologia Farmacêutica**. 5. ed. v. 2 Lisboa: Calouste Gulbenkain, 1995.

PUGLIA, C.; BLASI, P.; RIZZA, L.; SCHOUBBEN, A.; BONINA, F.; ROSSI, C.; RICCI, M. Lipid nanoparticles for prolonged topical delivery: an in vitro and in vivo investigation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 357, p.295-304, 2008.

RABE, J.H. MAMELAK, A.J.; MCELGUNN, P.J.; MORISON, W.L.; SAUDER, D.N.; Photoaging: mechanisms and repair. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v.55, p.1-19, 2006.

RAMOS-E-SILVA, M.; CARNEIRO, S.C. Cosmetics for the elderly. **Clinics in Dermatology**, v. 19, p.:413-23, 2001.

RAMOS-E-SILVA, M.; CARNEIRO, S.C. Elderly skin and its rejuvenation: products and procedures for the aging skin. **Journal of Cosmetic Dermatology**. V. 6, p. 40-50, 2007.

RESZKO, A. E.; BERSON, D.; LUPO, M. P. Cosmeceuticals: practical applications. **Dermatologic clinics**, v. 27, n. 4, p. 401-416, 2009.

RHEIN, L.D.; PEOPLES, C.; WOLF, B. Skin, hair, and nail structure and function. In: SCHLOSSMAN, M.L. **The chemistry and manufacture of cosmetics**. 3.ed. CAROL STREAM: Allured publishing corporation, v.1, p. 87-136, 2000.

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

RIDDICK, T. M. **Control of colloid stability through zeta potential**, Zeta-Meter. Inc., New York, 1981.

ROSSI-BERGMANN, B.; A Nanotecnologia: Da Saúde Para Além Do Determinismo Tecnológico. **Ciência & Cultura**, v. 60, p. 54-57, 2008.

SANTOYO, S. et al. In vitro percutaneous absorption of piroxicam through synthetic membranes and abdominal rat skin. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, v. 71, p. 141-146, 1996.

SCHAEFER UF, HANSEN S, SCHNEIDER M, CONTRERAS JL, LEHR C-M. . Model for skin absorption and skin toxicity testing. In **Biotechnology: Pharmaceutical aspects. Drug absorption studies: In situ, In vitro and In silico models** (EHRHARDT C, KWANG-JIN K eds.), Vol. VII, pp. 3-33, 2008.

SCCP. Scientific Committee on Consumer Products: Opinion on safety of nanomaterials in cosmetic products, 2007. Disponível em: <http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_sccp/docs/sccp_o_123.pdf> . Acesso em: 15 fev. 2013.

SANT'ANNA, L.S; ALENCAR, M.S.M; FERREIRA, A.P. Patenteamento Em Nanotecnologia No Brasil: Desenvolvimento, Potencialidades e Reflexões Para O Meio Ambiente E A Saúde Humana. **Química Nova**, Vol. XY, No. 00, 1-6, 200_. 2013.

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

SCOTTI, L.; SCOTTI, M.T.; CARDOSO, C.; PAULETTI, P.; CASTRO-GAMBOA, I.; BOLZANI, V.S.; VELASCO, M.V.R.; MENEZES, C.M.S; FERREIRA, E.I. Modelagem molecular aplicada ao desenvolvimento de moléculas com atividade antioxidante visando ao uso cosmético. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 43, p. 153-166, 2007.

SHAH, V.P.; ELKINS, J.S.; WILLIAMS, R.L. Evaluation of the test system used for in vitro release of drugs from topical dermatological drug products. **Pharmaceutical development and technology**, p.377-85, 1994.

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

SHAH, C.V.; SHAH, V.; UPADHYAY, U. Solid Lipid Nanoparticles: A Review. **Current Pharmaceuticals Research**, p. 351-368, 2011.

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

SILVA, J.A.; BEDOR, D.C.G.; DAMASCENO, B.P.G.L.; OLIVEIRA, A.G.E.; EGITO, E.S.T.; SANTANA, D.P. Physicochemical Characterization and Development of a Microemulsion System for Transdermal Use. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v.31, p.1–8 ,2010.

SILVA, A.L.M; CONTRI, R.V; JORNADA, D.S.; POHLMANN, A. GUTERRES, S.S. Vitamin K1-loaded lipid-core nanocapsules: physicochemical characterization and in vitro skin permeation. **Skin Research and Technology**, v. 19, p.223–230, 2013.

SZNITOWSKA, M.; JANICK, S.; BACZEC, A. Studies on the effect of pH on the lipoidal route of penetration across stratum corneum. **Journal of Controlled Release**. v.16, p. 327-355, 2001.

SOUTO, E.B., WISSING, S.A. BARBOSA, C.M. MU"LLER, R.H. Evaluation of the physical stability of SLN and NLC before and after incorporation into hydrogel

formulations. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v.58, p.83–90, 2004.

SOUTO, E.B.; MÜLLER, R.H. Cosmetic features and applications of lipid nanoparticles (SLN, NLC). **International Journal of Cosmetic Science**, v.,3 0, p.157-165, 2008.

ŠPICLIN, P.; HOMAR, M.; ZUPAN_I_-VALANT, A.; GAŠPERLIN, M. Sodium Ascorbyl Phosphate in Topical Microemulsions. **International Journal of CPharmaceutics**., v. 256, p. 65-73, 2003.

STEVANOVIĆ, M.; SAVIĆ, J.; JORDOVIĆ, B.; USKOKOVIĆ, D. Fabrication, in vitro degradation and the release behaviours of poly(DL-lactide-co-glycolide) nanospheres containing ascorbic acid”, **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.59, p.215-223, 2007.

TAYLOR, P. Ostwald ripening in emulsions, **Advances in Colloid and Interface Science**, 75, p. 107-163, 1998.

TEERANACHAIDEEKUL, V.; BOONME, P.; SOUTO, E. B.; MÜLLER, R. H.; JUNYAPRASERT, V. B. Influence of oil content on physicochemical properties and skin distribution of Nile red-loaded NLC. **Journal of Controlled Release**, n. 128, p. 134–141, 2008.

TEO, L.A.; SHEARWOOD, C.; CHYE, N.G.K.; LU, J.; MOOCHHALA, S. Transdermal microneedles for drug delivery applications. **Materials Science and Engineering: B**, v.132, p.151–154, 2006.

TING, W. W.; VEST, C. D.; SONTHEIMER, R. D. Review of traditional and novel modalities that enhance the permeability of local therapeutics across the stratum corneum. **International Journal of Dermatology**, v.43 p.538-547, 2004.

TURSILLI, R.; CASOLARI, A.; IANNUCELLI, V.; SCALIA, S. J. Enhancement of melatonin photostability by encapsulation in lipospheres. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.40, p.910-914, 2006.

TORUAN-PURBA, A. V.; TABIBI, E.; MENDES, R. Isotretinoin liposomes with soluble collagen as a penetration through shed snake skin. **Pharmaceutical Research**, v. 10, n. 5-6, PDD 7277, 1993.

TOUITOU, E.; MEIDAN, V. M.; HORWITZ, E. Methods for quantitative determination of drug localized in the skin. **Journal of Controlled Release**, v. 1-3, n. 56, p.7-21, 1998.

UFRGS - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Comissão de Saúde e Ambiente de Trabalho, Faculdade de Farmácia: Plano de Gerenciamento de Resíduos. Porto Alegre: **Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, v.1, p.44, 2007.

ÜNER, M. Preparation, characterization and physico-chemical properties of Solid lipid nanoparticles (SLN) and Nanostructured lipid carriers (NLC): Their benefits as colloidal drug carrier systems. **Pharmazie**, v. 61, n. 5, p. 375-386, 2006.

USP - **The United States Pharmacopeia** - United States Pharmacopeia Convention, Inc., 29 ed. Rockville, MD, 2006.

VARANI, J.; QUAN, T.; FISHER, G.J. Mechanisms and pathophysiology of photoaged and chronological skin aging, Chapter 1. In: RHEIN, L.D.; FLUHR, J.W. (Eds.). **"Aging skin: Current and future therapeutic strategies"**. Allured Books, Carol Stream, IL, p1-24, 2010.

VENTER, J. P.; MÜLLER, D. G.; PLESSIS, J.; GOOSEN, C. A comparative study of in situ adapted diffusion cell and in vitro Franz diffusion cell method for transdermal absorption of doxylamine. **European Journal of Pharmaceuticals Sciences**, v.13, p.169-177, 2001.

VERMA, D. D.; VERMA, S.; BLUME, G.; FAHR, A. Particle size of liposomes influences dermal delivery of substances into skin. **International Journal of Pharmaceutics** v. 258, (1-2), p. 141-151, 2003.

VERMA, D. D.; FAHR, A. Synergistic penetration enhancement effect of ethanol and phospholipids on the topical delivery of cyclosporin A. **Journal of Controlled Release**, v.97, p.55-66, 2004.

VIEIRA, F.M.N. **Mecanismos Moleculares Do Envelhecimento Cutâneo: Dos Cromossomos Às Rugas**. 1 ed, p. 92 São Paulo: Artes. Médicas, 2007

VILA-JATO, J.L. **Tecnologia Farmacéutica**. Aspectos fundamentais de los sistemas farmacéuticos y operaciones básicas. Madrid: Editorial Sintesis, v.1, 1997.

VILLAFUERTE, L. R.; GARCÍA, B. F.; GARZÓN, M de L. S.; HERNANDÉZ, A. L.; VÁZQUEZ, M. L. R. Nanopartículas lipídicas sólidas. **Revista Mexicana de Ciências Farmacêuticas**, v. 39, n. 1, 2008.

WEISS R. Nanotechnology Precaution Is Urged Minuscule Particles in Cosmetics May Pose Health Risk, **British Scientists Say**. 2004.

WELIN-BERGER, K.; NEELISSEN, J.; BERGENSTAHL, B. The effect of rheological behaviour of a topical anaesthetic formulation on the release and permeation rates of the active compound. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.13, p. 309 – 318, 2001.

WERTZ, P.W.; DOWNING, D.T. Stratum corneum: Biological and biochemical considerations. In HADGRAFT, J.; Guy, R. (eds.), **Transdermal Drug Delivery**, Marcel Dekker, New York, Basel, p. 1–22,1989.

WHO - **World Health Organization**, Environmental Health Criteria: 235 - DERMAL ABSORPTION. 2006

WILLIAMS, A.C.; BARRY, B.W. Penetration enhancers. **Advanced Drug Delivery Reviews**. 2004;v.56, p.603–618, 2004.

WISSING, S.A.; MÜLLER, R.H. Cosmetic application for solid lipid nanoparticles (SLN). **International Journal of Pharmaceutics**, v. 254, p.65-68, 2003a.

WISSING, A.S.; MÜLLER, R.H. The influence of solid lipid nanoparticles on skin hydration and viscoelasticity – in vivo study. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.56, p.67-72, 2003b.

WISSING, S.A.; MÜLLER, R.H.; MANTHEI, L.; MAYER, C. Structural characterization of Q10-loaded SLN by NMR spectroscopy, **Pharmaceutical Research**, v. 21, p.400-405, 2004.

YOURIK J.J. JUNG T.C. BRONAUGH L.R. In vitro and in vivo percutaneous absorption of retinol from cosmetic formulations: Significance of the skin reservoir and prediction of systemic absorption. **Toxicology and Applied Pharmacology**. v.231, p. 117–121, 2008.

YOKOYAMA, T.; HUANG, C.C. Nanoparticle Technology for the Production of Functional Materials. **Kona**, n.23, 2005.

ZANETTI-RAMOS, B. G.; CRECZYNSKI, T. B. O desenvolvimento da nanotecnologia: Cenário mundial e nacional de investimento. *Rev. Bras. Farm.*, v. 89, n. 2, p. 95 - 101, 2008.

ZHAI, H.; MAIBACH, I. H. *Dermatotoxicology*, 6a. ed. Washington: CRC Press, cap.22, p.429, 2004.

ZUR-MÜHLEN, A.; SCHWARZ, C.; MEHNERT, W. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.45, p.149-155, 1998.

8.1 Validação de metodologia para extração e quantificação da tretinoína nas formulações semissólidas

A fim de quantificar a tretinoína incorporada nas formulações de gel e de creme utilizou-se metodologia descrita por OURIQUE e colaboradores (2008) com algumas modificações.

8.1.1 Validação de metodologia para quantificação da tretinoína nas formulações semissólidas

Com o objetivo de assegurar a confiabilidade do método analítico empregado, o mesmo foi validado segundo os critérios preconizados pela ICH (2005) e pela resolução da ANVISA (2003). Os parâmetros avaliados foram: linearidade, precisão, especificidade, limites de detecção e quantificação, sendo os ensaios realizados por CLAE.

Parâmetros de validação das análises por CLAE

A Tabela 11, apresenta as condições cromatográficas utilizadas para a determinação do teor de tretinoína em solução metanólica.

Tabela 11: Parâmetros cromatográficos utilizados na metodologia analítica para doseamento da tretinoína em metanol.

Parâmetros	Condições
Detecção	UV (λ 342 nm)
Fluxo	1,0 mL/min.
Coluna	Fenomenex, Gemini RP 18 (150 x 46 mm)
Fase móvel	CH ₃ CN:H ₂ O:CH ₃ COOH (85:15:1 v/v/%)
Volume de Injeção	20 μ L
Tempo de retenção do pico da TTN	\approx 8 min.

Os parâmetros foram validados da seguinte forma:

Especificidade

A fim de verificar a especificidade da metodologia para a tretinoína, fez-se a análise de interferência do solvente utilizado (metanol) para solubilizar e diluir a tretinoína realizou-se o teste de especificidade. Para isso, injetou-se em triplicata amostras contendo metanol e, amostras de tretinoína diluídas em metanol (10 µg/mL) previamente filtradas em filtro 0,45 µm, Millipore Millex-HP para vials âmbar em CLAE. Para avaliar a especificidade da metodologia empregada os cromatogramas obtidos foram comparados visualmente, observando se havia picos relativos a outras substâncias no mesmo tempo de retenção do fármaco tretinoína.

Através da observação da Figura 34 A (amostra da fase móvel) e da Figura 34 D pode-se verificar que não houve interferentes nesta metodologia.

Linearidade

Cinco níveis de concentração foram avaliados em dois dias diferentes, sendo duas curvas preparadas no mesmo dia e uma em dia consecutivo, construindo-se assim três curvas de calibração.

Para a construção da curva analítica, preparou-se uma solução-mãe metanólica de tretinoína pesando-se exatamente, cerca de, 0,025 g de tretinoína e transferindo-a para balão volumétrico de 50 mL. Na sequência, completou-se o volume com metanol e solubilizou-se em ultrassom por 3 minutos. Obteve-se assim, uma solução na concentração de 500 µg/mL. A partir desta solução-mãe, alíquotas foram diluídas em metanol para totalizar 5 pontos de concentração preparados conforme Tabela 12.

Tabela 12: Preparo dos pontos de concentração das curvas-padrão de tretinoína.

Concentração (µg/mL)	Volume de solução-mãe (µL)	Balão volumétrico (mL)
1	20	10
5	100	10
10	200	10
15	300	10
20	400	10

Após a preparação dos pontos das curvas, esses foram filtrados em filtro 0,45 µm, Millipore Millex-HP para *vials* ambarizados e então levadas a doseamento por CLAE. As médias das áreas absolutas dos picos correspondentes a cada concentração do padrão foram plotadas em gráfico de Área *versus* Concentração e assim determinada a equação da reta e o coeficiente de correlação linear (r^2). A estatística utilizada para a verificação da linearidade foi a Análise de Variância (ANOVA) com intervalo de confiança de 95%.

Na Tabela 13 observa-se que houve regressão linear significativa e desvio da linearidade não significativo ($p > 0,05$) quando comparados os valores de $F_{\text{calculado}}$ e F_{tabelado}

Tabela 13: ANOVA da linearidade do método analítico para quantificação da TTN nas formulações semissólidas.

Fonte de variação	GL	SQ	Variância	$F_{\text{calculado}}$	F_{tabelado}
Entre	4	1,24961E+13	3,12402E+12	6453,4996*	2,66
Regressão linear	1	1,24929E+13	1,24929E+13	25807,4210*	4,49
Desvio de linearidade	3	3,18E+09	1061364467	2,1925	2,74
Resíduo	10	4840822603	484082260,3		
Total	14	1,25009E+13			

*Significativo para $p < 0,05$

A Figura 33 apresenta a curva-padrão obtida, onde apresentou coeficiente angular igual a 134324 e intersecção no eixo y igual a – 29382 e coeficiente de correlação 0,9997. O coeficiente de correlação linear que foi de 0,9997 corrobora com o preconizado pelos códigos oficiais que deve ser superior a 0,99 (ICH, 2005; ANVISA, 2003).

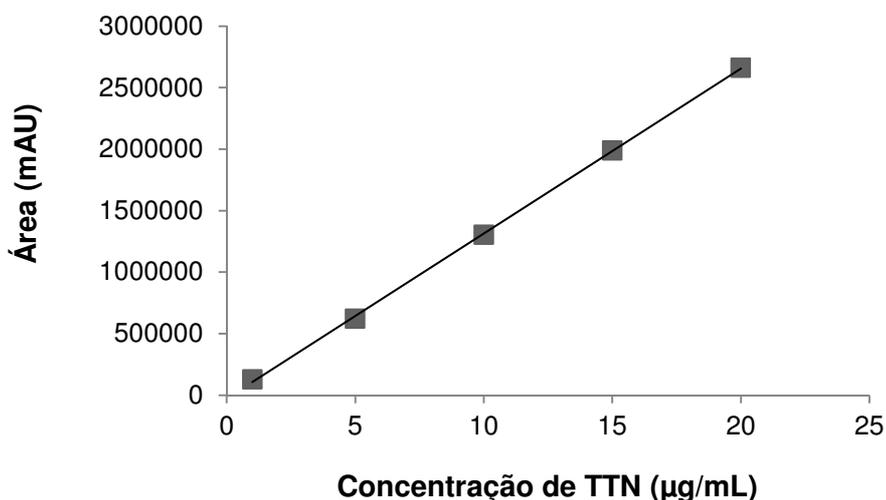


Figura 33: Curva-padrão obtida para quantificação da TTN.

Precisão

A precisão de um processo analítico é um parâmetro que avalia as proximidades entre várias medidas efetuadas na mesma amostra. A precisão intra-dia é a concordância dos resultados obtidos em um curto espaço de tempo pelo mesmo analista e mesma instrumentação. A precisão inter-dia considera a concordância entre os resultados obtidos em dias diferentes de análise. Usualmente, a precisão é expressa com o desvio-padrão, variância ou coeficiente de variação (CV) de diversas medidas (ANVISA, 2003).

A concentração utilizada para determinação da precisão foi de 10 µg, correspondente ao ponto médio da curva. As precisões intra e inter-dia foram realizadas em triplicata, 2 no mesmo dia e 1 em dia diferente. Para verificação da precisão do método proposto foram determinados os desvios-padrão e os coeficientes de variação (CV, %) da resposta obtida nas leituras das diluições realizadas intra e inter-dia.

Tabela 14 apresenta os coeficientes de variação relativo às leituras realizadas.

Tabela 14: Avaliação dos coeficientes de variação (CV %) intra e inter-dia do método analítico para quantificação da TTN nas formulações semissólidas

Solução-amostra	Precisão intra-dia (%)	Precisão inter-dia (%)
TTN (10 µg/mL)	1,66	2,89

Para que uma metodologia seja considerada precisa os códigos oficiais (ANVISA, 2003) preconizam que os coeficientes de variação não ultrapassem 5%. Com os valores para as precisões intra e inter-dia estão abaixo considera-se que a metodologia para quantificação da TTN contida nas formulações é precisa.

Limites de detecção e de quantificação

Os limites de detecção e de quantificação foram determinados matematicamente através da relação entre o desvio padrão da curva de calibração e sua inclinação, usando o fator multiplicador (equações 3 e 4) conforme sugerido pelas normas ICH (2005) e ANVISA (2003).

(Equação 3)

$$LD = 3,33 \times s/a$$

(Equação 4)

$$LQ = 10 \times s/a$$

onde: **s** é a estimativa do desvio padrão dos coeficientes lineares e **a** é o coeficiente angular médio das 3 curvas-padrão.

As concentrações para LD e LQ estão expressas abaixo:

$$LD = 0,23 \mu\text{g/mL}$$

$$LQ = 0,69 \mu\text{g/mL}$$

8.1.2 Validação da extração da TTN nas formulações semissólidas

A fim de dosear a tretinoína incorporada nas formulações semissólidas esta precisou ser previamente extraída das formulações. A partir dessa necessidade, procedeu-se a validação de uma metodologia para a extração.

A extração foi realizada pesando-se cerca de 50 mg das formulações com tretinoína, CTN e GTN, em balão volumétrico de 25 mL. Completou-se o volume com metanol e deixou-se em ultrassom por 30 minutos. Após centrifugou-se por 15 minutos a 4.500 x g. Após, as amostras foram filtradas em papel filtro com poro de 3µm seguida de filtração em membrana 0,45 µm. Transferiu-se a solução para *vial* e quantificou-se em CLAE através do método anteriormente proposto para a quantificação de TTN.

Para validar a metodologia de extração foram avaliadas as precisões das extrações em 2 dias diferentes, sendo que no primeiro dia repetiu-se o procedimento 12 vezes e no segundo dia mais 6 repetições independentes, totalizando 18 leituras. A concentração utilizada para determinação da precisão foi de 10 µg, correspondente ao ponto médio da curva. As precisões intra e inter-dia foram realizadas em triplicata, 2 no mesmo dia e 1 em dia diferente. Para verificação da precisão do método proposto foram determinados os coeficientes de variação (CV %) da resposta obtida nas leituras das diluições realizadas intra e inter-dia (

Tabela 15).

Tabela 15: Avaliação dos coeficientes de variação (CV %) intra e inter-dia do método analítico para extração da TTN nas formulações semissólidas

Formulação	Precisão intra-dia (%)	Precisão inter-dia (%)
CTN	2,47	3,83
GTN	1,80	2,16

A recuperação da tretinoína incorporada nas formulações semissólidas foi de 100% com coeficientes de variação, entre os doseamentos do extraído, inferiores a 5%, certificando a precisão desta metodologia na extração da TTN.

Especificidade das formulações

A fim de verificar se os componentes das formulações não interfeririam nos doseamentos da tretinoína, realizou-se o teste de especificidade. As amostras das formulações CN e GN foram solubilizadas em água Milli-Q. Após foram centrifugadas por 15 minutos com aceleração a 4.500 x g e então filtradas em filtro 0,45 µm, Millipore Millex-HP para vials âmbar e levadas a CLAE. Para avaliar a especificidade da metodologia empregada os cromatogramas obtidos foram comparados visualmente, observando se havia picos relativos a outras substâncias no mesmo tempo de retenção do fármaco tretinoína.

A Figura 34 apresenta os cromatogramas que demonstram a especificidade da metodologia empregada para quantificação da TTN a partir das formulações semissólidas, mostrando não haver interferentes dos componentes das formulações na quantificação do ativo.

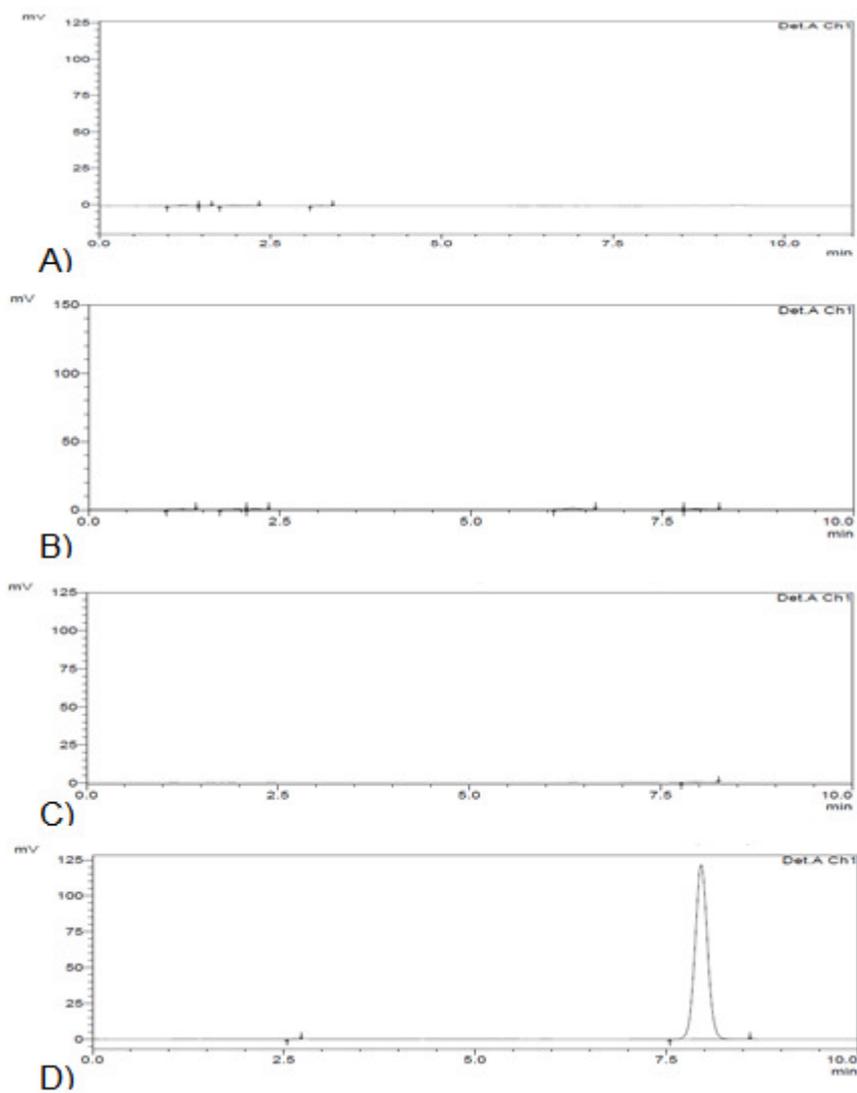


Figura 34: Cromatogramas obtidos por CLAE das amostras de: (A) especificidade da fase móvel; (B) especificidade da formulação CN; (C) especificidade da formulação GN e (D) quantificação da TTN na concentração de 10 µg/mL

8.2 Validação de metodologia analítica para extração e doseamento da TTN nos estudos de penetração cutânea e liberação

A metodologia validada para extrair e dosear a tretinoína das fitas (*tape stripping*) e no compartimento doador (excesso de formulação + algodão).

8.2.1 Validação da metodologia para quantificação da tretinoína

A metodologia utilizada foi adaptada de OURIQUE e colaboradores (2011) e difere da validação apresentada no item 8.1.2 em alguns parâmetros (volume de injeção e fase móvel).

Parâmetros de validação das análises por CLAE

A Tabela 16 apresenta os parâmetros cromatográficos utilizados na validação da metodologia.

Tabela 16: Parâmetros cromatográficos utilizados na metodologia analítica para doseamento da tretinoína em metanol

Parâmetros	Condições
Detecção	UV (λ 342 nm)
Fluxo	1,0 mL/min.
Coluna	Fenomenex, Gemini RP 18 (150 x 46 mm)
Fase móvel	CH ₃ OH:H ₂ O:CH ₃ COOH (85:15:1 v/v/%)
Volume de Injeção	100 μ L
Tempo de retenção do pico da TTN	\approx 13 min.

Os parâmetros avaliados foram: linearidade, precisão, especificidade, limites de detecção e quantificação e a exatidão inferida quando a metodologia apresentou-se linear e precisa.

Especificidade

A especificidade foi determinada através da análise do cromatograma obtido a partir de uma amostra da fase móvel a qual está representada pela Figura 35. Verifica-se que não houve interferentes no tempo de retenção do fármaco (13 min.).

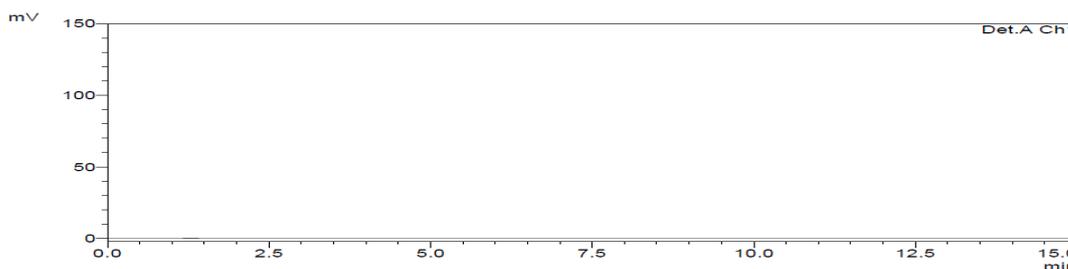


Figura 35: Cromatograma obtido por CLAE representando a especificidade da metodologia empregada para a quantificação da TTN.

Linearidade

Oito níveis de concentração foram avaliados em dois dias diferentes, sendo duas curvas preparadas no mesmo dia e outra em dia consecutivo, construindo-se assim três curvas de calibração. Os níveis de concentração construídos foram: 0,05; 0,1 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 10,0 e 15,0 $\mu\text{g/mL}$. Após a preparação dos pontos das curvas, esses foram filtrados em filtro 0,45 μm , Millipore Millex-HP para *vials* ambarizados e então levadas a doseamento por CLAE. As medias das áreas absolutas dos picos correspondentes a cada concentração do padrão foram plotadas em gráfico de Área *versus* Concentração e assim determinada a equação da reta e o coeficiente de correlação linear (r^2). A estatística utilizada para a verificação da linearidade foi a Análise de variância (ANOVA) com intervalo de confiança de 95%.

Analisando a Tabela 17 através da análise de variância observa-se que houve regressão linear significativa e desvio da linearidade não significativo ($p < 0,05$) quando comparados os valores de $F_{\text{calculado}}$ e F_{tabelado}

Tabela 17: ANOVA da linearidade do método analítico para quantificação da TTN

Fonte de variação	GL	SQ	Variância	F calculado	F tabelado
Entre	7	2,49291E+14	3,5613E+13	4902,1561*	2,66
Regressão linear	1	2,49255E+14	2,49255E+14	34310,1492*	4,49
Desvio de linearidade	6	3,59E+10	5985938481	0,8240	2,74
Resíduo	16	1,16236E+11	7264766715		
Total	23	2,49407E+14			

*Significativo para $p < 0,05$.

A Figura 36 apresenta a curva-padrão obtida, onde apresentou coeficiente angular igual 626420 e coeficiente linear de -2126,2. O coeficiente de correlação linear que foi de 0,9999 está de acordo com o preconizado pelos códigos oficiais, que deve ser superior a 0,99 (ICH, 2005; ANVISA, 2003).

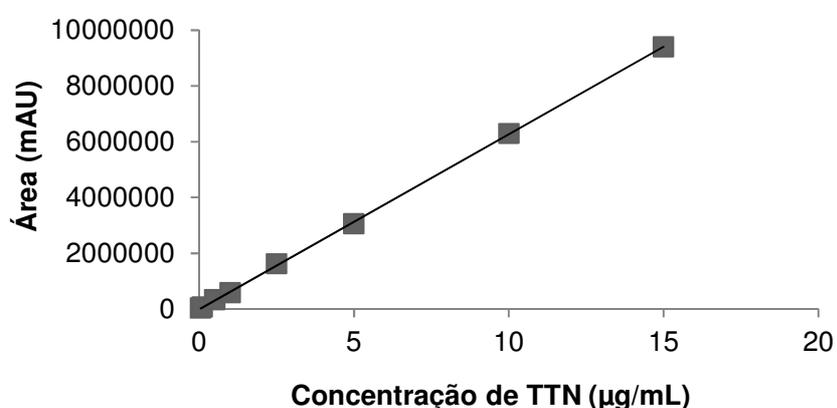


Figura 36: Curva-padrão obtida para quantificação da TTN nos estudos de penetração/retenção cutânea e de liberação.

Precisão

A concentração utilizada para determinação da precisão foi de 10 µg/ml, correspondente ao ponto médio da curva. As precisões intra e inter-dia foram realizadas em triplicata, 2 no mesmo dia e 1 em dia diferente. Para verificação da

precisão do método proposto foram determinados os desvios-padrão e os coeficientes de variação (CV %) da resposta obtida nas leituras das diluições realizadas intra e inter-dia. A Tabela 18 apresenta os coeficientes de variação relativos às leituras realizadas.

Tabela 18: Avaliação dos coeficientes de variação (CV %) intra e inter-dia do método analítico para quantificação da TTN nas formulações semissólidas.

Solução-amostra	Precisão intra-dia (%)	Precisão inter-dia (%)
TTN (10 µg/mL)	1,29	0,99

Para que uma metodologia seja considerada precisa os códigos oficiais (ICH, 2005; ANVISA, 2003) preconizam que os coeficientes de variação não ultrapassem 5%. O método apresentou-se com excelente precisão.

Limites de detecção e de quantificação

A partir dos dados do estudo da linearidade da curva-padrão os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados de acordo com as equações 2 e 3, respectivamente. Os valores obtidos foram 0,02 µg/mL para LD e 0,0495 µg/mL para LQ.

8.2.2 Validação da extração da TTN e especificidade das fitas de *tape*

O ensaio de especificidade consistiu na adição de tiras de fitas adesivas (*tape*) e 4 mL de metanol em tubos de ensaio. Os tubos foram submetidos à agitação em vórtex por 2 minutos, em ultrassom por 4 minutos e centrifugados a 4500 x g por 30 minutos. Após, as amostras foram filtradas para *vials* e injetadas em CLAE, através da metodologia descrita neste anexo no item 8.2.1. A Figura 37 apresenta o cromatograma obtido para a especificidade da fita *tape*. Observa-se que não há interferentes no tempo de retenção do fármaco.

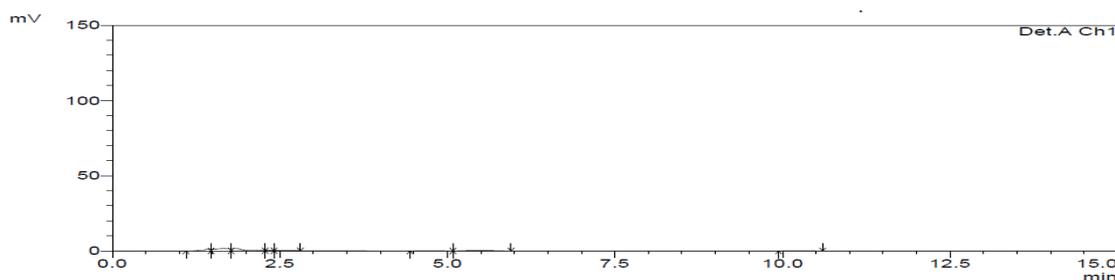


Figura 37: Cromatograma de CLAE representando a especificidade da fita *tape*.

A precisão da extração da tretinoína foi realizada utilizando solução de tretinoína em três concentrações da curva-padrão, em triplicata. A extração foi realizada nas mesmas condições e metodologia que as fitas sem ativo. A Tabela 19 apresenta o percentual recuperado de tretinoína em relação ao pipetado e o desvio-padrão relativo entre da triplicata de cada concentração.

Tabela 19: Repetibilidade da extração da TTN nas fitas *tape* (n = 3)

Concentração (µg/mL)	Recuperação (%)	DPR
2,5	93,8	4,18
5,0	99,3	5,40
10,0	96,0	3,97

A recuperação da tretinoína aplicada nas fitas foi de aproximadamente 100% com DPR, entre as triplicatas, em torno de 5% mostrando a precisão no método de extração empregado.

8.2.3 Validação da extração da TTN a partir das formulações semissólidas

A validação da extração da TTN a partir das formulações semissólidas foi necessária a fim de certificar no estudo de permeação/retenção cutânea o teor de TTN presente nas formulações, além de obter dados sobre a quantidade de TTN recuperada ao final dos experimentos. Foi realizada apenas a repetição para as formulações mais completas, ou seja, CTN e GTN.

Para a extração da TTN das formulações semissólidas, utilizou-se 3 concentrações da curva-padrão. Pesou-se a quantidade de formulação necessária

para cada concentração em balão volumétrico âmbar e completou-se o volume com metanol e submeteu-se a amostra sucessivamente a vórtex por 2 minutos, a ultrassom por 30 minutos e à centrifuga por 15 minutos a 4500 x g. Após, as amostras foram filtradas para *vials* e injetadas em CLAE utilizando os parâmetros descritos no ANEXO 8.2.1. ultrassom por 30 minutos. Após centrifugou-se por 15 minutos a 4.500 x g. Após, as amostras foram filtradas em papel filtro com poro de 3µm seguida de filtração em membrana 0,45 µm. Transferiu-se a solução para *vial* e quantificou-se em CLAE através do método anteriormente proposto para a quantificação de TTN (ANEXO 8.2.1).

Para validar a metodologia de extração foram avaliadas as precisões das extrações em 2 dias diferentes, sendo que no primeiro dia repetiu-se o procedimento 12 vezes e no segundo dia mais 6 repetições independentes, totalizando 18 leituras.

A Tabela 20 apresenta o percentual recuperado para a tretinoína e respectivo desvio-padrão entre as repetições.

Tabela 20: Repetibilidade da extração da TTN nas formulações semissólidas (n = 6)

Concentração (µg/mL)	Intra-dia	Inter-dia	Intra-dia	Inter-dia
	Recuperação (%) ^a	Recuperação (%) ^a	Recuperação (%) ^b	Recuperação (%) ^b
2,5	100,3±4,93	99,7±2,93	112,4±3,16	99,4±2,36
5,0	106,2±1,59	101,3±2,50	102,0±4,98	102,4±3,90
10,0	113,4±4,60	98,4±4,33	101,7±2,36	100,6±2,01

a = CTN; b = GTN.

8.2.4 Especificidade do algodão

A utilização do algodão foi necessária no estudo de permeação em células de *Franz* para a retirada do excesso das formulações semissólidas de géis e cremes sob a membrana suína. A especificidade das formulações semissólidas presentes no algodão foi avaliada por CLAE a partir de formulações sem tretinoína (GN e CN). Os cromatogramas obtidos podem ser visualizados na Figura 38, que demonstra não haver interferentes no tempo de retenção da TTN (≈13 min.).

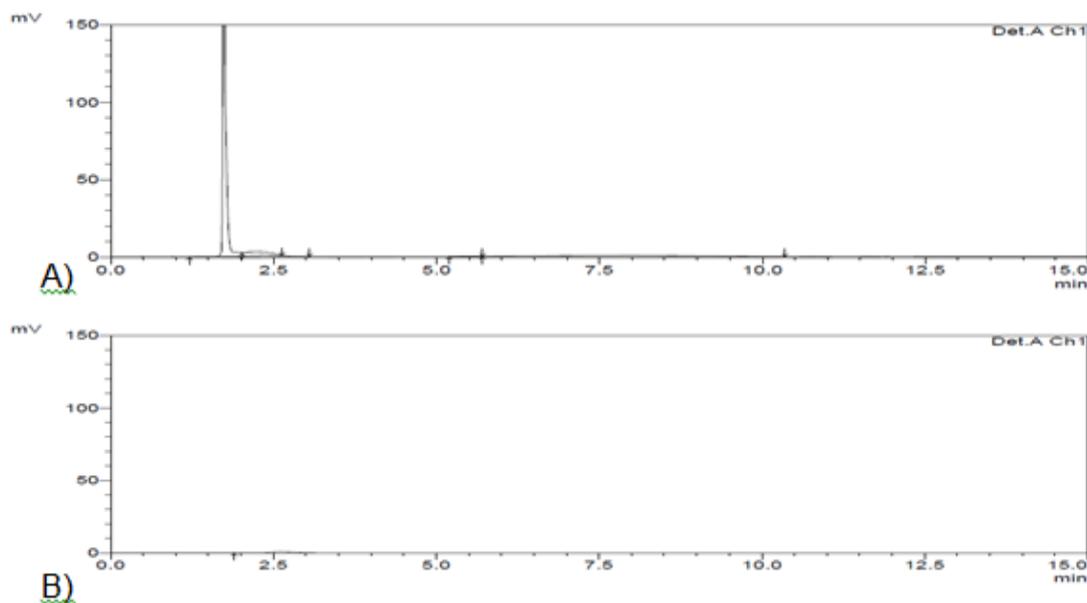


Figura 38: Cromatogramas obtidos por CLAE representando especificidade: (A) algodão contendo CN e (B) algodão contendo GN.

8.2.5 Validação de metodologia da extração da TTN de especificidade das amostras de pele abdominal de fêmea suína

A validação da extração da TTN nas membranas suínas foram determinadas através de 3 concentrações da curva-padrão (5, 10 e 15 $\mu\text{g/mL}$) com 5 repetições cada. Em tubo de ensaio, contaminou-se pedaços de pele com solução metanólica de TTN a qual ficou em contato com a pele por 30 minutos. Após, adicionou-se 9 mL de metanol e procedeu-se com a extração com os seguintes parâmetros:

Tempo em vórtex: 2 minutos;

Tempo e temperatura de sonicação: 30 minutos a 36^o C;

Condições de centrifugação: 5.000 x g por 30 minutos

Após a extração, filtrou-se as amostras, transferiu-se para *vial* âmbar e quantificou-se por CLAE, conforme metodologia apresentada no anexo 8.1.1.

A

Tabela 21 representa a recuperação (%) de tretinoína e o desvio padrão relativo entre as 5 determinações.

Tabela 21: Percentual de TTN recuperado na extração da pele suína e concentração com o desvio padrão relativo (n = 5)

Concentração teórica ($\mu\text{g/mL}$)	Recuperação (%)	DPR
5,00	88,0	4,8
10,00	88,5	4,9
15,00	88,7	4,3

A especificidade do método para quantificação da TTN na pele é representada pelo cromatograma da Figura 39 de uma amostra de pele. Pode-se observar que não há interferentes de componentes da pele no tempo de retenção do ativo.

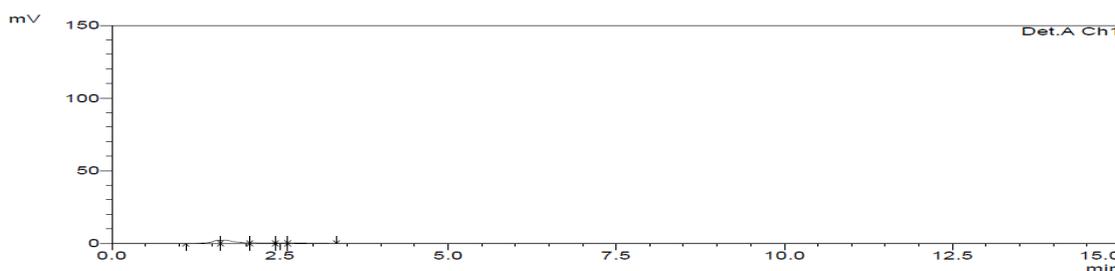


Figura 39: Cromatograma obtido por CLAE representando especificidade da pele.

Foi realizada também uma simulação de tape stripping a fim de verificar possíveis reações e interferentes provenientes da fita com o estrato córneo. Para isso, foram separados discos da membrana suína, aplicando-se uma pequena quantidade das formulações CTN e GTN (separadamente), e aderindo-se pedaços de fita para retirada de camadas de estrato córneo. Estas foram transferidas para tubos de ensaio e extraídas com metanol de acordo com a metodologia utilizada para as camadas de *tape* (ANEXO 8.2.2). O cromatogramas representados na Figura 40 demonstram a especificidade da metodologia.

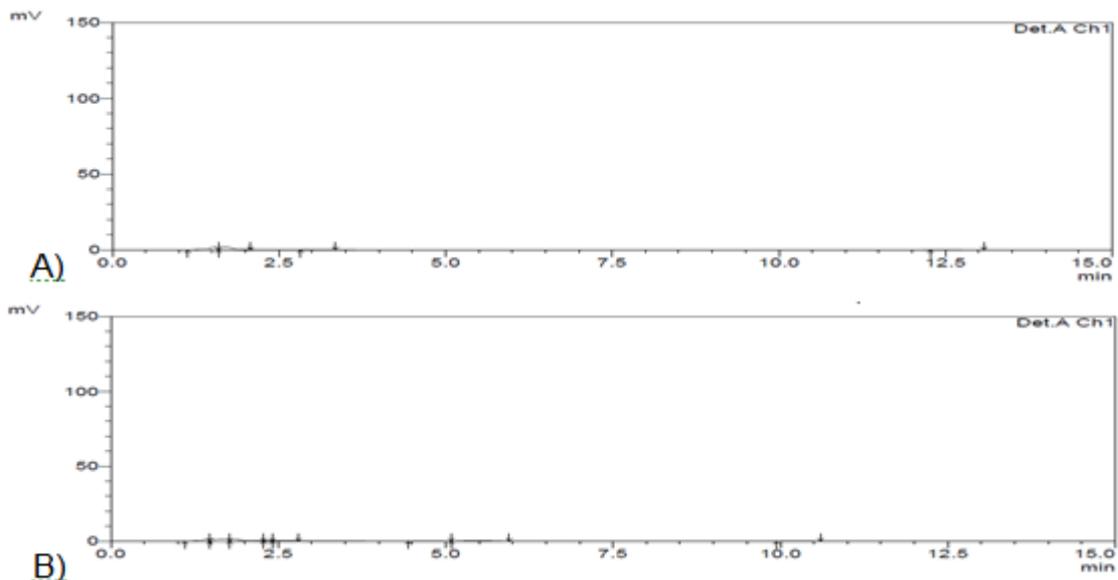


Figura 40: Cromatogramas obtidos por CLAE representando especificidade das amostras de: (A) fita tape contendo CN e (B) fita tape contendo GN.

8.2.6 Especificidade membrana de diálise

A fim de verificar a possibilidade de interferentes da membrana de diálise (M.W = 12,400 kDa) no estudo de liberação da TTN a partir das formulações semissólidas, fez-se a pesquisa de interferentes submetendo em célula de Franz (Célula de *Franz* Microette Plus-Hanson Research[®]) as formulações semissólidas com e sem insumo nanoestruturado (CB, CN; CB e CN) ficarem em contato com a membrana de diálise e o meio receptor PBS pH 7,4 e etanol (70:30) (v/v), em banho circulante na temperatura de $32 \pm 2^{\circ}$ C, pelo mesmo período de tempo planejado para o estudo de liberação (12h) . Passadas as 12 horas, foram coletadas as amostras e injetadas em CLAE (Shimadzu[®]) utilizando a metodologia descrita no ANEXO 8.3.

A Figura 41 representa os cromatogramas obtidos para a especificidade da membrana de diálise a partir das formulações semissólidas, sem haver interferência no tempo de retenção do fármaco (≈ 13 min.)

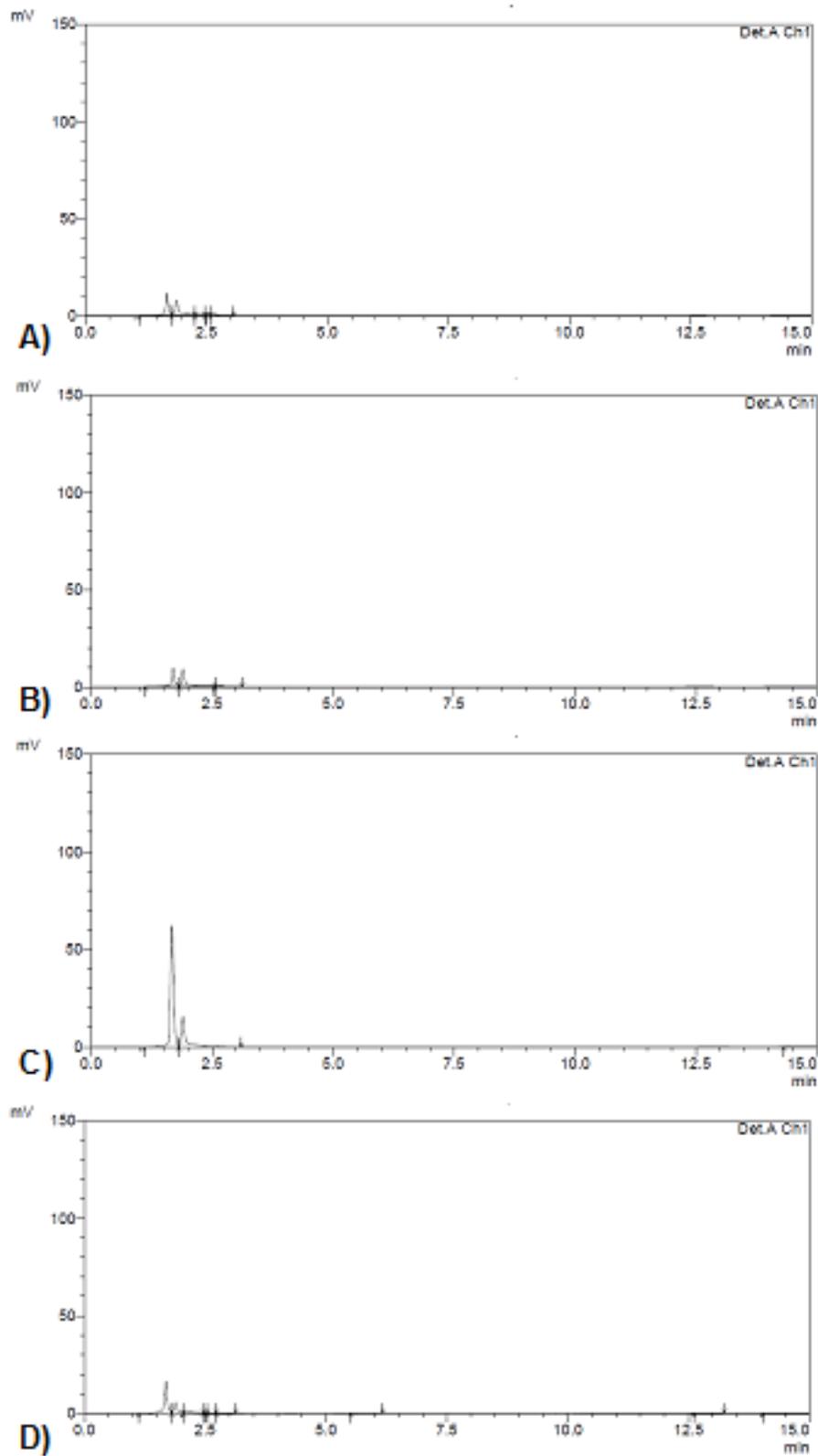


Figura 41: Cromatogramas obtidos por CLAE representando especificidade da membrana de diálise para as amostras das formulações semissólidas: (A) CB; (B) CN; (C) GB e (D) GN em meio receptor (PBS pH 7,4 e etanol 70:30 (v/v)).

8.2.7 Validação da metodologia para quantificação de TTN no meio receptor

A composição do meio receptor deve demonstrar ser capaz de manter a condição sink. Quando a concentração do fármaco dissolvido no meio de liberação é menor que 10% da sua concentração saturação (C_s), diz-se que o sistema está operando sob uma condição *sink* (SINKO, 2008). No caso de fármacos lipofílicos, o estudo de solubilidade é uma etapa crucial, já que a solubilidade desses fármacos em soluções aquosas é baixa. A tretinoína é um fármaco de alta lipofilicidade, apresentando valor de Log P em torno de 5,00 sendo, portanto, praticamente insolúvel em soluções aquosas.

Para a seleção da solução receptora que melhor solubilizasse fármaco foi realizado ensaio da condição de saturação da TTN em diversas soluções. A Tabela 22 apresenta as soluções testadas, as concentrações de saturação (C_s) determinadas e observações acerca da escolha do melhor meio receptor para o estudo em questão.

Tabela 22: Condições da escolha do meio receptor

Solução candidata a meio Receptor	C_s ($\mu\text{g/mL}$)	Observações
PEG 400:H ₂ O:T80 (40:60:05) (v/v)	130	TTN precipita na presença do metanol
EtOH:H ₂ O:T80 (10:15:75) (v/v)	96,45	—
PEG 400:H ₂ O:EtOH:T80 (40:50:10:1) (v/v)	157	TTN precipita na presença do metanol
PEG 400:H ₂ O:EtOH:T80 (40:50:10:0,5) (v/v)	132	TTN precipita na presença do metanol
Glicerina:H ₂ O:EtOH:T80 (65:25:10:0,5) (v/v)	107	TTN precipita na presença do metanol
PBS 7,4:EtOH (90:10) (v/v)	—	—
PBS 7,4:EtOH (70:30) (v/v)	124	—

As soluções que apresentaram melhor C_s não puderam ser utilizadas como meio receptor, pois quando ao diluir a SM metanólica de TTN durante a preparação da curva de calibração, do respectivo meio receptor, observou-se que a TTN

precipitava. Dessa forma, optou-se por utilizar a solução de PBS pH 7,4 com etanol (70:30) (v/v).

Para a validação da metodologia analítica para quantificação da tretinoína no meio receptor foram avaliados 5 parâmetros: linearidade (curva de calibração); especificidade (pesquisa de interferentes); precisão (determinação do teor de cada substância), exatidão e limites de detecção (sensibilidade) e de quantificação (menor concentração que pode ser quantificada com precisão e exatidão) (ANVISA, 2003).

Para a avaliação do desempenho da curva de calibração, utilizou-se o parâmetro analítico Linearidade, que corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame, dentro de uma determinada faixa de aplicação (RIBANI et al., 2004).

Para a construção da curva analítica, preparou-se uma solução mãe metanólica de tretinoína. Pesou-se exatamente, cerca de, 0,025g de tretinoína e transferiu-se para balão volumétrico de 25 mL, completou-se o volume com metanol e solubilizou-se em ultrassom por 3 minutos. Obteve-se assim, uma solução-mãe 1 (SM1) na concentração de 1000 µg/mL. Retirou-se uma alíquota de 2500 µL da SM1 e transferiu-se para balão volumétrico de 25 mL, completando o volume com metanol e agitando mecanicamente para a solubilização. Obteve-se a solução-mãe 2 (SM2) na concentração de 100 µg/mL.

Preparou-se as diluições com os seguintes pontos de concentração: 0,25; 0,5; 1; 2,5; 5; 7,5; 10; 12,5; 15 e 17,5 µg/mL completando-se os balões volumétricos com o meio receptor (PBS pH 7,4:etanol) nas proporções de 70:30 (v/v).

Após a preparação das soluções-padrão diluídas, representativas dos pontos das curvas, foram injetadas no cromatógrafo. As médias das áreas absolutas dos picos correspondentes a cada concentração do padrão foram plotadas em gráfico de Área *versus* Concentração (Figura 42).

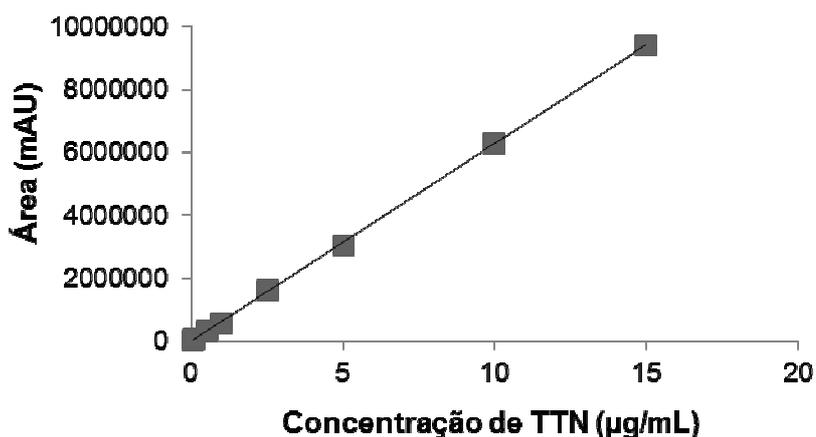


Figura 42: Curva-padrão para quantificação de TTN em PBS pH 7,4:etanol (70:30).

Pode-se observar, pela curva construída e pela análise de regressão, a relação linear entre as áreas sob os picos e as concentrações de TTN, no intervalo proposto de 0,25 a 17,5 µg/mL. Através do método dos mínimos quadrados, foi possível determinar a equação da reta representativa da linearidade ($y = 619489x - 126149$) e pelo estudo da regressão linear, o coeficiente de correlação ($r^2 = 0,9993$). O coeficiente de determinação (r^2) obtido foi 0,9993, indicando que 99,93% da variação no eixo de y é explicada pela variação no eixo de x, e, conseqüentemente, há uma boa correlação ou linearidade na curva dentro da faixa de concentração proposta.

Para a determinação do coeficiente de correlação, intersecção com o eixo y e do coeficiente angular, utilizou-se da ferramenta do Windows Excel.

Tabela 23: ANOVA da linearidade do método analítico para quantificação da TTN no meio receptor

Fonte de variação	GL	SQ	Variância	F calculado	F tabelado
Entre	9	4,16476E+14	4,62751E+13	738,6960*	2,39
Regressão linear	1	4,16202E+14	4,16202E+14	6643,8890*	4,35
Desvio de linearidade	8	2,74E+11	34257081812	0,5469	2,45
Resíduo	20	1,25289E+12	62644317606		
Total	29	4,17729E+14			

*Significativo para $p < 0,05$.

Através da análise de variância, pode-se verificar regressão linear significativa e desvio da linearidade não significativo ($p > 0,05$), observados nos valores de Fcalculado, comparados aos valores de Ftabelado.

Os limites de detecção e de quantificação foram determinados através dos coeficientes angulares e lineares de cada uma das curvas-padrão:

$$\text{LD} = 0,076 \mu\text{g/mL}$$

$$\text{LQ} = 0,223 \mu\text{g/mL}$$

As precisões intra e inter-dia foram determinadas com 3 soluções-amostra de 10 $\mu\text{g/mL}$. Estas soluções foram injetadas, em triplicata, 2 no mesmo dia e 1 em dia diferente, através de CLAE (Shimadzu®), pela mesma metodologia aplicada para a curva-padrão. Foram determinados os desvios-padrão e os coeficientes de variação (CV %) intra e inter-dia (Tabela 24).

Tabela 24: Avaliação dos coeficientes de variação (CV %) da repetibilidade intra e inter-dia do método analítico para quantificação no meio receptor (n = 9)

Solução-amostra	Precisão intra-dia (%)	Precisão inter-dia (%)
TTN (10 µg/mL)	2,34	0,24

Os valores dos coeficientes de variação indicam que a precisão do método está dentro das normas estabelecidas oficialmente, que preconizam limite máximo de 5 % (ICH, 2005; ANVISA, 2003).

A especificidade foi determinada através da análise do cromatograma obtido a partir de amostras contendo tampão PBS e etanol. A Figura 43 apresenta o cromatograma obtido e demonstra não haver interferentes no tempo de retenção do pico do fármaco.

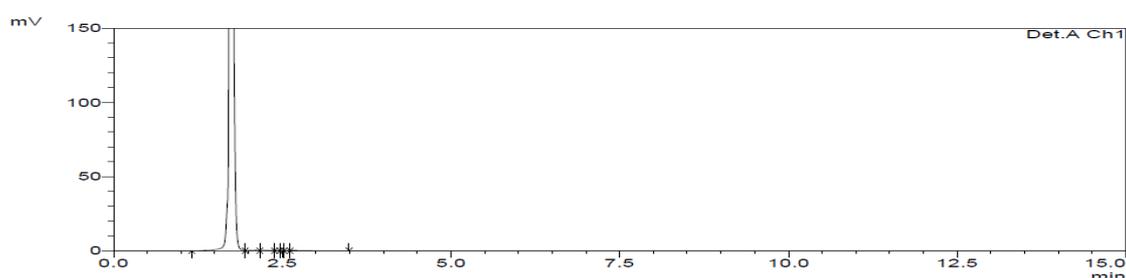


Figura 43: Cromatograma obtido por CLAE para especificidade do meio receptor.

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) que foram calculados matematicamente através da relação entre o desvio padrão da curva padrão e sua inclinação, conforme as equações (ICH, 2005) (Equação 2) e (Equação 3) apresentaram concentrações de 0,08µg/mL e 0,24 µg/mL respectivamente.

Quanto a exatidão do método proposto, de acordo com as normas do ICH (International Conference on Harmonization) (2005), a exatidão pode ser inferida desde que a precisão, linearidade e especificidade sejam estabelecidas. Sendo assim, pode-se afirmar que o método proposto é exato, visto que estes três parâmetros foram avaliados.

8.3 Certificado de Análise do insumo nanoestruturado NanoVit C – Lote 3060



Certificado de Análise

Laudo

Produto: **NanoVit C**

INCI**: Ascorbyl Tetraisopalmitate

Lote: 3060

Fabricação: 12/2011

Data de análise: 01/12/2011

Validade: 12/2012

1. ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

Análise	Especificações	Resultados
Descrição*	Líquido homogêneo de baixa viscosidade levemente amarelado, opaco	Líquido homogêneo de baixa viscosidade levemente amarelado, opaco
pH (puro)*	5,0 – 7,5	6,40
Dispersibilidade*	Dispersível em água	Dispersível em água
Densidade*	0,9800 – 1,0100 g/mL	0,9870 g/mL
Tamanho de partícula	100 – 300 nm	Conforme

* Resultados obtidos em análises realizadas no Laboratório de Controle de Qualidade da Inventiva.

Atenção: Manter a embalagem fechada, ao abrigo da luz, calor e umidade. Armazenar em temperatura que não exceda 25°C. Não armazenar fora da embalagem original.

** O INCI apresentado neste documento inclui apenas os ativos da formulação. Para INCI completo do produto, entrar em contato com a Inventiva.

CONCLUSÃO: (x) Aprovado () Reprovado

Cândice Felippi
Farmacêutica Responsável
CRF-RS 20401

8.4 Informe Técnico do insumo nanoestruturado NanoVit C



Nanovit C[®]



NanoVit C

Inventisferas contendo Vitamina C

INCI (ativos): Ascorbyl Tetraisopalmitate.

A vitamina C tem seu uso consagrado em cosméticos devido a seus efeitos favoráveis na pele, devido a sua atuação como agente redutor, capturando e combatendo agentes oxidantes e radicais livres. Apresenta capacidade internacionalmente conhecida de clareamento cutâneo, redução de manchas e melhora do aspecto geral da pele. A vitamina C, também, aumenta a produção de colágeno e previne uma série de patologias como cânceres de pele e dermatites. No entanto, sua aplicação em formulações cosméticas é limitada em virtude da baixa estabilidade, que pode ser causada, principalmente, devido à exposição ao ar e à luz.

Visando solucionar este problema e conectada às pesquisas de ponta na área científica e tecnológica, a **Inventiva** apresenta a possibilidade de estabilização e aumento da penetração cutânea da vitamina C através de sua tecnologia exclusiva **Nanoinvent** que veicula o tetraisopalmitato de ascorbilo, conhecido como vitamina C oleosa, em nanopartículas lipofílicas de alta *performance*. Esta substância é muito mais estável do que o ácido ascórbico devido à presença de grupamentos que estabilizam a molécula deixando-a solúvel em lipídios, o que também aumenta a sua permeabilidade na pele, permitindo uma ação mais eficiente da vitamina C na matriz da estrutura cutânea, local onde ocorrem reações bioquímicas importantes para a manutenção da integridade da pele. Além disso, esta forma da vitamina C apresenta pH menos ácido, que associado ao revestimento especial conferido pela nanopartícula proporciona melhor tolerância e compatibilidade cutânea, não esfolia nem irrita a pele. A vitamina C é um potente antioxidante, inibindo a peroxidação lipídica tornando-se importante na neutralização dos radicais livres. A vitamina C também é importante pela sua ação no estímulo à produção de colágeno. Atua como clareador da pele, uma vez que inibe a melanogênese.



Nanovit C[®]



As **Inventiferas** são produzidas a partir da tecnologia **Nanoinvent**, uma das mais recentes e promissoras tecnologias brasileiras para cosméticos. Esta tecnologia permite a obtenção de nanopartículas lipofílicas preparadas com substâncias lipídicas sem transmitir um sensorial oleoso para o produto final. O tamanho reduzido das partículas (100 - 200 nm) possibilita ao ativo nanoencapsulado exercer sua ação nas camadas mais profundas da pele, nas quais processos importantes relacionados à hidratação e manutenção da estrutura cutânea ocorrem e onde os cosméticos convencionais dificilmente conseguem atingir. A inovação trazida ao Brasil pela Inventiva permite que os ativos continuem atuando no estrato córneo, inclusive prolongando a sua ação, porém com o incremento adicional também alcançam as camadas mais profundas da pele, sem apresentar absorção sistêmica. O resultado é uma ação completa e eficaz. A nanotecnologia é a principal tendência dos cosméticos de última geração. Além destas vantagens, a tecnologia **Nanoinvent** protege as matérias-primas da degradação, melhora a homogeneidade, estabilidade e confere um sensorial único às formulações.

NanoVit C é um produto inovador, capaz de propiciar uma hidratação de longa duração, com sensorial sedoso e agradável, sem residual graxo. Seu tamanho nanométrico forma uma monocamada sobre a superfície cutânea e evita a perda transepidérmica de água que é um mecanismo intimamente relacionado com o ressecamento e envelhecimento cutâneo. **NanoVit C** apresenta tamanho médio de partícula em torno de 140 nm. É uma suspensão coloidal líquida, branca, leitosa e opaca. **NanoVit C** contorna os problemas de estabilidade deste ativo e da formulação em questão, e apresenta maior estabilidade que a vitamina C não encapsulada, podendo ser utilizada no preparo de diversos cosméticos.

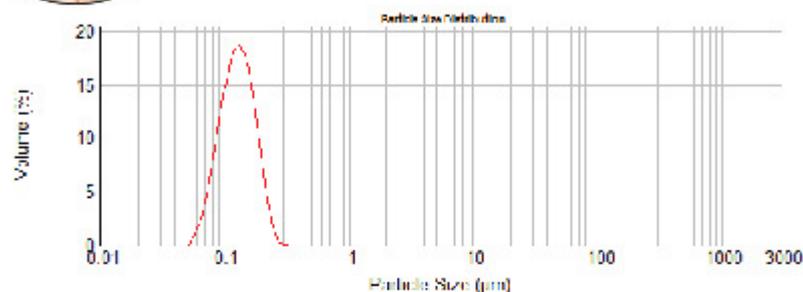


Figura 1. Distribuição de tamanho do NanoVit C analisada em equipamento de espalhamento de luz.

Analisou-se a vitamina C não encapsulada e vitamina C veiculada em nanopartículas lipídicas (NanoVit C) em gel de aristoflex com ácido Kójico a 2%, a fim de verificar a ação antioxidante (Figura 2). Observou-se que após um mês de armazenamento em prateleira, a vitamina C nanoencapsulada apresentou maior ação antioxidante do que a vitamina C não nanoencapsulada, pois a mesma inibiu a coloração amarelada característica da oxidação (Figura 2).

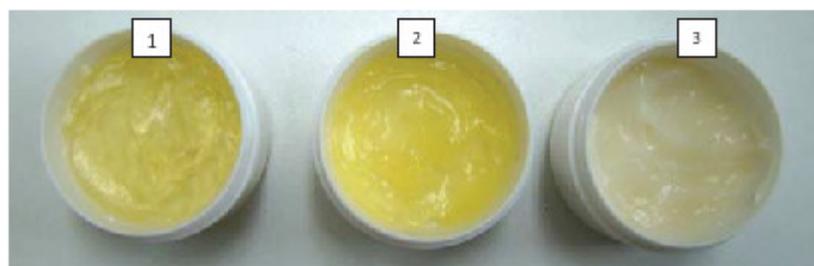


Figura 2. Atividade antioxidante de NanoVit C em gel com ácido Kójico 2%. 1 – ácido kójico 2% em gel de aristoflex; 2 – ácido kójico 2%, vitamina C 0,4% em gel de aristoflex; 3 - ácido kójico 2%, nanoVit C 10,0 % em gel de aristoflex.



Nanovit C[®]



A estabilidade da vitamina C encapsulada no **NanoVit C** foi avaliada através de ciclos de gelo/degelo, sendo alterada a temperatura de -4 °C a 40 °C por 3 vezes. Após este estresse, não houve alteração do doseamento da vitamina C nem alteração do diâmetro médio de partícula.

A estabilidade da vitamina C encapsulada também foi avaliada com alteração de pH da formulação. As formulações foram avaliadas em pH 3, 4, 5, 6, 7 e 8 por 3 meses. Após este período, não houve alteração significativa do doseamento e do diâmetro das partículas. O doseamento manteve-se em 100 ± 10 % para todas as amostras analisadas e o diâmetro sofreu alteração de mais de 20 nm. A partir destes resultados, podemos concluir que **NanoVit C** pode ser incorporado em bases com pH entre 3 e 8 com segurança de manutenção do doseamento da vitamina e estabilidade do tamanho nanométrico.

NanoVit C foi analisado clinicamente quanto à sua segurança. Não apresentou irritação dérmica primária e secundária, sensibilização, fototoxicidade e não é comedogênico. **NanoVit C** não irrita os olhos, podendo ser utilizado na região das pálpebras.

Concentração usual

NanoVit C é indicado na concentração entre 3 e 10 %, ou variar conforme critério do profissional. Não utilizar em concentração superior a 10 %.

NanoVit C contém 4 % (m/v) de tetraisopalmitato de ascorbila. Pode ser incorporado em géis, loções e cremes, tanto iônicos como não iônicos. Sua incorporação deve ser feita a frio, após preparo da base cosmética.

Observações

NanoVit C deve ser armazenado a temperaturas inferiores a 40 °C.

Sugestões de Formulação



Nanovit C®



As formulações a seguir são sugestões que exemplificam as possibilidades de aplicação do produto, devendo ser realizado estudo de estabilidade, pois a mesma pode variar de acordo com a base cosmética utilizada.

Creme-gel clareador de alta potência	
NanoVit C	5%
Ácido Kójico	2%
Gel de aristoflex q.s.p.	50g
<i>Modo de utilizar: Aplicar em toda a face, pescoço e colo, preferencialmente à noite.</i>	
<i>Características do produto: Creme-gel com alta eficácia clareadora e nutritiva da pele. Sensorial de ultrahidratação e sedosidade. Promove o clareamento de manchas, potente ação antioxidante, combatendo os radicais livres e o envelhecimento precoce. Efeito de hidratação duradoura e excelente compatibilidade.</i>	

Sérum antioxidante com mix de vitaminas	
NanoVit C	5%
NanoVit E	3%
NanoVit A	3%
Sérum facial siliconado q.s.p.	50g
<i>Modo de utilizar: Aplicar em toda a face, pescoço e colo, preferencialmente à noite.</i>	
<i>Características do produto: Sérum facial altamente nutritivo com alta ação antioxidante. Combate o envelhecimento precoce e uniformiza a coloração da pele.</i>	

Referências

1. F'guyer, S; Afaq, F; Mukhtar, H. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*, v. 19, p. 56–72 (2003).
2. Kligman, LH. *Dermatol Clin*, v. 4, p. 517–528 (1986).
3. Podda, M; Traber, MG; Weber, C; et al. *Free Radic Biol Med*, v. 24, p. 55–65 (1998).
4. Svobodova, A; Psotova, J; Walterova, D. *Biomed Pap*, v. 147, p. 137–145 (2003).



Nanovit C[®]



5. <http://revistas.ung.br/index.php/saude/artide/viewDownloadInterstitial/256/341> (ac kojico).

6. Laudo Kosmoscience RFE-TA061-10-02-R0.

Atualizado em 22/11/2010

8.5 Bula do Vitacid (componetes creme e gel)

VITACID CREME - Bula VITACID CREME

Página 1 de 1

Vitacid Creme

Ver preço (R\$)

Vitacid Creme

tretinoína
CREME 0,05%
GEL 0,025%
Uso adulto
Uso externo

FORMAS FARMACÊUTICAS E APRESENTAÇÕES - Vitacid Creme

Gel 0,025% e Creme dermatológico 0,05%.Gel e Creme: bisnaga com 25g.

COMPOSIÇÃO - Vitacid Creme

Cada grama de **VITACID creme** contém:

Tretinoína.....0,5 mg

Excipiente.....1,0 g

(Monoestearato de glicerila, ácido esteárico, polissorbato 60, vaselina líquida, óleo de amêndoas doces, glicerol, metilparabeno, propilparabeno, água destilada).

Cada grama de **VITACID gel** contém:

Tretinoína.....0,25mg

Excipiente.....1,0 g

(Carbopol, amino-metil-propanol, propilenoglicol, glicerol, álcool etílico, metilparabeno, água destilada).

INFORMAÇÕES AO PACIENTE - Vitacid Creme

COMO O VITACID FUNCIONA?VITACID ameniza os sinais de fotoenvelhecimento (rugos e aspereza), manchas escuras e, melhora os quadros de acne e queratoses de pele. Nos casos de acne, a resposta é verificada após a segunda ou terceira semana de uso, tornando-se mais evidente a partir da quinta e sexta semana. No tratamento do fotoenvelhecimento, a ação de VITACID ocorre em, aproximadamente, 24 semanas.

POR QUE O VITACID FOI INDICADO?

VITACID é indicado no tratamento de acne, fotoenvelhecimento (rugos e aspereza da pele), manchas escuras e queratoses.

QUANDO NÃO DEVO UTILIZAR O VITACID?

VITACID é contraindicado para pacientes com hipersensibilidade a um ou mais componentes da fórmula. VITACID não deve ser utilizado durante a gravidez e amamentação.

ADVERTÊNCIAS:

Até o momento não foram realizados estudos apropriados de segurança e eficácia do uso de tretinoína em crianças menores de 12 anos de idade. Durante as 3 primeiras semanas de tratamento a pele pode ficar irritada ou piorar antes de apresentar melhora.

PRECAUÇÕES:

No caso da pele estar lesada, inflamada ou infeccionada, VITACID não deve ser utilizado antes de avaliação médica.

"VITACID não deve ser utilizado por mulheres grávidas sem orientação médica. Informe imediatamente seu médico em caso de suspeita de gravidez". "Informe ao seu médico se você está amamentando". "Deve-se evitar o contato de VITACID com os olhos, pálpebras, ângulos do nariz, boca e mucosas".

Os pacientes em tratamento com VITACID, devem se proteger do sol e ter cuidados especiais com a pele, já que a pele tratada fica mais sensível. Durante as 3 primeiras semanas de tratamento a pele pode ficar irritada ou piorar antes de apresentar melhora. Deve-se evitar lavar a pele tratada durante, pelo menos, 1 hora após aplicação do produto. Evitar o uso de qualquer medicamento tóxico na mesma área tratada com tretinoína, 1 hora antes ou depois da aplicação do produto, com risco de interferência na ação ou irritação cutânea. A tretinoína geralmente é aplicada à noite, possibilitando o uso de outros produtos durante o dia. Durante o tratamento com VITACID, evitar exposição das áreas tratadas ao sol, vento ou frio. A pele tratada pode estar mais propensa a queimaduras solares, ressecamento ou irritação, especialmente durante a segunda e terceira semana de uso. Informe ao seu médico, caso ocorra. Não interrompa o tratamento sem a orientação do seu médico, a menos que ocorra irritação intensa. Para melhores resultados nos tratamentos para os quais a tretinoína é indicada, é recomendável o uso concomitante de filtros solares com alto fator de proteção.

INTERAÇÕES MEDICAMENTOSAS:

VITACID deve ser utilizado com cautela quando administrado juntamente com sabões ou agentes de limpeza, sabonetes esfoliantes, cosméticos secativos, produtos alcoólicos, adstringentes e perfumes.

Produtos com enxofre, resorcinol, ácido salicílico, outros derivados de tretinoína e peróxido de benzoila devem ser evitados. VITACID é um produto de uso tópico, não sendo destinado a nenhuma outra via de administração.

"Informe ao médico o aparecimento de reações indesejáveis".

"Informe ao seu médico se você está fazendo uso de algum outro medicamento".

"Não use medicamento sem o conhecimento do seu médico. Pode ser perigoso para a sua saúde".