

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

**SECAGEM POR ASPERSÃO DE NANOCÁPSULAS DE
NÚCLEO LIPÍDICO CONTENDO TRETINOÍNA:
DESENVOLVIMENTO E INCORPORAÇÃO EM
HIDROGÉIS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Marila Crivellaro Lay Marchiori

**Santa Maria, RS, Brasil
2010**

**SECAGEM POR ASPERSÃO DE NANOCÁPSULAS DE
NÚCLEO LIPÍDICO CONTENDO TRETINOÍNA:
DESENVOLVIMENTO E INCORPORAÇÃO EM HIDROGÉIS**

por

Marila Crivellaro Lay Marchiori

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Controle e Avaliação de Insumos e Produtos Farmacêuticos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**

Orientador: Prof. Dr. Ruy Carlos Ruver Beck

Santa Maria, RS, Brasil

2010

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**SECAGEM POR ASPERSÃO DE NANOCÁPSULAS DE NÚCLEO
LIPÍDICO CONTENDO TRETINOÍNA: DESENVOLVIMENTO E
INCORPORAÇÃO EM HIDROGÉIS**

elaborada por
Marila Crivellaro Lay Marchiori

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Farmacêuticas

Comissão Examinadora:

**Prof. Dr. Ruy Carlos Ruver Beck
(Orientador)**

**Prof. Dra. Irene Külkamp
(UFRGS)**

**Prof. Dra. Cristiane de Bona da Silva
(UFSM)**

Santa Maria, 07 de dezembro de 2010.

*À minha família e namorado, pelo
incentivo e apoio necessário
para que eu chegasse até aqui*

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pelas oportunidades oferecidas.

Ao Departamento de Farmácia Industrial pela estrutura física oferecida.

Ao Prof. Dr. Ruy Carlos Ruver Beck, pela sua dedicada orientação, amizade, incentivo, conhecimentos compartilhados e exemplo profissional.

Aos professores e funcionários do Departamento de Farmácia Industrial pela amizade e apoio.

Ao Corpo Docente do PPGCF, pelos conhecimentos transmitidos.

À Prof^a. Dr^a. Sílvia S. Guterres e Prof^a. Dr^a Adriana R. Pohlmann da UFRGS pela concessão das análises de tamanho de partícula, polidispersão e potencial zeta.

Aos bolsistas aos colegas de laboratório de Tecnologia Farmacêutica pelo auxílio, companheirismo e pelos bons momentos de convivência e descontração. Em especial a Karine, Michel, Roberta, Luana, Rossana, Márcia, Aline, Juliana e Lucas.

À Rede de Nanocosméticos CNPq/MCT pelo apoio financeiro.

Ao CNPq (Programa PIBIC) e ao Programa FIPE Jr/UFSM pela concessão das bolsas de iniciação científica vinculadas a este trabalho.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Universidade Federal de Santa Maria

SECAGEM POR ASPERSÃO DE NANOCÁPSULAS DE NÚCLEO LIPÍDICO CONTENDO TRETINOÍNA: DESENVOLVIMENTO E INCORPORAÇÃO EM HIDROGÉIS

AUTORA: Marila Crivellaro Lay Marchiori

ORIENTADOR: Ruy Carlos Ruver Beck

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 07 de dezembro de 2010.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade das nanocápsulas de núcleo lipídico em manter a sua proteção frente à fotodegradação da tretinoína, após a sua conversão em materiais pulverulentos, através da técnica de secagem por aspersão (SD-TTN-NC). Este processo foi realizado empregando a lactose como adjuvante de secagem. Posteriormente, foi verificada a aplicabilidade destes pós na preparação de formulações dermatológicas. Para avaliar a influência da presença do polímero na interface óleo/água foi também realizada a secagem por aspersão de uma nanoemulsão contendo tretinoína (SD-TTN-NE). Ambos os pós (SD-TTN-NC e SD-TTN-NE) mostraram rendimento em torno de 30-40% e adequada recuperação das nanoestruturas após redispersão aquosa. SD-TTN-NE mostrou menor eficiência de encapsulação do fármaco ($88,74 \pm 0,65\%$) do que SD-TTN-NC ($94,22 \pm 2,01\%$), mostrando que a parede polimérica exerce um efeito positivo e, por isso, esta formulação foi selecionada para prosseguir com os estudos de fotoestabilidade. O ensaio de fotodegradação do pó redisperso em água mostrou que as nanocápsulas de núcleo lipídico reproduziram a fotoestabilidade demonstrada pela suspensão coloidal original (118 ± 27 min e 118 ± 12 min, respectivamente). Com base nestes resultados, ficou evidente que SD-TTN-NC poderia ser empregado como forma intermediária na preparação de hidrogéis. Neste sentido, foram propostas duas técnicas de preparação: a) dispersando o Carbopol Ultrez 10[®] na redispersão aquosa dos pós (método 1) ou b) adicionando o pó diretamente no gel previamente preparado (método 2). Além destes, foram preparados hidrogéis empregando as suspensões aquosas de nanocápsulas de núcleo lipídico. Todas as formulações apresentaram teor de tretinoína próximo a 0,5 mg/g, pH adequado à aplicação cutânea e comportamento pseudo-plástico. Através do método das placas paralelas, foi demonstrado que os hidrogéis preparados pelo método 1 tem menor espalhabilidade ($1,61 \pm 0,13$ mm²/g) do que os preparados pelo método 2 ($2,17 \pm 0,05$ mm²/g). De maneira geral, as amostras preparadas a partir dos pós foram as que tiveram menor espalhabilidade, independente do método empregado, indicando que a presença de lactose influencia nesta característica. Quanto à reologia, os maiores valores de rendimento foram apresentados pelas formulações que apresentaram menor espalhabilidade. O índice de consistência foi estatisticamente igual para todas as formulações, exceto para o hidrogel preparado com a suspensão coloidal branca (sem fármaco). Quanto à fotoestabilidade, os hidrogéis propostos apresentaram comportamento tão eficiente quanto à formulação obtida a partir da suspensão original de nanocápsulas de núcleo lipídico. Os pós secos por aspersão mostraram-se como importantes produtos intermediários no desenvolvimento de hidrogéis para aplicação cutânea de tretinoína.

Palavras chave: Tretinoína, nanocápsulas, hidrogel, secagem por aspersão.

ABSTRACT

Master Dissertation

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Universidade Federal de Santa Maria**DRY POWDERS CONTAINING TRETINOIN-LOADED LIPID-CORE
POLYMERIC NANOCAPSULES: DEVELOPMENT AND
INCORPORATION INTO HYDROGELS**

AUTHOR: Marila Crivellaro Lay Marchiori

ADVISER: Ruy Carlos Ruver Beck

Place and Date of Defense: Santa Maria, 07 de dezembro de 2010.

The aim of this work was to study the ability of lipid-core polymeric nanocapsules to protect tretinoin against UV degradation, even after their conversion to spray-dried powders and also to evaluate the feasibility of using these spray-dried powders in the preparation of semisolid dermatological nanomedicines. Spray-dried tretinoin-loaded lipid core nanocapsules (SD-TTN-NC) were prepared using lactose as drying adjuvant. In order to study the effect of the polymeric layer, spray-dried powders were also prepared using a nanoemulsion (SD-TTN-NE). The process yields were between 30 and 40 %. SD-TTN-NE showed lower encapsulation efficiency ($88.74 \pm 0.65\%$) compared to SD-TTN-NC ($94.22 \pm 2.01\%$). After aqueous redispersion of the spray-dried powders their supernatants showed the presence of nanostructures with mean size close to the original suspension. Similar photodegradation half-life times were showed for tretinoin loaded in lipid-core nanocapsules (118 ± 12 min) or in the respective spray-dried powders (118 ± 27 min). Based in our results, the powders can be suggested as intermediate products in the development of nanomedicines. Two approaches were evaluated in the development of hydrogels: a) dispersing Carbopol Ultrez 10[®] in an aqueous redispersion of the SD-TTN-NC (method 1) or b) by the direct incorporation of the SD-TTN-NC in a hydrogel previously formed (method 2). Hydrogels were also prepared using original nanocapsule suspensions. All semisolid formulations presented drug content close to theoretical value, adequate pH values and pseudo-plastic behavior. The parallel plate technique demonstrated that hydrogels prepared by method 1 has lower spreadability ($1.61 \pm 0.13 \text{ mm}^2 \cdot \text{g}^{-1}$) than that prepared by method 2 ($2.17 \pm 0.05 \text{ mm}^2 \cdot \text{g}^{-1}$). However, both formulations showed worst spreadability factor than hydrogels prepared from nanoparticle suspensions, indicating that the presence of lactose led to a decrease in the spreadability of the formulations. Hydrogels prepared with the spray-dried powder showed higher yield stress compared to that prepared with the nanocapsule suspensions. Regarding the consistency index, all hydrogels presented similar values, excepting the formulation prepared with blank nanocapsules. The photodegradation profiles of hydrogels containing SD-TTN-NC were similar to hydrogel prepared with the original suspension. So, spray-dried powders were feasible materials to be use as intermediate products in the development of hydrogels intended for cutaneous application without losing their ability to increase the photostability of tretinoin.

Keywords: Tretinoin; lipid core nanocapsules; hydrogel; photodegradation, spray-dryer.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1: Desenvolvimento e fotoestabilidade de formas pulverulentas contendo tretinoína associada a nanocápsulas de núcleo lipídico

- FIGURA 1 - Rheological behavior of the tretinoin-loaded lipid-core nanocapsules and tretinoin-loaded nanoemulsion before (TTN-NC and TTN-NE, respectively) and after addition of lactose at 10 % (TTN-NC+L and TTN-NE+L, respectively)..... 48
- FIGURA 2 - Scanning electron microscopy images of (A and B) SD-TTN-NC, (C and D) SD-TTN-NE and (E and F) SD-L. [A, C and E (1,000x); B, D and F (7,000x)] 50
- FIGURA 3 - Photodegradation profile of tretinoin as a function of time under UVA light exposure (redispersed spray-dried powders containing tretinoin-loaded lipid-core nanocapsules – SD-TTN-NC; tretinoin-loaded lipid-core nanocapsules –TTN-NC; and free tretinoin solution - TTN). Results represent the mean \pm standard deviation of 3 batches 52
- FIGURA 4 - Percentage (%) of photodegradation and half-life time of tretinoin in the different samples exposed to UVA light for 1 hour (redispersed spray-dried powders containing tretinoin-loaded lipid-core nanocapsules – SD-TTN-NC; tretinoin-loaded lipid-core nanocapsules –TTN-NC; and free tretinoin solution - TTN). Results represent the mean \pm standard deviation of 3 batches 53

CAPÍTULO 2: Nanomedicamento tópico contendo tretinoína: emprego de sistemas pulverulentos como produto intermediário

- FIGURA 1 - Graphical representation of viscosity (mPa.s) of hydrogels prepared by methods 1 and 2 using spray-dried powders containing TTN-loaded lipid-core nanocapsules or spray-dried lactose (HG-NC-1, HG-NC-2, HG-L-1 and HG-L-2, respectively) and HG prepared with TTN-loaded lipid-core nanocapsules and blank lipid-core nanocapsules (HG-TTN-NC and HG-B-NC, respectively) as a function of the shear rate (s^{-1}) 71
- FIGURA 2 - Photodegradation profile of hydrogels prepared by methods 1 and 2 using spray-dried powders containing TTN-loaded lipid-core nanocapsules (HG-NC-1 and HG-NC-2, respectively), HG prepared using TTN-loaded lipid-core nanocapsules and commercial hydroalcoholic gel containing free TTN (HG-C), exposed to UVA light for 8 hours. Concentration of TTN remaining *versus* time 73

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1: Desenvolvimento e fotoestabilidade de formas pulverulentas contendo tretinoína associada a nanocápsulas de núcleo lipídico

TABELA 1 - Physicochemical characteristics of tretinoin-loaded lipid-core nanocapsules (TTN-NC) and nanoemulsion (TTN-NE)	47
TABELA 2 - Physicochemical characteristics of spray-dried powders containing tretinoin-loaded lipid-core nanocapsules (SD-NC-TTN) or tretinoin-loaded nanoemulsion (SD-NE-TTN)	49

CAPÍTULO 2: Nanomedicamento tópico contendo tretinoína: emprego de sistemas pulverulentos como produto intermediário

TABELA 1 - Quali-quantitative composition of hydrogels	66
TABELA 2 - Physicochemical and spreadability characteristics of hydrogels prepared with spray-dried powders by methods 1 and 2 (HG-NC-1 and HG-NC-2, respectively), blank lipid-core nanocapsules (HG-B-NC) and TTN-loaded lipid-core nanocapsules (HG-TTN-NC)	69
TABELA 3 - Regression coefficient (r^2) obtained in the mathematical modeling of the hydrogels using four different flow models to describe the shear rate–shear stress curve	71
TABELA 4 - Flow (n) and consistency (κ) indexes and yield stress of hydrogels prepared using spray-dried powders containing TTN-loaded lipid-core nanocapsules (HG-NC-1 and HG-NC-2), placebo lipid-core nanocapsules (HG-B-NC) and tretinoin-loaded lipid-core nanocapsule (HG-TTN-NC)	72
TABELA 5 - Half-life time and percentage (%) of photodegradation of TTN in hydrogels prepared with the spray-dried powders (HG-NC-1 and HG-NC-2), lipid-core nanocapsule suspension (HG-TTN-NC) and the marketed hydrogel (HG-C) ...	74

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	12
OBJETIVOS	17
1.1 Objetivo geral	18
1.2 Objetivos específicos	18
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
1.1 Nanotecnologia e os sistemas carreadores de fármaco	20
1.2 Técnicas de secagem de nanopartículas poliméricas	24
1.3 Nanopartículas poliméricas em formulações tópicas	29
1.4 Tretinoína	31
CAPÍTULO 1: Desenvolvimento e fotoestabilidade de formas pulverulentas contendo tretinoína associada a nanocápsulas de núcleo lipídico	36
1.1 Introdução	37
PUBLICAÇÃO 1: Spray-dried powders containing tretinoin-loaded engineered lipid-core nanocapsules: development and photostability study	38
CAPÍTULO 2: Nanomedicamento tópico contendo tretinoína: emprego de sistemas pulverulentos como produto intermediário	58
2.1 Introdução	59
PUBLICAÇÃO 2: Topical semisolid nanomedicine containing tretinoin: using spray-dried powders as an intermediate product	60

DISCUSSÃO GERAL	79
CONCLUSÕES	87
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89

INTRODUÇÃO

A tretinoína, também denominada ácido retinóico, é um fármaco que apresenta inúmeros efeitos fisiológicos, dentre os quais se destacam, a regulação do crescimento e diferenciação de células epiteliais, controle da secreção sebácea, comedólise, atividade anti-inflamatória e aumento na síntese do colágeno. Estes efeitos justificam seu emprego no tratamento tópico de acne, hiperqueratoses, envelhecimento cutâneo, entre outros (RIGOPOULOS *et al.*, 2004).

Apesar da reconhecida eficácia em tratamentos dermatológicos, a tretinoína geralmente provoca irritação, vermelhidão e descamação na região onde é aplicada, o que dificulta a adesão dos pacientes ao tratamento (BERGER *et al.*, 2007). Além destas características, a tretinoína apresenta instabilidade frente à radiação ultravioleta e ao oxigênio, assim como problemas de solubilidade aquosa. Este último aspecto exige, em algumas circunstâncias, a adição de co-solventes orgânicos em suas formulações dermatológicas, podendo representar mais um importante fator no aparecimento e agravamento da irritação cutânea. Em relação à absorção percutânea do fármaco, existem evidências de que esta seja em torno de 2 %, quando veiculado em uma especialidade farmacêutica disponível no mercado. Acredita-se que a proporção do fármaco que é absorvida seja aquela que excede a ligação com os receptores nucleares das células da epiderme. Portanto, uma liberação lenta e gradual do fármaco evitaria a absorção percutânea e, ainda, minimizaria os efeitos colaterais característicos dos retinóides (BERSHAD *et al.*, 2001).

Com o intuito de contornar as limitações normalmente observadas durante o tratamento tópico com a tretinoína, pode-se utilizar os conceitos da nanotecnologia. Neste contexto, os nanocarreadores representam uma alternativa promissora de liberação modificada, melhora na solubilidade, proteção físico-química, além da diminuição da toxicidade ou efeitos irritantes do fármaco durante a aplicação tópica (GUTERRES *et al.*, 2007). As nanopartículas podem ser conceituadas como sistemas carreadores de fármacos que apresentam tamanho inferior a 1 micrômetro e exibem características especiais devido ao seu pequeno tamanho (SAHOO e LABHASETWAR, 2003). Os principais sistemas nanoestruturados empregados no desenvolvimento de nanomedicamentos e nanocosméticos são: nanopartículas poliméricas (nanocápsulas e nanoesferas), nanoemulsões, lipossomas e nanopartículas lipídicas. Estes

nanocarreadores diferem entre si pela estrutura, composição e afinidade por diferentes tipos de moléculas (CROSERÁ *et al.*, 2009).

As nanoesferas são estruturas matriciais poliméricas que, de modo geral, apresentam formato esférico. As nanocápsulas são estruturas vesiculares constituídas por um invólucro polimérico disposto ao redor de um núcleo de natureza oleosa (VAUTHIER e BOUCHEMAL, 2009). A porção nuclear desta nanopartícula é líquida, e sua modificação através da adição de um lipídio sólido representa o desenvolvimento de uma nova geração de nanopartículas poliméricas, as nanocápsulas de núcleo lipídico. Para isso, o núcleo deve apresentar como composição, uma dispersão de lipídio líquido e lipídio sólido, como triglicerídios dos ácidos cáprico/caprílico e monoestearato de sorbitano, respectivamente. Devido à natureza dos componentes, as nanocápsulas de núcleo lipídico apresentam como principal diferença estrutural, um núcleo com maior viscosidade do que o das nanocápsulas convencionais (JAGER *et al.*, 2009, OURIQUE *et al.*, 2010a).

Apesar das inúmeras vantagens decorrentes da associação de fármacos aos nanocarreadores, tais como, o aumento da eficiência (MARCHIORI *et al.*, 2010), diminuição da toxicidade (PAESE *et al.*, 2009), melhora na permeação cutânea (ALVES *et al.*, 2007) e obtenção de uma liberação prolongada (FONTANA *et al.*, 2009), problemas de estabilidade podem ser observados durante o armazenamento. Após a preparação, as nanopartículas poliméricas estão sob a forma de suspensão coloidal aquosa, e neste meio, são suscetíveis à hidrólise de seus componentes, degradação do polímero, migração do fármaco associado às nanoestruturas para o meio aquoso, contaminação microbiológica, entre outros (SCHAFFAZICK *et al.*, 2002; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003a). Com o intuito de melhorar a estabilidade físico-química destas preparações, frente ao armazenamento, foram propostas alternativas como a sua conversão em formas sólidas, através de processos de secagem como a liofilização (SAEZ *et al.*, 2000; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003b), a secagem por aspensão (MULLER *et al.*, 2000; POHLMANN *et al.*, 2002; BECK *et al.*, 2004; BECK *et al.*, 2006; SCHAFFAZICK *et al.*, 2006; TEWA-TAGNE *et al.*, 2006, TEWA-TAGNE *et al.*, 2007a; TEWA-TAGNE *et al.*, 2007b; BECK *et al.*, 2008; GUTERRES *et al.*, 2009) e a granulação por via úmida (FRIEDRICH *et al.*, 2010a; FRIEDRICH *et al.*, 2010b). A partir destes processos são obtidos pós microestruturados que podem ser incorporados em formas farmacêuticas derivadas, como grânulos (FRIEDRICH *et al.*, 2010a), comprimidos (FRIEDRICH *et al.*, 2010b) ou ainda, formas farmacêuticas semissólidas (TERROSO *et al.*, 2009).

Estão descritos na literatura inúmeros trabalhos que desenvolveram, com sucesso, preparações tópicas contendo substâncias ativas associadas a nanocarreadores. A área cosmética tem sido contemplada, principalmente, com formulações contendo fotoprotetores associados a sistemas nanoestruturados (PAESE *et al.*, 2009; VETTOR *et al.*, 2010). Por outro lado, o desenvolvimento de nanomedicamentos a partir de nanopartículas poliméricas para uso tópico abrangem, principalmente, os corticóides (MARCHIORI *et al.*, 2010) e anti-inflamatórios não-esteróides (ALVES *et al.*, 2005; MILÃO *et al.*, 2003). Esta nova abordagem representa uma vantagem sobre os medicamentos convencionais, devido à capacidade dos nanocarreadores em modular a permeação de fármacos pelo estrato córneo, permitindo inclusive que, em alguns casos, eles atinjam as camadas mais profundas da epiderme sem, no entanto, alcançar a circulação sistêmica (GUTERRES *et al.*, 2007; RAWAT *et al.*, 2006).

Até o momento, a incorporação dos sistemas nanoestruturados às formas dermatológicas tem sido realizada, basicamente, através da adição direta das suspensões coloidais, em substituição à água, ao polímero formador do gel ou à composição da emulsão (ALVES *et al.*, 2007; PAESE *et al.*, 2009; MARCHIORI *et al.*, 2010; OURIQUE *et al.*, 2010b). Na maior parte das vezes, a adição de um grande volume da suspensão de nanopartículas se faz necessária, para que se obtenha uma forma farmacêutica com a concentração desejada. Este grande volume a ser adicionado pode inviabilizar a adição de outras substâncias necessárias à formulação dermatológica, como emolientes e umectantes, fundamentais para o tratamento de determinadas patologias, constituindo-se em um dos principais obstáculos para esse desenvolvimento.

Recentemente, nosso grupo de pesquisa relatou a associação de tretinoína a nanocápsulas convencionais e também, a nanocápsulas de núcleo lipídico (OURIQUE *et al.*, 2008; OURIQUE *et al.*, 2010a). Em ambos os trabalhos, foram obtidos bons resultados quanto à caracterização e fotoestabilidade do fármaco encapsulado. Entretanto, estes nanossistemas diferiram entre si, pela estabilidade físico-química, a qual foi 4 vezes maior para a formulação de tretinoína associada à nanocápsulas de núcleo lipídico. Dando continuidade à este trabalho, foi demonstrada a viabilidade tecnológica de preparação de um hidrogel empregando a suspensão aquosa de nanocápsulas de núcleo lipídico. Esta formulação semissólida, além de aumentar a fotoestabilidade do fármaco, pôde ser desenvolvida sem a necessidade de adição de cossolventes orgânicos, os quais eram imprescindíveis para manter a solubilidade da tretinoína em formulações dermatológicas tradicionais (OURIQUE *et al.*, 2010b). Apesar das vantagens alcançadas, a composição desta formulação semissólida ficou

restrita, pois foi necessário acrescentar um grande volume da suspensão coloidal para o ajuste da concentração desejada de fármaco, inviabilizando a adição de outros componentes líquidos. Nesse sentido, a obtenção de sistemas pulverulentos, através da secagem por aspersão das suspensões coloidais, e o uso destes pós como estratégia de incorporação de nanocápsulas em formas semissólidas, evitaria a adição da água oriunda das suspensões, permitindo a incorporação de outros excipientes na formulação.

A partir do exposto, este trabalho está focado no desenvolvimento, através da técnica da secagem por aspersão, de microaglomerados redispersíveis de lactose contendo tretinoína associada a nanocápsulas de núcleo lipídico, como uma alternativa para a incorporação de sistemas nanoestruturados em formas farmacêuticas semissólidas. Neste contexto, exploramos as vantagens da encapsulação de um fármaco instável, na obtenção de sistemas sólidos através da secagem por aspersão, avaliando a integridade da nanopartícula antes e após o processo de secagem. Adicionalmente, o estudo foi delineado com o propósito de avaliar a viabilidade de preparação de hidrogéis, empregando os pós desenvolvidos como produtos intermediários, e, também, traçar um estudo referente às propriedades reológicas e fisico-químicas das formulações semissólidas, além de verificar o perfil de fotodegradação da tretinoína nanoencapsulada após a incorporação nos hidrogéis.

1.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi desenvolver sistemas pulverulentos contendo tretinoína nanoencapsulada, com aplicação no desenvolvimento de formas farmacêuticas semissólidas, avaliando-se principalmente a capacidade de proteção dos nanossistemas frente à fotodegradação do fármaco, antes e após a incorporação em hidrogéis.

1.2 Objetivos específicos

- Preparar e caracterizar suspensões de nanocápsulas de núcleo lipídico contendo tretinoína, na concentração de 0,5 mg/mL, utilizando um polímero biodegradável e biocompatível, a poli(ϵ -caprolactona), e empregando butilhidroxitolueno (BHT) como excipiente antioxidante;
- Avaliar a possibilidade de utilização da secagem por aspersão na conversão de suspensões de nanocápsulas de núcleo lipídico contendo tretinoína, em formas sólidas;
- Estudar o emprego das formas sólidas desenvolvidas como produto intermediário na preparação de hidrogéis destinados a aplicação cutânea, avaliando-se duas técnicas diferenciadas de incorporação;
- Estabelecer um estudo comparativo do potencial de prevenção da fotodegradação da tretinoína associada aos sistemas nanoestruturados na sua forma original (suspensões de nanocápsulas), na forma sólida (redispersa em água) e nas formulações semissólidas.

REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Nanotecnologia e os sistemas carreadores de fármacos

A nanotecnologia, no âmbito farmacêutico, está principalmente representada pelo desenvolvimento e otimização de sistemas carreadores de fármacos, substâncias ativas ou ativos cosméticos. Os sistemas abordados na nanociência compreendem partículas submicrométricas que podem modular a velocidade e o local de liberação de fármacos, o grau de permeação através das barreiras fisiológicas, penetração na circulação sistêmica e chegada ao local onde a atividade farmacológica é exigida (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003a; ALONSO *et al.*, 2004). Os carreadores nanoestruturados têm a propriedade de direcionar o fármaco ao alvo específico dentro do organismo, gerando um aumento da sua concentração no local de ação e redução dos efeitos colaterais (RAWAT *et al.*, 2006). A associação de fármacos aos sistemas nanocarreadores não interfere em seu mecanismo de ação. As principais alterações observadas estão relacionadas às características físico-química inerentes ao fármaco, como solubilidade e estabilidade frente a agentes reconhecidamente agressores (luz, ar, calor, enzimas e pH). Assim, pode-se considerar que os sistemas nanoparticulados de liberação conseguem alterar propriedades biofarmacêuticas tais como, absorção, distribuição, metabolismo e eliminação. Devido a isto, é possível obter formas de administração alternativas, baseando-se nas novas características físico-químicas, farmacocinéticas e de biodistribuição do fármaco (OURIQUE *et al.*, 2010a). Além disso, é possível reduzir a irritação tecidual, aumentar a biodisponibilidade e diminuir a frequência de administração das doses, o que pode aumentar a adesão dos pacientes ao tratamento (DEVALAPALLY *et al.*, 2007; SAHOO AND LABHASETWAR, 2003).

Os nanocarreadores vêm sendo desenvolvidos para emprego em diversas vias de administração, dentre as quais se destacam a parenteral, oral, oftálmica e tópica (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003a; ALONSO, 2004). A administração parenteral tem sido contemplada, principalmente, com nanopartículas associadas a fármacos antitumorais (BERNARDI *et al.*, 2009; OURIQUE *et al.*, 2010a; JEONG *et al.*, 2010) buscando uma distribuição mais seletiva. Quanto à via oral, o maior objetivo dos sistemas nanoestruturados está em conferir proteção ao fármaco contra a degradação por enzimas digestivas, minimizar a irritação da mucosa gástrica pelo fármaco (BECK *et al.*, 2006; BECK *et al.*, 2007) e aumentar

a sua biodisponibilidade (SONAJE *et al.*, 2010). A aplicação tópica de fármacos associados a sistemas nanoestruturados visa diminuir a irritação local (SHAH *et al.*, 2007; PAESE *et al.*, 2009), modular a permeação cutânea, além de evitar que o fármaco alcance a circulação sanguínea através da pele (ALVES *et al.*, 2007).

Os principais carreadores nanoestruturados estudados na área farmacêutica e cosmética são: os lipossomas, as nanopartículas lipídicas, as nanoemulsões e as nanopartículas poliméricas. Os lipossomas apresentam um núcleo aquoso envolvido por uma camada fosfolipídica e devido a estas características são capazes de encapsular fármacos hidrofílicos e lipofílicos (RAWAT *et al.*, 2006). As nanopartículas lipídicas foram inicialmente desenvolvidas na década de 90, como alternativa aos lipossomas e emulsões (PARDEIKE *et al.*, 2010). São constituídas basicamente por substâncias graxas de caráter lipídico e/ou oleoso e podem ser divididas em nanopartículas lipídicas sólidas e carreadores lipídicos nanoestruturados. Sua preparação é facilmente escalonável já que podem ser obtidas através da homogeneização a alta pressão (MÜLLER *et al.*, 2000). As nanopartículas poliméricas compreendem nanocápsulas e nanoesferas, constituídas por um núcleo oleoso cercado por uma parede polimérica ou por uma matriz polimérica, respectivamente. Estas nanopartículas apresentam vantagens relacionadas à estabilidade *in vivo* e também durante o armazenamento, quando comparadas aos lipossomas. Através de modificações na composição das nanocápsulas, foram desenvolvidas as nanocápsulas de núcleo lipídico, as quais apresentam uma diferente arquitetura supramolecular, por possuírem um núcleo mais viscoso que as nanocápsulas convencionais. Por este motivo, podem aumentar a estabilidade físico-química, em termos de manutenção do teor de fármaco (JAGER *et al.*, 2009; OURIQUE *et al.*, 2010a). Já as nanoemulsões são formadas por gotículas de óleo estabilizadas por tensoativos, em um meio aquoso, formando uma dispersão coloidal (BOUCHEMAL *et al.*, 2004).

Um dos mecanismos pelos quais os nanocarreadores se distribuem pelo organismo e alcançam seletivamente alguns órgãos e tecidos está relacionado ao fato de o sistema imunológico reconhecer essas nanopartículas como substâncias estranhas, e removê-las da circulação sanguínea através da opsonização. O sistema fagocitário mononuclear, principalmente representado pelas células de Kupffer do fígado e macrófagos do baço e da medula óssea, é o responsável pela remoção das nanoestruturas circulantes. Desse modo, pode-se obter um direcionamento das nanopartículas para os órgãos do sistema retículo-endotelial (DEVALAPALLY *et al.*, 2007).

A presença de polímeros hidrofílicos (polietilenoglicóis, polissorbato 80, entre outros) na superfície das nanopartículas, permite que elas permaneçam por um maior tempo na circulação sanguínea. Estas modificações superficiais, que agem como um revestimento catiônico, inviabilizam a adsorção de proteínas séricas (opsonização), e, portanto, dificultam o reconhecimento pelos macrófagos ou outras células fagocíticas. Sendo assim, o maior período de permanência na circulação e o pequeno tamanho, permitem que as nanopartículas consigam atravessar o endotélio de capilares fenestrados presentes em tecidos inflamados e tumores sólidos, caracterizando-se uma vetorização passiva (DEVALAPALLY *et al.*, 2007).

A preparação de nanopartículas poliméricas pode ser realizada através de métodos que requerem uma ou duas etapas. Na primeira etapa ocorre a formação de um sistema emulsionado, e na segunda, a formação das nanopartículas através da precipitação ou geleificação do polímero ou, ainda, polimerização de monômeros. Considerando o esquema de preparação que exige apenas uma etapa, um dos principais exemplos seria a nanoprecipitação ou deposição de polímero pré-formado, nomenclatura dada para obtenção de nanoesferas ou nanocápsulas, respectivamente (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003a; FRIEDRICH *et al.*, 2008; OURIQUE *et al.*, 2008; FONTANA *et al.*, 2009; ALMEIDA *et al.*, 2009; OURIQUE *et al.*, 2010a). Nesta técnica, as nanopartículas formam-se quando uma solução do polímero se difunde por um meio não solvente (VAUTHIER e BOUCHEMAL *et al.*, 2009; MORA-HUERTAS *et al.*, 2010).

O método de preparação de nanocápsulas de núcleo lipídico empregado neste trabalho foi o método da deposição interfacial de polímero pré-formado, patenteado por Fessi e colaboradores em 1988 e modificado por Jager e colaboradores em 2009. Neste método, uma fase orgânica, miscível em água (acetona), contendo um óleo, um polímero e um tensoativo de baixo de EHL (equilíbrio hidrófilo/lipófilo), é injetada sobre uma fase aquosa contendo um tensoativo de alto EHL. As nanocápsulas são obtidas na forma de uma suspensão coloidal aquosa, e são formadas quando a fase orgânica é adicionada à fase aquosa. Neste momento, o solvente orgânico se difunde para a água, e na interface óleo/água o polímero precipita em volta das gotículas de óleo. A vantagem deste método é a sua eficiente reprodutibilidade na obtenção de partículas pequenas e a capacidade de alcançar altas taxas de encapsulação do fármaco (MORA-HUERTA *et al.*, 2010). As nanocápsulas poliméricas convencionais são compostas por um núcleo de natureza oleosa, diferindo desta nova geração de nanocápsulas poliméricas as quais apresentam um núcleo hidrofóbico contendo uma substância lipídica sólida, como o monoestearato de sorbitano. Apesar da diferença relacionada com a

viscosidade do núcleo, ambos nanocarreadores, podem ser preparados pela técnica descrita por Fessi (FESSI *et al.*, 1988; JAGER *et al.*, 2009).

As nanopartículas poliméricas podem ser formuladas com polímeros de origem sintética ou natural (GÓMEZ-GAETE *et al.*, 2007; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003a). Os polímeros biodegradáveis são os mais adequados para uso em formulações de aplicação humana, pois não representam risco de toxicidade e bioacumulação. A poli(ϵ -caprolactona) é o polímero mais empregado devido a sua biocompatibilidade, biodegradabilidade e propriedades mecânicas (GUTERRES *et al.*, 2007). Existem outros tipos de polímeros que são também amplamente estudados na preparação de sistemas nanoparticulados, tais como: poli(alquilcianoacrilatos), poli(ácido lático), poli(ácido lático-co-ácido glicólico), poli(ácido glicólico), entre outros (BARRAT *et al.*, 2000; FONTANA *et al.*, 2009; FONTANA *et al.*, 2010).

Devido à natureza coloidal das nanopartículas poliméricas, algumas dificuldades técnicas são impostas para a sua adequada caracterização físico-química. De forma geral, esta caracterização contempla a avaliação e distribuição do tamanho de partículas, índice de polidispersão, teor de fármaco no sistema, eficiência de encapsulação, potencial zeta, pH, análise morfológica, entre outras (FRIEDRICH *et al.*, 2008; OURIQUE *et al.*, 2008; FONTANA *et al.*, 2009; ALMEIDA *et al.*, 2009; OURIQUE *et al.*, 2010a; KÜLKAMP *et al.*, 2009). As análises específicas destes sistemas coloidais são normalmente baseadas em métodos de correlação de fótons, microscopia eletrônica (criofratura, transmissão, varredura), espalhamento de luz dinâmico, microeletroforese, calorimetria diferencial exploratória, as quais são consideradas técnicas sofisticadas, que em geral não são abrangidas na rotina de laboratórios de avaliação de qualidade de medicamentos e cosméticos. Sendo assim, a caracterização físico-química corresponde a uma das etapas mais importantes e dispendiosas do desenvolvimento de sistemas nanoestruturados para administração de fármacos (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003a).

Após a preparação, as nanopartículas poliméricas estão sob a forma de suspensão coloidal aquosa e quando armazenadas nesse meio podem apresentar problemas quanto à estabilidade físico-química, tendência à agregação das partículas, contaminação microbiana, perda da substância ativa incorporada para a fase contínua e possibilidade de hidrólise do polímero (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003a; FRIEDRICH *et al.*, 2008; OURIQUE *et al.*, 2008). No caso específico de desenvolvimento de formas semissólidas, além dos problemas de instabilidade em meio aquoso, a concentração relativamente baixa de fármaco nas suspensões de nanopartículas pode obrigar a adição de grandes volumes de suspensão para o ajuste do

teor da forma farmacêutica derivada (semissólidas, por exemplo) contendo fármacos de baixa potência. Este aspecto pode também limitar a adição de outros excipientes líquidos a essas formulações (MILÃO *et al.*, 2003; MARCHIORI *et al.*, 2010; OURIQUE *et al.*, 2010b, FONTANA, 2010; ALMEIDA, 2010). Assim, a limitada estabilidade físico-química e as dificuldades farmacotécnicas podem constituir um obstáculo para a aplicabilidade industrial das suspensões coloidais. Assim sendo, processos de secagem destas suspensões têm sido propostos e desenvolvidos para contornar essas limitações (GUTERRES *et al.*, 2009).

1. 2 Técnicas de secagem de nanopartículas poliméricas

Apesar do seu tamanho reduzido, as suspensões aquosas de nanopartículas poliméricas tendem a apresentar alguns fenômenos de instabilidade físico-química, conforme previamente descrito (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003a; FRIEDRICH *et al.*, 2008; OURIQUE *et al.*, 2008). Neste sentido, existem atualmente algumas estratégias desenvolvidas para a conversão destas suspensões em materiais pulverulentos, tais como, a liofilização (SAEZ *et al.*, 2000; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003b), a secagem por aspersão (MULLER *et al.*, 2000; POHLMANN *et al.*, 2002; BECK *et al.*; 2005; SCHAFFAZICK *et al.*, 2006; TEWA-TAGNE *et al.*, 2006, TEWA-TAGNE *et al.*, 2007a; TEWA-TAGNE *et al.*, 2007b; BECK *et al.*; 2008; GUTERRES *et al.*, 2009), e a granulação por via úmida (FRIEDRICH *et al.*, 2010a; FRIEDRICH *et al.*, 2010b).

A liofilização, também conhecida como *freeze-drying*, consiste na remoção de água de uma amostra previamente congelada, através de processos de sublimação e desorção, sob vácuo. Em geral, a liofilização pode ser dividida em três etapas: congelamento da amostra; secagem primária (referente à sublimação do gelo); e secagem secundária (correspondente à desorção da água). Este método tem sido empregado na secagem de nanocápsulas e, também, de nanoferas (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003b). Para otimizar o processo, é necessário selecionar crioprotetores adequados para manter a integridade das partículas durante a etapa de congelamento, além de determinar a quantidade exata de crioprotetor a ser adicionada. Em alguns casos a adição de crioprotetores em excesso pode levar ao comprometimento das nanopartículas e promover sua desestabilização (VAUTHIER e BOUCHEMAL, 2009).

A granulação por via úmida é um método alternativo que permite a conversão da suspensão aquosa de nanopartículas poliméricas em uma forma sólida. Nesta nova abordagem da granulação por via úmida, a suspensão da nanopartículas substitui o líquido responsável

pela aglomeração dos sólidos, os quais podem ser os excipientes normalmente utilizados na obtenção de comprimidos. A massa úmida obtida após a aglomeração passa por um tamis, formando grânulos que são, posteriormente, secos em estufa (FRIEDRICH *et al.*, 2010a; FRIEDRICH *et al.*, 2010b).

A técnica de *spray-drying*, nebulização ou secagem por aspersão é iniciada pelo processo de atomização de uma amostra líquida para uma torre de secagem, onde se efetua o processo de secagem das gotículas da amostra, graças a um fluxo de ar quente, resultando em sistemas sólidos pulverulentos. Formulações de nanopartículas poliméricas submetidas à secagem por aspersão são, geralmente, suspensões aquosas adicionadas de um adjuvante de secagem, que age como suporte sólido. Esta técnica apresenta como vantagens o baixo custo, rápido processo, possibilidade de modular as características físico-químicas do pó (BECK *et al.*, 2006), fácil transposição de escala, além de ser adequado para moléculas termosensíveis (VAUTHIER e BOUCHEMAL, 2009). Estudos têm mostrado que as nanoesferas sofrem rearranjos estruturais durante a secagem por aspersão, os quais prejudicam a funcionalidade destes nanossistemas, indicando que esta técnica é mais adequada para secagem de nanocápsulas (MULLER *et al.*, 2000; POHLMANN *et al.*, 2002; BECK *et al.*, 2007). Para que se obtenham pós com boas características, é importante o uso de adjuvantes de secagem os quais evitam a adesão das partículas nas paredes do equipamento. Eles podem ser materiais poliméricos sintéticos (polivinilpirrolidona, hidroxipropilcelulose e hidroxipropilmetilcelulose), dióxido de silício coloidal ou carboidratos (lactose, manitol, maltodextrinas), os quais são adicionados na suspensão de nanopartículas antes da atomização (TEWA-TAGNE *et al.*, 2007a; VAUTHIER e BOUCHEMAL, 2009; GUTERRES *et al.*, 2009). Os pós obtidos podem ser caracterizados quanto ao teor de fármaco, análise granulométrica, grau de umidade, rendimento do processo, densidade, área superficial, distribuição do tamanho de poros, recuperação das nanopartículas após a redispersão aquosa dos pós, entre outros (TEWA-TAGNE *et al.*, 2006; TEWA-TAGNE *et al.*, 2007a; TEWA-TAGNE *et al.*, 2007b; BECK *et al.*, 2008; DOMINGUES *et al.*, 2008). Todos estes parâmetros são úteis para verificar a eficiência da secagem e elucidar as características dos pós, avaliando a possibilidade de incorporação destes sistemas sólidos em formas farmacêuticas derivadas.

Müller e colaboradores (2000) relataram pela primeira vez a aplicação da secagem por aspersão de suspensões de nanocápsulas para a obtenção de pós microparticulados. Neste estudo, o diclofenaco foi o fármaco modelo e o dióxido de silício coloidal (3 % p/v) foi empregado como adjuvante de secagem, para evitar a adesão dos pós às paredes do

equipamento. Através da análise por microscopia eletrônica de varredura, foi possível a observação das nanoestruturas adsorvidas à superfície das partículas de dióxido de silício coloidal, com diâmetros equivalentes às nanopartículas presentes nas suspensões originais. Entretanto, os pós preparados a partir de nanoesferas demonstraram uma redução no tamanho de partícula (de 200 nm pra 60-90 nm) após a secagem por aspersão, ou seja, esse sistema nanoestruturado sofreu alterações durante o processo de secagem. Desse modo, os autores demonstraram que a técnica pode ser uma alternativa para a secagem de suspensões de nanocápsulas, para a obtenção de uma forma sólida intermediária.

Estudos subseqüentes, também, demonstraram o emprego da secagem por aspersão na obtenção de micropartículas (pós) revestidas por nanopartículas poliméricas (BECK *et al.*, 2004; BECK *et al.*, 2005; BECK *et al.*, 2006; BECK *et al.*, 2007). Em 2004, Beck e colaboradores preparam micropartículas empregando métodos com uma ou duas etapas. No método com uma etapa, o dióxido de silício coloidal e o fármaco foram dispersos na suspensão coloidal (nanocápsulas ou nanoesferas), e esta mistura foi submetida à secagem por aspersão. No método com duas etapas, o dióxido de silício coloidal e o fármaco foram disperso em acetona, e em seguida submetidos à evaporação à pressão reduzida, obtendo-se um núcleo sólido. Este núcleo, previamente preparado, foi adicionado à suspensão de nanopartículas (nanocápsulas ou nanoesferas) antes da nebulização. Neste trabalho foi empregado o diclofenaco ácido e diclofenaco de sódio, como modelo de fármaco lipofílico e hidrofílico, respectivamente. Todas as micropartículas obtidas apresentaram nanopartículas adsorvidas na superfície, entretanto não foram todas as formulações que apresentaram bons resultados quanto à tolerância gastrointestinal (BECK *et al.*, 2004).

A secagem por aspersão de suspensões de nanocápsulas e nanoesferas, juntamente com um núcleo sólido, previamente preparado e constituído por dióxido de silício coloidal e diclofenaco, foi realizada alterando-se sucessivamente as condições experimentais. As nanopartículas foram preparadas com polímero gastrorresistente (Eudragit S100) e na ausência de fármaco associado. Foi demonstrada que a alteração dos parâmetros de secagem, como temperatura e fluxo de alimentação, determinou modificações nas características do pó, tais como: rendimento, eficiência de encapsulação e tamanho de partícula. Além disso, as micropartículas revestidas pelas nanocápsulas apresentaram mais rápido perfil de dissolução do fármaco e mais eficiente efeito protetor da mucosa gastrointestinal do que as micropartículas revestidas pelas nanoesferas (BECK *et al.*, 2006).

Em 2007, Beck e colaboradores, traçaram uma análise sobre a influência do nanorevestimento sobre a liberação *in vitro* e absorção de dexametasona em um modelo de

células de adenocarcinoma de cólon (células Caco-2). As micropartículas foram preparadas empregando um núcleo sólido de dióxido de silício coloidal associado com a dexametasona, que foi seco por aspersão juntamente com a suspensão de nanocápsulas ou nanoesferas brancas. Novamente, foi evidenciado que o tipo de revestimento interfere no perfil de dissolução do fármaco, e ainda, pôde ser observada uma importante correlação entre a liberação *in vitro* e permeação *in vitro* do fármaco. As micropartículas revestidas pelas nanocápsulas mostraram mais lenta liberação e também, permeação pelas células Caco-2, do que as micropartículas revestidas pelas nanoesferas. A presença de um agente plastificante (polietilenoglicol) na composição do sistema microparticulado promoveu mais lenta liberação e absorção pelas células caco-2. Foi reportado, também, que as formulações de micropartículas não exerceram toxicidade sobre as células empregadas no teste de permeação intestinal (BECK *et al.*, 2007).

Em 2008, foi demonstrada a possibilidade de obter micropartículas nanorrevestidas através da secagem por aspersão, usando como modelo um fármaco hidrofóbico e dióxido de silício coloidal como adjuvante de secagem. Neste trabalho foi empregada uma única etapa, ou seja, não houve prévia preparação de um núcleo sólido contendo o fármaco, como havia sido proposto por Beck e colaboradores (BECK *et al.*, 2004; BECK *et al.*, 2006; BECK *et al.*, 2007). A influência do polímero formador das nanocápsulas [poli (ϵ -caprolactona) e Eudragit RS 100] sobre as características do pó foi avaliada. Para ambos os tipos de micropartículas, foram observados aspecto esférico e estruturas de tamanho nanométrico adsorvidas na superfície. A principal influência observada foi em relação à liberação *in vitro*, na qual as micropartículas revestidas com nanocápsulas de Eudragit RS 100 demonstraram um maior controle da liberação do fármaco quando comparada com a formulação contendo nanocápsulas preparadas com poli (ϵ -caprolactona) (DOMINGUES *et al.*, 2008).

Para promover uma liberação sustentada de melatonina, foi desenvolvida uma estratégia tecnológica de obtenção de micropartículas contendo sistemas nanoestruturados, através da secagem por aspersão. A melatonina, um hormônio secretado pela glândula pineal, é usada terapeuticamente em formas farmacêuticas orais no tratamento de distúrbios no ciclo circadiano (ciclo de sono-vigília). Neste trabalho foi avaliada a viabilidade de obtenção de pó microparticulado a partir de dióxido de silício coloidal e suspensão de nanocápsulas de melatonina. Os resultados demonstraram que o rendimento do processo foi de $74 \pm 2\%$, a eficiência de encapsulação da melatonina no pó foi $93 \pm 3\%$ e a umidade foi menor que 2%. Além disso, foi detectada a presença de nanopartículas na superfície dos pós

microparticulados e obteve-se um perfil de liberação controlado, em comparação ao fármaco puro, ajustado ao modelo moexponencial (SCHAFFAZICK *et al.*, 2006).

Outros adjuvantes de secagem foram também testados para obtenção de sistemas pulverulentos a partir de uma suspensão de nanocápsulas. Em um estudo realizado por Tewa-Tagne (2007), foram avaliadas as características dos pós obtidos com o uso de polímeros sintéticos (polivinilpirrolidona, hidroxipropilcelulose e hidroxipropilmetilcelulose) e carboidratos (lactose, manitol, maltodextrinas). Foram encontradas diferenças importantes quanto à umidade, morfologia e capacidade de recuperação das nanocápsulas após redispersão aquosa dos pós. O estudo de recuperação das nanocápsulas a partir de microaglomerados sólidos preparados com 10 % de lactose apresentou um perfil bimodal de distribuição de partículas. Entretanto o maior pico presente coincidiu com a distribuição monomodal das nanocápsulas originais (em suspensão aquosa) e o segundo pico representou em torno de 2% das partículas. Isso sugere que houve uma eficiente recuperação das estruturas nanométricas após a secagem por aspersão. Além disso, foi evidenciado que as micropartículas preparadas com lactose não continham estruturas nanométricas recobrando sua superfície (TEWA-TAGNE *et al.*, 2007a).

De maneira geral, a viabilidade tecnológica de obtenção de formas sólidas, a partir da secagem por aspersão de suspensões aquosas de nanopartículas, é bem conhecida. O que torna cada método diferente é o emprego de adjuvantes de secagem específicos, condições experimentais diversas, particularidades de cada nanossistema e do fármaco modelo. Vários trabalhos mostram que os pós microparticulados são recobertos pelas nanopartículas (MULLER *et al.*, 2000; BECK *et al.*, 2004; BECK *et al.*, 2006; BECK *et al.*, 2007; BECK *et al.*, 2008), entretanto existem autores que sugerem que as nanopartículas poliméricas encontram-se inclusas nos microaglomerados (TEWA-TAGNE *et al.*, 2006; TEWA-TAGNE *et al.*, 2007a; TEWA-TAGNE *et al.*, 2007b). Isso pode ser explicado pela capacidade do adjuvante de secagem em se solubilizar ou se manter disperso na suspensão de nanopartículas, quando se efetua a mistura prévia destes constituintes, ou ainda, pela concentração de adjuvante empregada (TEWA-TAGNE *et al.*, 2006). Entretanto, a principal questão a ser analisada após a secagem das nanopartículas poliméricas é a facilidade de redispersão dos pós e a permanência das características morfológicas e funcionais das nanopartículas poliméricas, dependendo do foco do trabalho (MULLER *et al.*, 2000; POHLMANN *et al.*, 2002; BECK *et al.*, 2004; BECK *et al.*, 2005; SCHAFFAZICK *et al.*, 2006; TEWA-TAGNE *et al.*, 2006; TEWA-TAGNE *et al.*, 2007; TEWA-TAGNE *et al.*, 2007; BECK *et al.*, 2006; BECK *et al.*, 2007; DOMINGUES *et al.*, 2008).

Zaccari e colaboradores, em 2005, submeteram a tretinoína ao processo de secagem por aspersão juntamente com o álcool polivinílico (PVA) ligado com oleato de amina, a uma temperatura de 70° C e bico atomizador com 0.7 mm de diâmetro. A análise por calorimetria diferencial exploratória sugeriu que, durante a evaporação do solvente, o fármaco converteu-se na sua forma amorfa. A redispersão aquosa do pó evidenciou estruturas micelares poliméricas com tamanho em torno de 400 nm. Além disso, o complexo nebulizado apresentou maior solubilidade para a tretinoína e mais eficiente atividade citotóxica frente a células de neuroblastoma do que o fármaco em solução com o polímero (PVA-oleato de amina). Com esses resultados, pode-se observar que o processo de secagem por aspersão, nas condições experimentais específicas deste trabalho, não prejudicou a atividade do fármaco.

1.3 Nanopartículas poliméricas em formulações tópicas

A pele representa uma complexa barreira para a entrada e saída de substâncias devido a sua constituição estratificada. A permeação cutânea de fármacos ou ativos cosméticos pode ser efetuada através do estrato córneo (camada mais externa da pele) ou através de apêndices epidérmicos como glândulas sudoríparas e folículos pilosos. Inicialmente, acreditava-se que os folículos pilosos representavam pouco na penetração dos fármacos através da pele. Entretanto, ao se considerar que este apêndice epidérmico apresenta invaginações que aumentam significativamente a superfície disponível para a absorção, passou-se a considerar esta como sendo uma importante rota para moléculas hidrofílicas e/ou com alto peso molecular (LADEMANN *et al.*, 2007; KNORR *et al.*, 2009). De maneira geral, os principais fatores que modulam a absorção cutânea e, portanto, devem ser considerados durante o desenvolvimento de uma formulação, são as propriedades intrínsecas ao ativo, as características do veículo e o estado fisiológico da pele (SCHMALTZ *et al.*, 2005; GUTERRES *et al.*, 2007).

A incorporação de ativos associados a sistemas nanoestruturados, em formulações para uso tópico, tem sido uma tendência na pesquisa e desenvolvimento de produtos dermatológicos e cosméticos. Estas formulações têm como principais objetivos modular a permeação cutânea do fármaco ou ativo cosmético (ALVES *et al.*, 2007), melhorar sua distribuição na superfície da pele (ALVAREZ-ROMÁN *et al.*, 2004; LUENGO *et al.*, 2006; LADDEMAN *et al.*, 2007) conferir proteção contra fatores extrínsecos como radiação ultravioleta, agentes oxidantes, entre outros (KÜLKAMP *et al.*, 2009; OURIQUE *et al.*,

2010b). Muitas das vantagens decorrentes da associação de fármacos aos nanocarreadores podem ser atribuídas ao seu pequeno tamanho. O reduzido diâmetro das nanoestruturas pode assegurar um íntimo contato com a camada córnea e apêndices epidérmicos, permitindo que elas fiquem retidas, principalmente nos folículos pilosos, propiciando uma liberação gradual do princípio ativo (ALVAREZ-ROMÁN *et al.*, 2004; LADEMANN *et al.*, 2007). Além disso, o tamanho destes sistemas pode favorecer a formação de um filme sobre a pele, aumentando a hidratação, promovendo a permeação de fármacos, e, ainda, proporcionando uma confortável aplicação (GUTERRES *et al.*, 2007). Desse modo, a tecnologia dos sistemas de liberação prolongada pode ser convenientemente empregada em formulações dermatológicas como, por exemplo, aquelas contendo antibiótico nas quais é desejável prolongar a concentração terapêutica (LBOUTOUNNE *et al.*, 2002).

Em 2003, Milão e colaboradores prepararam um hidrogel de Carbopol 940[®] contendo diclofenaco associado a nanocápsulas poliméricas. O estudo reológico dos géis indicou um comportamento não-Newtoniano com propriedades plásticas e a análise através de microscopia eletrônica por criofratura mostrou que as nanocápsulas permaneceram morfologicamente intactas no gel durante 3 meses de armazenamento.

Alves e colaboradores em 2005, estudaram a preparação e caracterização de hidrogéis de Carbopol 940[®] contendo nimesulida associada a nanocápsulas, nanoesferas e nanoemulsões. O teor de fármaco, o pH e o aspecto macroscópico permaneceram constantes durante 3 meses de armazenamento. A análise reológica mostrou que todas as amostras possuíam comportamento não-Newtoniano pseudoplástico, ajustado ao modelo de Ostwald (*Power Law*). Em 2007, o mesmo grupo conduziu um estudo que demonstrou que o hidrogel contendo nimesulida associada às nanopartículas era capaz de promover a liberação do fármaco na pele viável de forma mais efetiva que uma formulação contendo nimesulida não-associada. O gel contendo nanocápsulas propiciou uma maior penetração de nimesulida no estrato córneo e camadas mais profundas da pele do que as formulações contendo nanoesferas e nanoemulsões. No estrato córneo o fármaco oriundo das nanoemulsões não foi quantificado enquanto que nas camadas mais profundas da pele a liberação ocorreu de maneira semelhante à liberação promovida pelas nanoesferas, ou seja, moléculas do fármaco carregadas pela nanoemulsão permearam diretamente para derme. Desse modo, percebe-se que a presença do polímero e o tipo de nanocarreador influenciam a permeação (ALVES *et al.*, 2005; ALVES *et al.*, 2007).

Ativos de proteção solar são também contemplados com estudos que tangem a nanotecnologia (JIMENÉZ *et al.*, 2004; PAESE *et al.*, 2009; VETTOR *et al.*, 2010). Um

exemplo desta abordagem é o desenvolvimento de um gel hidrofílico contendo benzofenona-3, com o objetivo de avaliar a influência do sistema nanoestruturado sobre a fotoproteção *in vitro* e fotoestabilidade deste filtro solar orgânico. A encapsulação da benzofenona-3 minimizou a fotodegradação e aumentou a efetividade fotoprotetora em comparação com o ativo na forma livre. Este fato é devido à capacidade das nanocápsulas em refletir a luz ultravioleta e agir como um filtro solar físico. Além disso, este trabalho demonstrou que o hidrogel contendo nanocápsulas não causou sensibilização cutânea, nem provocou resposta imune significativa na pele de camundongos. Estes resultados demonstraram que nanocápsulas poliméricas preparadas com poli (ϵ -caprolactona) podem ser uma alternativa promissora de veiculação de fármacos pela via tópica, devido ao baixo potencial alergênico (PAESE *et al.*, 2009).

O desenvolvimento de hidrogéis contendo um corticóide associado a nanocápsulas foi descrito por Marchiori e colaboradores (2010). Neste trabalho, a suspensão aquosa de nanocápsulas de dexametasona foi adicionada sobre o Carbopol Ultrez 10[®] e esta dispersão foi neutralizada com trietanolamina. O estudo da liberação *in vitro* do hidrogel contendo dexametasona nanoencapsulada mostrou um maior controle da liberação do que o hidrogel que continha a dexametasona livre. Além disso, foi observado um aumento da atividade antiproliferativa da dexametasona associada a nanocápsulas poliméricas, sugerindo seu emprego no tratamento de desordens proliferativas da pele, como a psoríase.

A secagem por aspersão de nanocápsulas em suspensão aquosa também foi demonstrada como uma alternativa viável para se obter formas intermediárias. Nesse sentido, o sistema sólido, obtido através da secagem por aspersão de nanocápsulas contendo a coenzima Q10, foi incorporado em uma forma farmacêutica semissólida. Quanto ao diâmetro das nanopartículas presentes no hidrogel, não foram observadas diferenças entre aquelas incorporadas sob forma sólida (nanocápsulas secas por aspersão) ou sob forma líquida (nanocápsulas em suspensão aquosa original). Este estudo demonstrou, portanto, uma adequada estratégia de incorporação de sistemas nanoestruturados em formas farmacêuticas de uso tópico (TERROSO *et al.*, 2009).

1.4 Tretinoína

A tretinoína é a forma ativa de um produto metabólico da vitamina A, sendo também chamada de ácido retinóico. Este fármaco é efetivo no tratamento tópico de diferentes

afecções cutâneas inflamatórias e proliferativas, como a acne, ictiose, psoríase, neoplasias, entre outros (ORFANOS *et al.*, 1987; ELBAUM *et al.*, 1988). Também pode ser usada esteticamente na melhora da textura e a aparência cutânea e no tratamento de alopecia areata (ZOUBOULIS *et al.*, 2001; DAS *et al.*, 2010) Apesar do seu amplo emprego terapêutico, o desenvolvimento e a administração tópica de formas farmacêuticas contendo tretinoína, enfrenta alguns obstáculos como baixa solubilidade aquosa, elevada instabilidade química, fotoinstabilidade e acentuada irritação na área de aplicação (ELBAUM, 1988; BRISAERT *et al.*, 1995; BRISAERT *et al.*, 2000; LIN *et al.*, 2000).

A partir de modificações na porção carboxílica, na cadeia poliênica ou no anel aromático da molécula do retinol, obtém-se os retinóides classificados em três gerações. A tretinoína, juntamente com a isotretinoína e retinol, pertencem à primeira geração da classe de retinóides, correspondendo a estruturas não-aromáticas. A segunda geração é constituída pelos retinóides monoaromáticos, como o etretinato e acetretin. Os poliaromáticos como adapaleno e tazarotene compõem a terceira geração. O efeito farmacológico dos retinóides é resultado da ligação destas estruturas com receptores nucleares os quais tem afinidade específica por estas moléculas (RIGOPOULOS *et al.*, 2004).

A tretinoína age acelerando o processo de renovação das células epiteliais, o que ajuda a normalizar a queratinização, eliminar e evitar a formação de novos comedões, o que facilita a penetração de agentes antimicrobianos nos folículos pilosos para combater o *Propionibacterium acnes*. Além de regular o crescimento e diferenciação das células epiteliais, é capaz de estimular a síntese de colágeno e diminuir a secreção sebácea (FISCHER *et al.*, 1996; RIGOPOULOS *et al.*, 2004).

Estudos comparativos da ação da tretinoína e outros retinóides de uso tópico auxiliam na elucidação das principais diferenças entre estes fármacos. Avaliando-se comparativamente um tratamento com tretinoína e seu isômero 13-cis (isotretinoína), atribuiu-se uma mais eficiente redução nas lesões acnéicas inflamatórias e não-inflamatórias à tretinoína. Entretanto, os pacientes tratados com este fármaco apresentaram mais efeitos adversos do que aqueles tratados com a isotretinoína. Outra análise demonstrou que um gel contendo adapaleno (0,1 %) reduz mais rapidamente as lesões acnéicas inflamatórias e não-inflamatórias do que um gel contendo tretinoína (0,025 %). O grupo tratado com adapaleno apresentou menos efeitos adversos cutâneos. Estes dados mostram que as diferenças entre os retinóides estão relacionadas não somente com a atividade farmacológica, mas também com a tolerabilidade. De modo geral, a tretinoína é a molécula que mais causa descamação, ardência

e vermelhidão, sintomas característicos durante tratamento com retinóides (RIGOPOULOS *et al.*, 2004).

Existem na literatura científica, vários estudos que avaliam a viabilidade de incorporação de tretinoína em sistemas nanoestruturados, demonstrando as vantagens farmacotécnicas e terapêuticas do fármaco encapsulado. A associação da tretinoína com lipossomas foi descrita por Brisaert e colaboradores em 2001. Neste trabalho, foi verificado que a atividade comedolítica do fármaco incorporado em lipossomas foi cinco vezes maior do que a de uma preparação convencional. Além disso, a constante de fotodegradação do fármaco foi quase duas vezes menor do que aquela encontrada em uma solução de tretinoína em óleo de rícino (BRISAERT *et al.*, 2001).

Consta também na literatura, um estudo avaliando a capacidade de aumento da estabilidade da tretinoína frente à luz UV e fluorescente, através da preparação de estruturas vesiculares, lipossomas e niossomas. Foi observado que a proteção oferecida pelas vesículas depende da sua composição e estrutura. A inclusão de tretinoína em niossomas preparados com tensoativos não-iônicos (lauril éter polioxietileno ou octil/decil poliglicosídeos) e lipossomas preparados com fosfolipídios hidrogenados (fosfatidilcolina de soja hidrogenada) resultou numa maior proteção contra a fotodegradação (MANCONI *et al.*, 2003).

Em outro trabalho, foi demonstrado que a tretinoína e a isotretinoína, quando em solução etanólica, degradam-se rapidamente em seus isômeros 13-*cis* (isotretinoína) e 9-*cis*, respectivamente, e ambos, em seguida, sofrem uma lenta degradação que origina outros isômeros. Após a associação com lipossomas, foi demonstrado um aumento na fotoestabilidade da tretinoína. Entretanto, a inclusão de isotretinoína nestas vesículas não apresentou tanto êxito. Os autores atribuíram os piores resultados à baixa encapsulação da isotretinoína, devido à natureza não linear de sua molécula (IOELE *et al.*, 2005).

Em 2007, Shah e colaboradores desenvolveram uma formulação de nanopartículas de lipídio sólido contendo tretinoína, empregando monoestearato de glicerila como substância lipídica. A eficiência de encapsulação do fármaco alcançada neste estudo foi em torno de 40 %. Ainda assim, houve aumento na sua fotoestabilidade em comparação com uma solução metanólica de tretinoína. Os autores ainda propuseram um gel de Carbopol EDT 2020[®] contendo as nanopartículas de lipídio sólido, o qual demonstrou uma evidente diminuição na irritação cutânea causada pelo fármaco, em comparação a uma formulação comercial contendo tretinoína livre.

Para aumentar a eficiência de incorporação da tretinoína em nanopartículas de lipídio sólido, foi proposta a formação de um par iônico entre a tretinoína e estearilamina. Esta

estratégia aumentou significativamente a eficiência de incorporação do fármaco (de 13 % com a tretinoína para 94 % com o par iônico) e a sua estabilidade em nanopartículas de lipídio sólido. Para avaliar o potencial de irritação cutânea, foi preparado um gel de hidroxietilcelulose contendo o fármaco associado aos nanocarreadores e realizada uma comparação com um gel de tretinoína disponível no mercado. Os resultados mostraram que o gel que continha o fármaco associado às nanopartículas lipídicas foi significativamente menos irritante devido à liberação gradual do fármaco para a pele (CASTRO *et al.*, 2009).

Recentemente, nosso grupo de pesquisa relatou o desenvolvimento de suspensões de nanocápsula e de nanoemulsão contendo tretinoína, avaliando a influência de dois diferentes óleos (óleo de girassol e mistura de triglicerídeos de cadeia média) nas características físico-químicas e na proteção da tretinoína frente à luz UVC. Os tensoativos empregados na preparação de ambas as formulações foram o monooleato de sorbitano (Span 80[®]) e polissorbato 80 (Tween 80[®]). A formulação que proporcionou maior estabilidade ao fármaco, frente à luz ultravioleta artificial, foi a suspensão de nanocápsulas, independente da fase oleosa utilizada. Os resultados mostraram que o tempo de meia-vida do fármaco associado às nanocápsulas ficou entre 85-100 minutos, enquanto que a tretinoína na solução metanólica apresentou um tempo de meia vida de 40 minutos (OURIQUE *et al.*, 2008). Para aumentar a estabilidade físico-química das nanocápsulas, foi proposta a alteração do tensoativo de baixo EHL (Equilíbrio Hidrófilo Lipófilo), substituindo o monooleato de sorbitano (Span 80[®]) pelo monoestearato de sorbitano (Span 60[®]). Devido a esta modificação, foi obtida uma nanocápsula de núcleo lipídico que mostrou ter maior estabilidade do que as nanocápsulas de núcleo oleoso (obtidas com o Span 80[®]) e igual capacidade de conferir fotoproteção ao fármaco (OURIQUE *et al.*, 2010a).

O aumento da eficácia dos fármacos nanoencapsulados é uma informação que deve ser verificada. Portanto, a atividade antiproliferativa da tretinoína associada às nanocápsulas convencionais (OURIQUE *et al.*, 2008) foi comparada com o fármaco em solução. O teste empregou um modelo de células vegetais, a *Allium cepa*, que tem excelente correlação com testes que empregam células animais. A tretinoína nanoencapsulada demonstrou significativo decréscimo no índice de mitose celular, reforçando sua atividade antiproliferativa. Este resultado foi acompanhado pela pouca incidência de aberrações cromossômicas, a qual foi observada também para as formulações controle (FACHINETTO *et al.*, 2008).

Em 2010, Ourique e colaboradores demonstraram a preparação de hidrogéis contendo tretinoína associada a nanocápsulas de núcleo lipídico, através da adição direta da suspensão aquosa coloidal sobre o Carbopol Ultrez 10[®], seguida de neutralização com trietanolamina. A

caracterização reológica desta formulação indicou um comportamento pseudo-plástico ajustado ao modelo Herschel-Bulkley. Quanto à espalhabilidade, o gel proposto teve melhor desempenho que o gel comercial. Foi demonstrado também, que o hidrogel contendo tretinoína associada a nanocápsulas de núcleo lipídico conferiu proteção ao fármaco frente a radiação UVA, apresentando um tempo de meia-vida muito superior aquele apresentado pela formulação comercial (gel hidroalcoólico contendo tretinoína livre) (OURIQUE *et al.*, 2010b).

CAPÍTULO 1: Desenvolvimento e fotoestabilidade de formas pulverulentas
contendo tretinoína associada a nanocápsulas de núcleo lipídico

CAPÍTULO 1: Desenvolvimento e fotoestabilidade de formas pulverulentas contendo tretinoína associada a nanocápsulas de núcleo lipídico

1.1 Introdução

A secagem por aspersão é uma técnica que tem sido empregada na obtenção de sistemas sólidos microparticulados contendo nanopartículas poliméricas, desde o ano 2000 (MULLER *et al.*, 2000; GUTERRES *et al.*, 2009). A secagem das suspensões coloidais deve ser executada na presença de um adjuvante de secagem, o qual age como um suporte para as nanopartículas após a evaporação da água, evitando que elas fiquem aderidas às paredes do equipamento. Os pós obtidos, após a secagem por aspersão, são microaglomerados compostos pelo adjuvante de secagem e pelas nanopartículas, as quais podem estar recobrindo a superfície dos pós (MULLER *et al.*, 2000; BECK *et al.*, 2004; BECK *et al.*, 2006; BECK *et al.*, 2007) ou ainda, no interior deste sistema sólido (TEWA-TAGNE *et al.*, 2006).

A principal vantagem relacionada com a secagem das nanopartículas é a possibilidade de diminuir a adição de grande quantidade de água presente nas suspensões coloidais, no momento da incorporação das nanopartículas em uma forma farmacêutica semissólida, como um gel, por exemplo. Este excesso impede a adição de outras matérias-primas líquidas, restringindo a composição da formulação. Além disso, a remoção de água das suspensões coloidais pode aumentar a estabilidade físico-química das nanopartículas, pois, em geral, diminui a contaminação microbiana, evita a migração do fármaco associado para o meio aquoso, bem como a hidrólise do polímero, dentre outros (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003a; FRIEDRICH *et al.*, 2008).

Apesar da secagem por aspersão ser um método simples, de baixo custo e de fácil execução, só é considerado adequado se mantiver as características das nanopartículas após o processo de secagem. Para isso, é importante avaliar o tamanho e a funcionalidade do sistema nanoestruturado na suspensão original e após a redispersão aquosa do pó.

Diante disso, o presente capítulo tem como objetivo descrever a obtenção de sistemas sólidos compostos de lactose e tretinoína associada a nanocápsulas de núcleo lipídico, através do método de secagem por aspersão e avaliar o sistema nanoestruturado antes e após a desidratação.

PUBLICAÇÃO 1: Spray-dried powders containing tretinoin-loaded engineered lipid-core nanocapsules: development and photostability study

Artigo a ser submetido ao Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology

Spray-dried powders containing tretinoin-loaded engineered lipid-core nanocapsules: development and photostability study

M. C. L. Marchiori^a, A. F. Ourique^b, C. de B. da Silva^a, R. P. Raffin^c, A. R. Pohlmann^{b,d}, S. S. Guterres^{b,e}, R. C. R. Beck^{b,e*}

^aPrograma de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Av. Roraima, 1000, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 97105-900, Brazil

^bPrograma de Pós-Graduação em Nanotecnologia Farmacêutica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga, 2752, Porto Alegre, RS, 90610-000, Brazil

^cPrograma de Pós-Graduação em Nanociência, Centro Universitário Franciscano, Rua dos Andradas, 1614, Santa Maria, RS, 97010-032, Brazil

^dDepartamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, CP 15003, Porto Alegre, 91501-970, RS, Brazil

^ePrograma de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga, 2752, Porto Alegre, RS, 90610-000, Brazil

* Corresponding author: Ruy C. R. Beck

Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga, 2752, CEP 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil

Tel +55 51 3308-5951 Fax: +55 51 3308-5090

E-mail address: ruy.beck@ufrgs.br

Abstract

The influence of the spray-drying process on the ability of engineered lipid-core nanocapsules to protect tretinoin against UV degradation was evaluated. This approach represents a technological alternative to improve the microbiological stability, storage and transport properties of such formulations. Tretinoin-loaded lipid-core nanocapsules or tretinoin-loaded nanoemulsion were dispersed in lactose (10% w/v) and fed in the spray-drier to obtain a solid product. The spray-dried powder containing tretinoin-loaded nanoemulsions showed lower ($p \leq 0.05$) percentage of encapsulation ($89 \pm 1\%$) compared to spray-dried powder containing tretinoin-loaded lipid-core nanocapsules ($94 \pm 2\%$). Redispersed spray-dried powder containing tretinoin-loaded lipid-core nanocapsules and nanoemulsions showed average sizes of 204 ± 2 nm and 251 ± 9 nm, which were close to those of the original suspensions (220 ± 3 nm and 239 ± 14 nm, respectively). Similar photodegradation half-life times were calculated for tretinoin loaded in lipid-core nanocapsules (118 ± 12 min) or in the respective redispersed spray-dried powder (118 ± 27 min) exposed to UVA radiation. Our experimental design showed for the first time that spray-dried lipid-core nanocapsules are able to protect tretinoin against UVA radiation, suggesting that the drying process did not alter the supramolecular structure of the lipid-core nanocapsules. Such powders are potential intermediate products for the development of nanomedicines containing tretinoin.

Keywords: engineered nanoparticles, lipid-core nanocapsules, tretinoin, spray-drying, photostability.

1. Introduction

Tretinoin (TTN), also called all-*trans*-retinoic acid, is a derivate of vitamin A (retinol) considered the most biologically active form among retinoids [1]. This drug is widely employed in the topical treatment of acne, psoriasis and aging skin [2,3]. Its mechanism of action is based on the ability to regulate sebum production, collagen synthesis, proliferation and differentiation of epithelial cell through nuclear receptors [4]. After cutaneous treatments, side effects often appear in the form of scaling, erythema, burning and stinging which limits treatment compliance [5, 6]. Beyond the irritation of the treated area, tretinoin shows very low solubility and instability in presence of light, air and heat [1,7].

Some studies in the literature report the nanoencapsulation of tretinoin to improve its effectiveness [8-14] and to confer protection against its photodegradation [7,11,15-17]. Regarding the nanoencapsulation in polymeric nanocapsules, our research group reported in 2008 [16] the development of tretinoin-loaded nanocapsules assessing the influence of two different oils (sunflower oil and caprylic/capric triglyceride mixture) on their physicochemical and photostability properties. Regardless the oil used as core in the polymeric nanocapsules, the formulations showed higher drug stability against UVC light compared to tretinoin in methanolic solution. The photodegradation half-life of the drug was 40 minutes in methanolic solution, while, after drug encapsulation in nanocapsules, it varied from 85 to 100 minutes [16]. More recent, we reported that tretinoin photostability was improved by its nanoencapsulation in lipid-core nanocapsules. We studied the ability of these new nanocapsules to protect the drug against UVC as well as against UVA light [17]. It is important to mention that polymeric nanocapsules and lipid-core nanocapsules have different supramolecular models. The former is composed by a liquid core surrounded by a polymeric wall [18-20], while the latter has a multicomponent core formed by a dispersion of solid and liquid lipids [21].

There are numerous advantages for loading drugs in polymeric nanocarriers, like to target the drug to specific organs or tissues [22,23], to protect the drug against degradation [16,24], to modulate its cutaneous delivery [25, 26] and to develop controlled release formulations [24,27]. Polymeric nanocapsules are obtained in the form of aqueous suspensions being susceptible to physical and chemical instability, microbial contamination and hydrolysis of the polymer under storage [28]. Besides these problems of instability, sometimes the relatively low concentration of drug in these suspensions requires the addition of large volumes of suspension to adjust the drug levels in final dosage forms, as semisolids.

In this case, the large amount of the aqueous phase limits the addition of other liquid ingredients in these formulations. To overcome these limitations, techniques such as spray drying [28-35], freeze drying [36,37] and wet granulation [38] has been described in the literature to obtain powders containing nanoparticles.

The spray-drying technique to obtain powders containing nanoparticles was firstly reported by our group in 2000 [32]. The use of 3.0 % (w/v) silicon dioxide as a drying adjuvant rendered microagglomerates of nanocapsules with good yields. In the following years, it was reported another approach to obtain similar powders, in which polymeric nanoparticles were used as coating materials for organic-inorganic microagglomerates [30,39-41]. The presence of nanoparticles could be observed on the surface of microagglomerates by scanning electron microscopy. In parallel, the preparation of redispersible dried powders containing nanoparticles was reported by Tewa-Tagne and co-workers in 2007 [34]. In that study, the use of lactose as a drying adjuvant to obtain the powders was demonstrated. However, the presence of nanoparticles on the microagglomerate surface could not be visualized by scanning electron microscopy.

In order to obtain appropriated spray-dried powders of nanoparticles it is imperative that the final spray-dried powders could deagglomerate after aqueous redispersion rendering a colloidal suspension presenting the original average particle size. This behavior was already reported for powders prepared with silicon dioxide [33,41] or lactose [34,42], suggesting that the technique is a suitable tool to obtain dried intermediate powder products containing nanoparticles.

Previous studies showed that polymeric nanocapsules and nanospheres are different supramolecular structures [43,18] which distinguish react after spray-drying [44,31]. However, the ability of nanocapsules to protect unstable drugs against UVA radiation after this drying process and their subsequent aqueous redispersion was not explored yet. This approach was the main hypothesis of our study. So, spray-dried powders containing tretinoin-loaded lipid-core nanocapsules were studied based on the ability of those new intermediate products in protecting tretinoin after irradiation.

2. Materials and Methods

2.1. Materials

Tretinoin was a gift from Roche (Switzerland). Poly(ϵ -caprolactone) (PCL) and sorbitan monostearate (Span 60[®]) were purchased from Sigma-Aldrich (São Paulo, Brazil).

Caprylic/capric triglyceride mixture was delivered from Brasquim (Porto Alegre, Brazil), polysorbate 80 (Tween 80[®]) was supplied by Henrifarma (São Paulo, Brazil) and acetone was purchased from Vetec (Rio de Janeiro, Brazil). Lactose monohydrate and Butylhydroxytoluene (BHT) were obtained from Delaware (Porto Alegre, Brazil). HPLC grade methanol was acquired from Tedia (São Paulo, Brazil). All chemicals and solvents presented pharmaceutical or HPLC grade and were used as received.

2.2. Preparation and characterization of engineering lipid-core nanocapsules

Tretinoin-loaded lipid-core nanocapsules (TTN-NC) were prepared by interfacial deposition of preformed polymers [21] at a concentration of 0.5 mg/mL of tretinoin. 250 mg of polymer (PCL), 191.5 mg of sorbitan monostearate, 0.82 mL caprylic/capric triglyceride mixture, 12.5 mg of BHT and 12.5 mg of tretinoin were dissolved in 67 mL of acetone. This organic solution was injected under moderate magnetic stirring into 134 mL of an aqueous phase containing 191.5 mg of polysorbate 80. Magnetic stirring was maintained for 10 minutes. Then, acetone was removed and the suspension concentrated by evaporation under reduced pressure (bath at 40 °C). The final formulation was adjusted to 25 mL. In order to evaluate the influence of the polymeric wall on the spray-drying process, tretinoin-loaded nanoemulsion (TTN-NE) was also prepared as described above, omitting the addition of the polymer in the organic phase. Formulations were prepared in triplicate of batches, stored at room temperature ($25 \pm 2^\circ \text{C}$) and protected from light (amber glass bottles).

Total drug content was determined by liquid chromatography (LC) after tretinoin extraction with methanol under magnetic stirring (5 minutes) followed by centrifugation (5 minutes) at 3700 rpm (MTD III Plus, Servylab, São Leopoldo, Brazil) and filtration in membrane (Sartorius, 0.45 μm). The LC system consisted of a Shimadzu instrument (LC-10AVP Pump, UV-VIS SPD-10AVP Module, Class-VP Software, Shimadzu, Tokyo, Japan), equipped with a Gemini RP-18 column (150 mm \times 4.60 mm, 5 μm , Phenomenex, Torrance, USA). The mobile phase was composed of 85 % methanol, 15 % Milli-Q[®] water and 1 % glacial acetic acid and pumped at a flow rate of 1 mL/min. The injected volume was 20 μL with UV detection at 342 nm (at room temperature) [17].

Tretinoin in the colloidal continuous phase (non-encapsulated) was determined in the ultrafiltrate after separation of the nanoparticles by an ultrafiltration/centrifugation technique (Microcon 10,000 MW, Millipore) at 5,000 rpm during 15 minutes. The concentration of drug entrapped in the nanocapsules was calculated by the difference between the total content

(C_{total}) and the concentration of the drug in the ultrafiltrate ($C_{ultrafiltrate}$). The percentage of encapsulation (PE) was determined by the quotient of the drug entrapped and total drug content (Eq. 1). Tretinoin was assayed by HPLC according to the conditions described above.

$$PE = \frac{C_{total} - C_{ultrafiltrate}}{C_{total}} \times 100 \quad (1)$$

In addition, all formulations were characterized by means of pH, zeta potential, particle size and polydispersity index measurements. The particle sizes and polydispersity indices were determined by photon correlation spectroscopy (PCS) after adequate dilution of an aliquot of the suspension in MilliQ[®] water (Zetasizer Nanoseries, Malvern Instruments, Worcestershire, UK). To avoid sample selection the aliquot was not filtered before dilution. Zeta potential was determined using the same equipment and diluting the samples in 10 mM NaCl filtering exclusively the dilution medium. The pH was measured by a calibrated potentiometer (MPA-210 Model, MS-Tecnoyon, São Paulo, Brazil).

2.3. Preparation and characterization of spray-dried powders containing lipid-core nanocapsules

Lactose (10 % w/v) was mixed with TTN-NC suspensions under magnetic stirring for 20 minutes. This mixture was fed into a spray dryer (Spray-dryer MSD 1.0, Labmaq, Ribeirão Preto, Brazil) in order to obtain the respective dried powders (SD-TTN-NC). A two-fluid nozzle with cap orifice diameter of 0.7 mm and a co-current flow was used. The inlet temperature at the drying chamber was maintained at $120 \pm 10^\circ \text{C}$ and the outlet temperature was set to $80 \pm 10^\circ \text{C}$. Feeding rate was set to 0.4 L/h [41]. Dried powders were also prepared using tretinoin-loaded nanoemulsion (SD-TTN-NE) to evaluate the influence of the presence of the polymer on their physicochemical characteristics. A dispersion of lactose in water at 10 % (w/v) was also submitted to the spray-drying process in order to obtain a control formulation (SD-L).

2.3.1. Rheological analyses

Rheological analysis of the suspensions (TTN-NC and TTN-NE), the mixtures of lactose (L) and these suspensions (TTN-NC + L, TTN-NE + L) were performed using a rotational viscometer (LV DV-II+ PRO Digital Viscosimeter, Brookfield Instruments, UK), equipped with a ULA apparatus. All analyses were carried out at $25 \pm 1^\circ \text{C}$, in triplicate.

2.3.2. Drug content and yield

In order to determine the drug content of spray-dried powders, the samples were dispersed in methanol and kept under stirring during 30 minutes. Then, the volume of the flask was completed and the agitation was maintained for 30 minutes. This sample was filtered using a hydrophilic membrane (GVWP, 0.22 mm, Millipore). Tretinoin was assayed as described item 2.2. The method of tretinoin assay in spray-dried powders was linear ($r = 0.9999$) in a concentration range of 2.5 to 20.0 $\mu\text{g/mL}$, precise (relative standard deviation = 1.1 % and 0.75 % for repeatability and intermediate precision, respectively) and accurate (percentages of recovery of 95.5 ± 1.17 %). The specificity was tested using a placebo formulation prepared with lactose and blank lipid-core nanocapsules. Results showed that all components of the formulation do not influence the tretinoin assay. In addition, the LC method was suitable to resolve tretinoin peak and the peak of its main degradation product – isotretinoin. Yield of the spray-drying process was calculated by the ratio between the weight obtained experimentally and the sum of the weights of all components (lactose and nanostructures) discounting the content of water of the suspensions.

2.3.3. Morphological analyses

The morphological analyses of the dried powders prepared with tretinoin-loaded lipid-core nanocapsules or nanoemulsion and the spray-dried lactose (SD-L) were carried out by scanning electron microscopy (Jeol Scanning Microscope, JSM-5800, Tokyo, Japan) at different magnifications. Samples were analyzed after they had been gold sputtered.

2.3.4. Particle size after dispersing spray-dried powders in water

The powders were dispersed in water (Milli-Q[®]) to obtain a final concentration of 0.5 mg/mL of tretinoin, as in the original suspension. Each sample was stirred for 2 minutes and filtered through a hydrophilic membrane (HVLFP, 0.45 μm). Exactly 20 μL of the filtrate were diluted 500 times with water to measure the particle size by photon correlation spectroscopy (Zetasizer[®] Nanoseries, Malvern Instruments, UK). All measurements were made in triplicate.

2.4. Photostability studies

Photostability studies of the redispersed spray-dried powders containing tretinoin-loaded lipid-core nanocapsules and the respective lipid-core nanocapsule suspension were carried out using an UVA lamp (Fluorescent Blacklight blue lamps, 30 W, Ecolume). The samples were filled in 5 mm quartz cuvettes perfectly stoppered and exposed to the UVA light

in a closed chamber at a fixed distance of 10 cm. The nanoparticle suspension was directly transferred to the quartz cuvettes while spray-dried powders were previously dispersed in ultrapure water (to obtain a final concentration of 0.5 mg/mL of tretinoin) before being added to the quartz cuvettes. After several exposure intervals, 200 μ L of samples were withdrawn and tretinoin was properly extracted in methanol (according to the item 2.3.2). In order to ensure that the degradation of tretinoin was due the UVA light, the same experiment was done in parallel with a cuvette containing the same sample completely covered by aluminum foil. Results were analyzed to establish the kinetics of photodegradation of tretinoin in the formulations, calculating the respective half-life times [8,16,17], according to the zero, first and second kinetic order (Eq. 2, 3 and 4, respectively):

$$x = kt \quad (2)$$

$$\log \frac{a}{a-x} = \frac{k}{2.303} t \quad (3)$$

$$\frac{x}{a(a-x)} = kt \quad (4)$$

Where, a is the drug concentration at time 0, x is the decrease of concentration at time t and k is the rate of photodegradation.

2.5. Statistical analysis

All formulations were prepared and analyzed in triplicate. Results are expressed as mean \pm SD (standard deviation). One way analysis of variance (ANOVA) was used for comparison of the experimental data, at a significance level of 5 % (SigmaStat Statistical Program, Version 3.5, Jandel Scientific, USA).

3. Results and Discussion

The goal of our present work was to demonstrate the ability of spray-dried lipid-core nanocapsules to protect a drug against the UV photodegradation. Tretinoin-loaded lipid-core nanocapsules was chosen for this study due to the high instability of this drug against UV light, their previously reported protection against tretinoin degradation under UV light and the valuable use of tretinoin in the treatment of cutaneous disorders, as previously commented. TTN-NC were prepared by the interfacial deposition of preformed polymer, using poly(ϵ -caprolactone) as a biodegradable polymer. This approach was chosen in order to make the solid product more suitable to be converted to a dermatological dosage forms after its thickening and to protect the tretinoin from oxidative process during the spray-drying process.

To evaluate the effect of the polymeric layer around the droplets on the properties of the spray-dried powders, tretinoin-loaded nanoemulsions were also prepared. They were constituted by nanodroplets of the oil phase (caprylic/capric triglyceride mixture) stabilized by the hydrophilic surfactant (polysorbate 80) and lipophilic surfactant (sorbitan monostearate). The physicochemical characteristics of both nanostructured systems are shown in Table 1. Although the preparation of similar formulations was already reported by our group, in the present work we added an antioxidant (BHT) in the dispersions.

Table 1. Physicochemical characteristics of tretinoin-loaded lipid-core nanocapsules (TTN-NC) and nanoemulsion (TTN-NE).

Formulation	Particle size z-average (nm)	Polydispersity index	Zeta potential (mV)	pH
TTN-NC	220 ± 3 ^a	0.12 ± 0.01 ^a	-6.8 ± 0.13 ^a	6.2 ± 0.1 ^a
TTN-NE	239 ± 14 ^a	0.19 ± 0.03 ^a	-6.9 ± 0.08 ^a	6.1 ± 0.0 ^a

Means, in column, with the same letter are not statistically different (Anova, Tukey test, $p \leq 0.05$).

Both formulations showed particle size between 200 and 250 nm, low polydispersity index (< 0.20), pH around 6.0 and negative zeta potential around -7 mV. Low standard deviation values obtained for all physicochemical characteristics shows the good reproducibility batch to batch. These results are in agreement to our previously reported results [17], showing that the presence of the antioxidant (BHT) in the formulations did not influence their physicochemical properties. BHT was added to the formulation of nanoparticles with the function of protecting tretinoin from oxidative processes that could occur during subsequent spray drying. Moreover, in a later step of using of these powders as intermediates in the preparation of hydrogels, it would not be feasible to add BHT directly in semisolid formulation due to its hydrophobic character, justifying, in this way, the presence of BHT in the formulation of nanocapsules. The similar values obtained for tretinoin-loaded lipid-core nanocapsules and nanoemulsion ($p > 0.05$) makes them suitable to be used as comparative formulations in the development of the respective spray-dried powders. Furthermore, both formulations present drug content closed to their theoretical value (0.5 mg/mL) and encapsulation efficiency higher than 99 %. Comparing the similar encapsulation efficiency to that previously reported [17] it could be demonstrated that the presence of BHT did not influence the tretinoin encapsulation in the lipid-core nanocapsules.

Regarding the suitability of such formulations to be fed in the spray-drier and in order to evaluate the influence of their viscosity on the morphological characteristics of the powders, rheological analyses of the colloidal dispersions were carried out. Figure 1 shows the rheological behavior of both formulations, before and after the addition of lactose at 10 % (w/v). Both formulations showed Newtonian behavior even after the addition of lactose. The presence of lactose at a concentration of 10 % (w/v) slightly increased the viscosity of the aqueous dispersions (NC: from 1.33 to 1.62 mPa.s⁻¹; NE: from 1.36 to 1.73 mPa.s⁻¹), but without making their atomization unfeasible. Furthermore, this slightly increasing in the viscosity and the maintaining of the Newtonian behavior is indicative of no significant interactions between lactose and nanoparticles at this proportion as well as of the absence of particle agglomeration. These data are in agreement to previous results reported by Tewa-Tagne in 2006 for conventional blank nanocapsules (without drug). In this study was demonstrated that an increase in the concentration of silica led to a significant increase in viscosity of the mixed preparations (nanocapsules and silica). These findings support the hypothesis of interactions between the two components leading to a new microstructure organisation, phenomenon that has not been shown by the samples of present work [33].

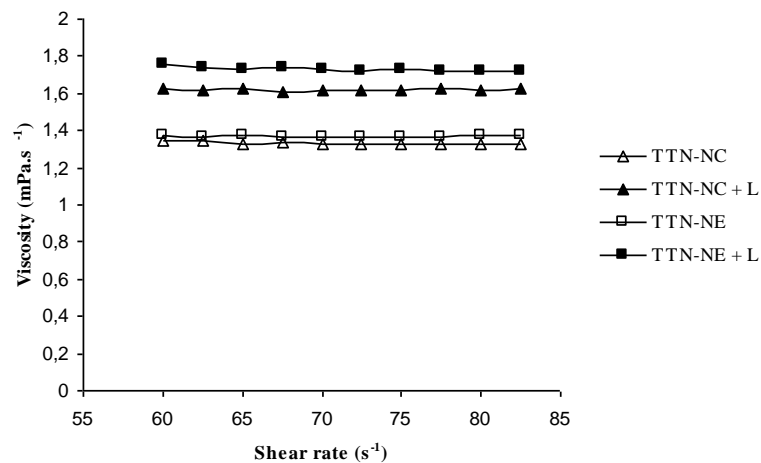


Fig. 1. Rheological behavior of the tretinoin-loaded lipid-core nanocapsules and tretinoin-loaded nanoemulsion before (TTN-NC and TTN-NE, respectively) and after addition of lactose at 10 % (w/v) (TTN-NC+L and TTN-NE+L, respectively).

After the development of the colloidal systems (TTN-NC and TTN-NE), these formulations were used to prepare spray-dried powders using lactose at 10 % (w/v). Lactose, a water soluble excipient, acts as a drying support for the process. Its presence is critical to obtain the respective powders and for the redispersion process to achieve the advantageous effect of the original nanoparticles [34,42]. Table 2 shows the physicochemical characteristics

of powders containing tretinoin-loaded lipid-core nanocapsules or nanoemulsion as well as the spray-dried lactose. Process yields were between 30 and 40 %. Those values are in agreement with the study reported by Beck and co-workers in 2006 [30] to obtain spray-dried powders containing nanocapsules. Results were similar for both formulation (SD-TTN-NC and SD-TTN-NE) and also compared to the spray-dried lactose ($p > 0.05$). No influence of the polymeric layer of nanocapsules could be observed on this parameter.

On the other hand, the percentage of encapsulation was higher for powders prepared with tretinoin-loaded lipid-core nanocapsules (94 ± 2 %), compared to those containing tretinoin-loaded nanoemulsion (89 ± 1 %) ($p \leq 0.05$). A positive influence of the polymeric layer of nanocapsules could be observed on this parameter. This result could be explained by the tendency of the oily nanodroplets to stick on the walls of the equipment leading to a selective loss of the drug. In order to refute the hypothesis of a thermal degradation of tretinoin, we prepared a spray-dried powder using an aqueous tretinoin nanodispersion prepared with the same surfactants (polysorbate 80 and sorbitan monostearate) as for preparing the lipid-core nanocapsules and nanoemulsions. The preparation was done as described for the obtaining of lipid-core nanocapsules, omitting the addition of the polymer and the oil in the organic phase. After the spray-drying, the resulting powder showed a drug content of 95 %, discarding the hypothesis of a heat degradation of tretinoin and reinforcing our hypothesis of the sticking of oily nanodroplets (nanoemulsion) on the walls of the equipment.

Table 2. Physicochemical characteristics of spray-dried powders containing tretinoin-loaded lipid-core nanocapsules (SD- TTN-NC-) or tretinoin-loaded nanoemulsion (SD- TTN-NE).

	Yield (%)	Tretinoin content (mg/g)	Percentage of encapsulation (%)
SD-TTN-NC	34 ± 3	3.00 ± 0.06	94.22 ± 2.01
SD-TTN-NE	40 ± 6	2.82 ± 0.02	88.74 ± 0.65
SD-L	31 ± 3	-	-

The morphological observation of powders was carried out by scanning electron microscopy (SEM). SEM images are presented in Figure 2. Spherical particles were obtained after the spray-drying of formulations with a narrow size distribution, regardless of the type of nanostructures. The powder prepared with tretinoin-loaded nanoemulsion showed bigger particles compared to that prepared with lipid-core nanocapsules. The influence of the

viscosity can be discarded considering their similar values (1.33 and $1.36 \text{ mPa}\cdot\text{s}^{-1}$ for TTN-NC and TTN-NE, respectively). The smoother surface of powders prepared with tretinoin-loaded lipid-core nanocapsules is according to the previous finding reported by Tewa-Tagne and co-workers in 2007 (34). The presence of the nanostructures on the particle surface could not be observed, being the nanoparticles probably included in the particles, as previously suggested [34]. This is an interesting result considering that by using silicon dioxide as the drying adjuvant, the presence of nanoparticles on the surface of such spray-dried particles is clearly observed by SEM [28,40]. The difference of the two approaches is the solubility of the drying adjuvant in lipid-core nanocapsule suspensions, which could explained this morphological difference. Whereas the silicon dioxide forms a dispersion in water, lactose is soluble in this medium. In the first case nanoparticles are deposited on the silica support during the drying process, while in the second case lactose and the particles are drying together forming clusters.

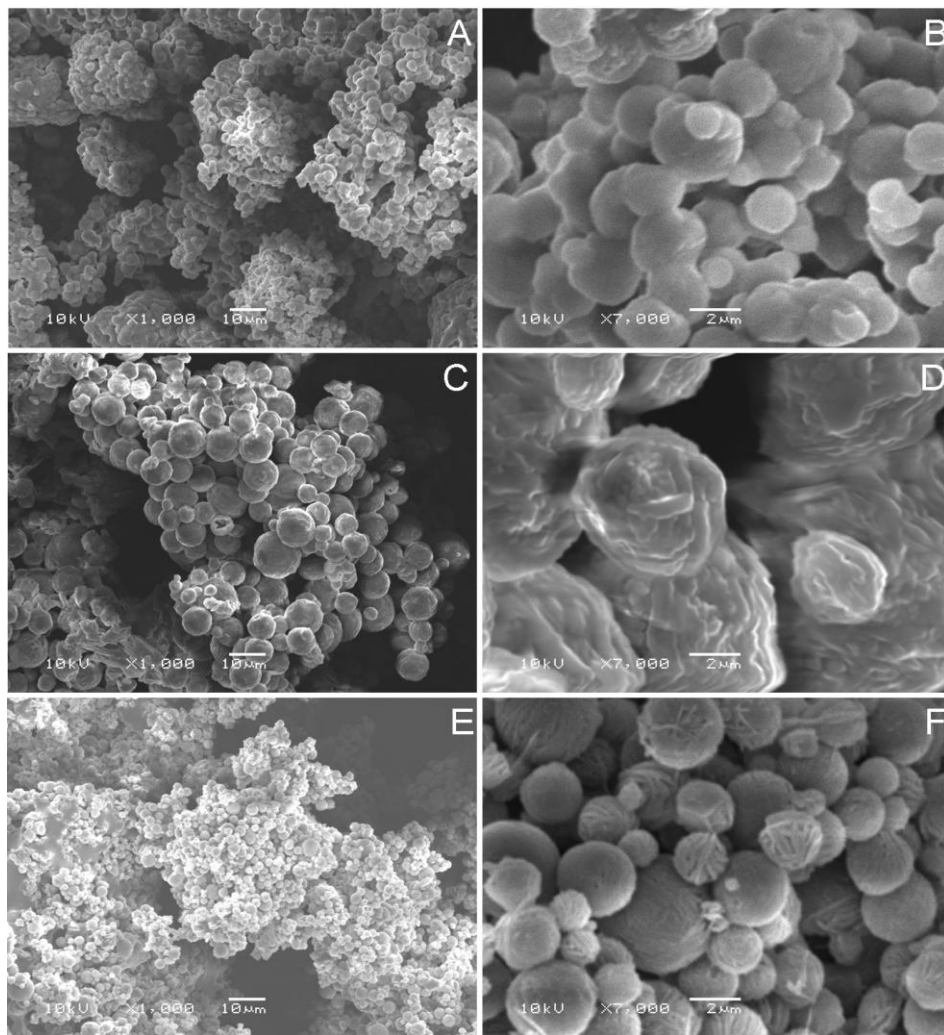


Fig. 2. SEM images of spray SD-TTN-NC (A and B); SD-TTN-NE (C and D); and SD-L (E and F). [A, C and E (1,000x); B, D and F (7,000x)].

In order to investigate the recovery of the nanoparticles after aqueous redispersion of powders, the spray-dried powders were dispersed in purified water under vortex stirring (2 minutes). They were easily wetted and dispersed. The aqueous dispersion was filtered and analyzed by PCS. The redispersed medium of powders prepared with tretinoin-loaded lipid-core nanocapsules showed particles with a mean size of 204 ± 2 nm (polydispersity index = 0.26), while the redispersed medium of tretinoin-loaded nanoemulsion showed particles with mean size of 251 ± 9 (polydispersity index = 0.34). The recovered particles showed similar mean size compared to the original suspensions (Table 1) with a slightly increase in polydispersity indices. These results are in accordance to findings previously reported for spray-dried formulations [34,41]. In this way, both spray-dried powders (SD-TTN-NC and SD-TTN-NE) presented an ability to recover the nanoparticles after their aqueous redispersion. This result suggests that a significant change in the supramolecular structure of nanocapsules did not occur during the spray-drying process.

Taking all the physicochemical properties of the spray-dried powders into account, we observed their similar behavior regardless the type of the original nanostructured system (nanocapsules or nanoemulsion). However, the powders prepared with TTN-NC showed higher percentage of encapsulation, higher drug content and lower polydispersity index after their aqueous redispersion. A positive influence of the polymeric layer in the nanocapsules could be observed in the development of such powders. In this way, this formulation was chosen for the photostability study.

Although the higher photostability of tretinoin loaded in conventional nanocapsules and a lipid-core nanocapsules under UV radiation was previously reported [16,17], to the best of our knowledge there is not any report in the literature showing the ability of lipid-core nanocapsules to maintain this protection after a drying process. In the case of a photounstable drug, it is noteworthy to evaluate its chemical behavior after the reconstitution of the spray-drier powder in water. Based on this lack of information in the literature, we evaluated the tretinoin photostability in lipid-core nanocapsules containing BHT and in its respective redispersed spray-dried powders under UV radiation exposure. UVA radiation was chosen for our study. According to Tashtoush and co-workers (2008) [45] UVA radiation is the major contributor to the photodegradation of tretinoin. Photodegradation profiles are depicted in Figure 3.

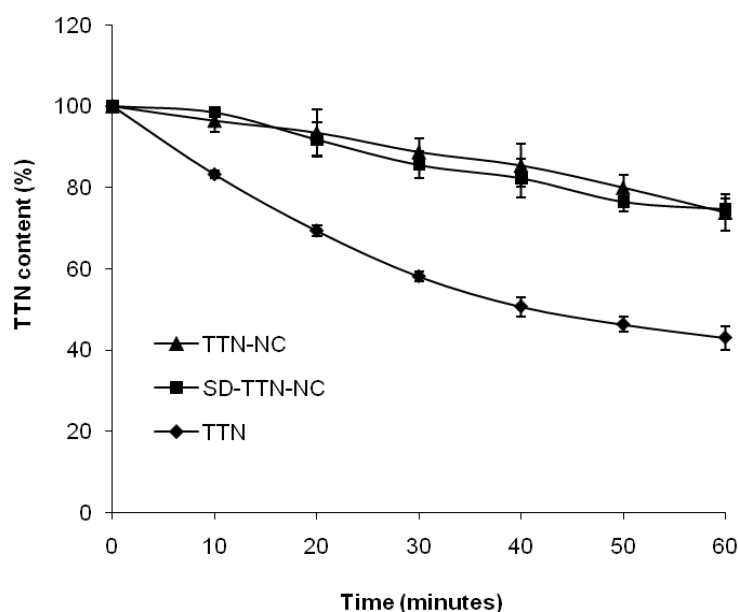


Fig. 3. Photodegradation profile of tretinoin as a function of time under UVA radiation exposure (redispersed spray-dried powders containing tretinoin-loaded lipid-core nanocapsules – SD-TTN-NC; tretinoin-loaded lipid-core nanocapsules – TTN-NC; and tretinoin methanolic solution - TTN). Results represent the mean \pm standard deviation of 3 batches.

After 60 minutes of UVA light exposure, TTN-NC showed a percentage of drug degradation of 26.15 ± 4.34 %. Redispersed SD-NC-TTN showed a similar percentage of degradation (28.73 ± 6.19 %) ($p > 0.05$). The photodegradation profile of TTN-NC was according to a zero order kinetic (good linearity plotting of tretinoin content as a function of time, $r = 0.97 \pm 0.04$), while the data obtained from the redispersed SD-TTN-NC fitted better to the second order kinetic (good linearity plotting the inverse concentration of tretinoin as a function of time, $r = 0.99 \pm 0.01$). The tretinoin methanolic solution showed a percentage of photodegradation of 63.33 ± 2.69 % after 60 minutes of exposure, according to a zero order kinetic ($r = 0.99$). This percentage was significantly higher ($p \leq 0.05$) compared to the nanoencapsulated tretinoin (as original suspension or as reconstituted powder). Furthermore, samples exposed in the cuvettes covered with aluminum foil did not show a significant decrease in the content of tretinoin (< 5 %) after 60 minutes of the experiment, confirming that the degradation of tretinoin was due to the UVA radiation.

Taking the photodegradation kinetic into account (first order for TTN-NC, second-order for redispersed SD-TTN-NC and zero order for tretinoin methanolic solution), we

calculated the half-life of the drug in the different samples exposed to UVA light (Figure 4). Samples containing tretinoin-loaded lipid-core nanocapsules showed similar half-lives (118.35 ± 12.47 minutes for TTN-NC and 118.82 ± 26.84 minutes for redispersed SD-TTN-NC) ($p > 0.05$). These values were more than two times higher than those showed by the methanolic solution (40 minutes). The similar half-lives obtained for the lipid-core nanocapsule suspension and its respective redispersed powder showed the ability of lipid-core nanocapsules to maintain its protection against UV light even after the spray-drying process. This result suggests that no significant change in the supramolecular structure of lipid-core nanocapsules occurs during the process. These findings show the feasibility to prepare tretinoin-loaded lipid-core nanocapsules as spray-dried powders for reconstitution intended to several applications in the development of nanomedicines.

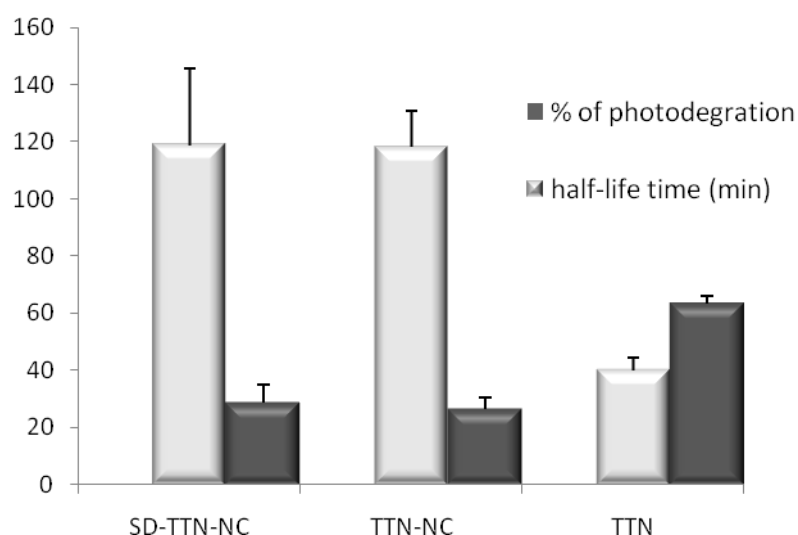


Fig. 4. Percentage (%) of photodegradation and half-life time of tretinoin in the different samples exposed to UVA radiation for 1 hour (redispersed spray-dried powders containing tretinoin-loaded lipid-core nanocapsules – SD-TTN-NC; tretinoin-loaded lipid-core nanocapsules –TTN-NC; and tretinoin in methanolic solution - TTN). Results represent the mean \pm standard deviation of 3 batches.

4. Conclusion

We proposed the use of spray-dried powders containing tretinoin-loaded lipid-core nanocapsules as intermediate product for the development of nanomedicines. The presence of the polymeric layer around the nanodroplets was essential to obtain higher drug content and

percentage of encapsulation (above 90 %). The nanostructures were recovered after aqueous redispersion of powders, as showed by PCS. Our experimental design showed for the first time the ability of lipid-core nanocapsules to protect tretinoin against UVA radiation even after their conversion in redispersible spray-dried powders. Studies are in progress to evaluate the incorporation of such powders in semisolid formulations.

Acknowledgements: A.F.O. thanks Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) for her fellowship. The authors thank the financial support of CNPq/Brazil, INCT-IF, FAPERGS, PRONEX-FAPERGS/CNPq, SCT-RS and Rede Nanocosméticos CNPq/MCT//Brazil.

References

- [1] D. Rigopoulos, D. Ioannides, D. Kalogeromitros, A.D. Katsambas, Comparison of topical retinoids in the treatment of acne, *Clin. Dermatol.* 22 (2004) 408-411.
- [2] A. Thielitz, A. Krautheim, H. Gollnick, Update in retinoid therapy of acne, *Dermatol. Ther.* 19 (2006) 272–279.
- [3] R. Serri, I. Matilde, Cosmoceutical: focus on topical retinoids in photoaging, *Clin. Dermatol.* 26 (2008) 633-635.
- [4] G.J. Fischer, J.J. Voorhess, Molecular mechanism of retinoids action in skin, *FASEB J.* 10 (1996) 1002-1013.
- [5] A.A. Date, B. Naik, M.S. Nagarsenker, Novel drug delivery systems: Potential in improving topical delivery of antiacne agents, *Skin Pharmacol. Physiol.* 19 (2006) 2–16.
- [6] R. Berger, R. Rizer, A. Barba, D. Wilson, D. Stewart, R. Grossman, M. Nighland, J. Weiss, Tretinoin gel microspheres 0.04% versus 0.1% in adolescents and adults with mild to moderate acne vulgaris: A 12-week, multicenter, randomized, double-blind, parallel-group, phase IV Trial, *Clin. Ther.* 29 (2007) 1086-1097.
- [7] M. Manconi, V. Donatella, C. Sinico, G. Loy, A.M. Fadda, Niosomes as carriers for tretinoin II. Influence of vesicular incorporation on tretinoin photostability, *Int. J. Pharm.* 22 (2003) 261-272.
- [8] M.G. Brisaert, I. Everaerts, J.A. Plaizier-Vercammen, Chemical stability of tretinoin in dermatological preparations, *Pharm. Acta Helv.* 70 (1995) 161-166.
- [9] K. Shimizu, K. Tamagawa, N. Takahashi, K. Takayama, Y. Maitani, Stability and anti-tumor effects of all-*trans* retinoic acid-loaded liposomes contained seryglucoside mixture, *Int. J. Pharm.* 258 (2003) 45-53.
- [10] S.J. Lim, M.K. Lee, C.K. Kim, Altered chemical and biological activities of all-*trans* retinoic acid incorporated in solid lipid nanoparticle powders, *J. Control. Release* 100 (2004) 53-61.
- [11] G. Ioele, E. Cione, A. Risoli, G. Genchi, G. Ragno, Accelerated photostability study of tretinoin and isotretinoin in liposome formulations, *Int. J. Pharm.* 293 (2005) 251–260.

- [12] C. Sinico, M. Manconi, M. Peppi, F. Lai, D. Valenti, A.M. Fadda, Liposomes as carriers for dermal delivery of tretinoin: *in vitro* evaluation of drug permeation and vesicle–skin interaction, *J. Control. Release* 103 (2005) 123–36.
- [13] J.M. Fachinetto, A.F. Ourique, G. Lubini, S.B. Tedesco, A.C.F. Silva, R.C.R. Beck, Tretinoin-loaded polymeric nanocapsules: evaluation of the potential to improve the antiproliferative activities on *Allium cepa* root-tip compared to the free drug, *Lat. Am. J. Pharm.* 27 (2008) 668-673.
- [14] Y. Li, X.R. Qi, Y. Maitani, T. Nagai, PEG-PLA diblock copolymer micelle-like nanoparticles as all trans retinoic acid carrier: *in vitro* and *in vivo* characterizations, *Nanotechnology* 20 (2009) 1-10.
- [15] K.A. Shah, A.A. Date, M.D. Joshi, V.B. Patravale, Solid lipid nanoparticles (SLN) of tretinoin: Potential in topical delivery, *Int. J. Pharm.* 345 (2007) 163-171.
- [16] A.F. Ourique, A.R. Pohlmann, S.S. Guterres, R.C.R. Beck, Tretinoin-loaded nanocapsules: Preparation, physicochemical characterization, and photostability study, *Int. J. Pharm.* 352 (2008) 1-4.
- [17] A.F. Ourique, S.I. Lima, C.V. Ferreira, C.B. Silva, M.C.L. Marchiori, A.R. Pohlmann, S.S. Guterres, R.C.R. Beck, Lipid-core nanocapsules as a nanomedicine for parenteral administration of tretinoin: development and *in vitro* antitumor activity on human myeloid leukaemia cells, *J. Biomed. Nanotechnol.* 6 (2010) 124-223.
- [18] A. Jager, V. Stefani, S.S. Guterres, A.R. Pohlmann, Physicochemical characterization of nanocapsule polymeric wall using fluorescent benzenoic probes, *Int. J. Pharm.* 338 (2007) 297-305.
- [19] C. Vauthier, K. Bouchemal, Methods for the preparation and manufacture of polymeric nanoparticles, *Pharmaceut. Res.* 26 (2009) 1025-1058.
- [20] C.E. Mora-Huertas, H. Fessi, A. Elaissari, Polymer-based nanocapsules for drug delivery, *Int. J. Pharm.* 385 (2010) 113-142.
- [21] E. Jager, C.G. Venturini, F.S. Poletto, L.M. Colomé, J.P.U. Pohlmann, A. Bernardi, A.M.O. Battastini, S.S. Guterres, A.R. Pohlmann, Sustained release from lipid-core nanocapsules by varying the core viscosity and the particle surface area, *J. Biomed. Nanotechnol.* 5 (2009) 130-140.
- [22] M.J. Alonso, Nanomedicines for overcoming biological barriers, *Biomed. Pharmacother.* 58 (2004) 168-172.
- [23] S. Sandhiya, S.A. Dkhar, A. Surendiran, Emerging trends of nanomedicine – an overview, *Fundam. Clin. Pharm.* 23 (2009) 709-711.
- [24] M.C. Fontana, K. Coradini, S.S. Guterres, A.R. Pohlmann, R.C.R. Beck, Nanoencapsulation as a way to control the release and increase the photostability of clobetasol propionate: Influence of nanostructured system, *Biomed. Nanotechnol.* 5 (2009) 254-263.
- [25] S.C. Shin, H.J. Kim, I.J. Oh, C.W. Cho, K.H. Yang, Development of tretinoin gels for enhanced transdermal delivery, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 60 (2005) 67-71.
- [26] M.P. Alves, A.L. Scarrone, M. Santos, A.R. Pohlmann, S.S. Guterres, Human skin penetration and distribution of nimesulide from hydrophilic gels containing nanocarriers, *Int. J. Pharm.* 341 (2007) 215-220.

- [27] M.C.L. Marchiori, G. Lubini, G. Dalla Nora, R.B. Friedrich, M.C. Fontana, A.F. Ourique, M.O. Bastos, L.A. Rigo, C.B. Silva, S.B. Tedesco, R.C.R. Beck, Hydrogel containing dexamethasone-loaded nanocapsules for cutaneous administration: preparation, characterization and in vitro drug release study, *Drug Dev. Ind Pharm.* 36 (2010) 962-971.
- [28] S.S. Guterres, R.C.R. Beck, A.R. Pohlmann, Spray-drying technique to prepare innovative nanoparticulated formulations for drug administration: A brief overview, *Braz. J. Phys.* 39 (2009) 205-209.
- [29] R.C.R. Beck, M.I.Z. Lionzo, T.M.H. Costa, E.V. Benvenuti, M.I. Ré, M.R. Gallas, A.R. Pohlmann, S.S. Guterres, Surface morphology of spray-dried nanoparticle-coated microparticles designed as an oral drug delivery system, *Braz. J. chem. Eng.* 25 (2008) 389-398.
- [30] R.C.R. Beck, S.E. Hass, S.S. Guterres, M.I. Ré, E.V. Benvenuti, A.R. Pohlmann, Nanoparticle-coated organic-inorganic microparticles: Experimental design and gastrointestinal tolerance evaluation, *Quim.Nova* 5 (2006) 990-996.
- [31] A.R. Pohlmann, V. Weiss, O. Mertins, N. Pesce Da Silveira, S.S. Guterres, Spray-dried indomethacin-loaded polyester nanocapsules and nanospheres: Development, stability evaluation and nanostructure models, *Eur. J. Pharm. Sci.* 16 (2002) 305-312.
- [32] C.R. Müller, V.L. Bassani, A.R. Pohlmann, C.B. Michalowski, P.R. Petrovick, S.S. Guterres, Preparation and characterization of spray-dried polymeric nanocapsules, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 26 (2000) 343-347.
- [33] P. Tewa-Tagne, S. Briançon, H. Fessi, Spray-dried microparticles containing polymeric nanocapsules: Formulation aspects, liquid phase interactions and particles characteristics, *Int. J. Pharm.* 325, (2006) 63-74.
- [34] P. Tewa-Tagne, S. Briançon, H. Fessi, Preparation of redispersible dry nanocapsules by means of spray-drying: Development and characterization *Eur. J. Pharm. Sci.* 30, (2007) 124-135.
- [35] P. Tewa-Tagne, G. Degobert, S. Briançon, C. Bordes, J.Y. Gauvrit, P. Lanteri, H. Fessi, Spray-drying nanocapsules in presence of colloidal silica as drying auxiliary agent: Formulation and process variables optimization using experimental designs, *Pharmaceut. Res.* 24 (2007) 650-661.
- [36] S.R. Schaffazick, A.R. Pohlmann, T. Dalla-costa, S.S. Guterres, Freeze-drying polymeric colloidal suspensions: nanocapsules, nanospheres and nanodispersion. A comparative study, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 56 (2003) 501-505.
- [37] A. Saez, M. Guzmán, J. Molpeceres, M.R. Aberturas, Freeze-drying of polycaprolactone and poly(D,L-lactic-glicolic) nanoparticles induce minor particle size changes affecting the oral pharmacokinetics of loaded drugs, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 50 (2000) 379-387.
- [38] R.B. Friedrich, M.C. Fontana, M.O. Bastos, A.R. Pohlmann, S.S. Guterres, R.C.R. Beck, Drying polymeric drug-loaded nanocapsules: The wet granulation process as a promising approach, *J. Nanosci. Nanotechnol.* 10 (2010) 616-621.
- [39] R.C.R. Beck, A.R. Pohlmann, E.V. Benvenuti, T. Dalla-costa, S.S. Guterres, Nanostructure-coated diclofenac-loaded microparticles: Preparation, morphological

- characterization, *in vitro* release and *in vivo* gastrointestinal tolerance, J. Brazil Chem Soc. 16 (2005) 1633-1640.
- [40] R.C.R. Beck, A.R. Pohlmann, C. Hoffmeister, M.R. Gallas, E. Colnot, U.F. Schaefer, S.S. Guterres, C.M. Lehr, Dexamethasone-loaded nanoparticle-coated microparticles: Correlation between *in vitro* drug release and drug transport across Caco-2 cell monolayers, Eur. J. Pharm. Biopharm. 67 (2007) 18-30.
- [41] G.S. Domingues, S.S. Guterres, R.C.R. Beck, A.R. Pohlmann, Micropartículas nanorevestidas contendo um fármaco modelo hidrofóbico: preparação em etapa única e caracterização biofarmacêutica, Quim. Nova 31 (2008) 1966-1972.
- [42] K. Kho, K. Hadinoto, Aqueous re-dispersibility characterization of spray-dried hollow spherical silica nano-aggregates, Powder Technol. 198 (2010) 354-363.
- [43] A.R. Pohlmann, L. Cruz, G. Mezzalira, L.U. Soares, N.P. Silveira, S.S. Guterres, Structural model of polymeric nanospheres containing indomethacin ethyl ester and *in vivo* antiedematogenic activity. Int. J. Nanotechnol. 4 (2007) 454-467.
- [44] S.S. Guterres, C.R. Müller, C.B. Michalowski, A.R. Pohlmann, T.D. Costa, Gastrointestinal tolerance after oral administration of spray-dried diclofenac-loaded nanocapsules and nanospheres. STP Pharma Sciences (2001) 229-233.
- [45] B.M. Tashtoush, E.L. Jacobson, M.K. Jacobson, UVA is the major contributor to the photodegradation of tretinoin and isotretinoin: Implications for development of improved pharmaceutical formulations, Int. J. Pharm. 352 (2008) 123-128.

CAPÍTULO 2: Nanomedicamento tópico contendo tretinoína: emprego de sistemas pulverulentos como produto intermediário

CAPÍTULO 2: Nanomedicamento tópico contendo tretinoína: emprego de sistemas pulverulentos como produto intermediário

2.1 Introdução

A aplicação tópica de medicamentos visa tratar afecções que acometem a pele, portanto, é essencial que o fármaco fique restrito ao tecido cutâneo evitando que haja efeitos colaterais sistêmicos. Outra característica importante é a eficiência da formulação dermatológica em promover o alcance do fármaco na epiderme e derme para que ocorra o efeito farmacológico esperado (GOODMAN & GILMAN, 2007). Para modular a permeação cutânea, a associação de fármacos a sistemas nanocarreadores surge como uma alternativa que proporcionaria uma liberação homogênea e protegeria a pele do contato imediato com o fármaco (BOUCHEMAL *et al.*, 2004). A tretinoína, empregada no tratamento de acne vulgar, fotoenvelhecimento, psoríase, entre outras afecções cutâneas, apresenta efeitos colaterais característicos como irritação e fotosensibilidade na região da pele onde é aplicada (ZOUBOULIS *et al.*, 2001; RIGOPOULOS *et al.*, 2004). Além disso, o desenvolvimento de formulações semissólidas contendo tretinoína apresenta problemas de caráter farmacotécnico, já que este fármaco é insolúvel em água e demonstra uma considerável instabilidade frente à luz e ao ar (BERSHAD *et al.*, 2001).

No presente capítulo, foi proposta a preparação de hidrogéis empregando os pós desenvolvidos no capítulo anterior como produto intermediário. Neste contexto, buscou-se a obtenção de uma forma farmacêutica semissólida isenta de solventes orgânicos na sua composição e com adequada fotoestabilidade.

PUBLICAÇÃO 2: Topical semisolid nanomedicine containing tretinoin: using spray-dried powders as an intermediate product

Artigo a ser submetido ao Soft Materials

Topical semisolid nanomedicine containing tretinoin: using spray-dried powders as an intermediate product

M. C. L. Marchiori¹, R. H. Rascovetzki², A. F. Ourique³, L. A. Rigo¹, C. B. Silva¹, A. R. Pohlmann^{3,4}, S. S. Guterres^{3,4}, R. C. R. Beck^{3,4*}

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Av. Roraima, 1000, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 97105-900, Brazil

²Curso de Farmácia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 97105-900, Brazil

³Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga, 2752, Porto Alegre, RS, 90610-000, Brazil

⁴Programa de Pós-Graduação em Nanotecnologia Farmacêutica, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga, 2752, Porto Alegre, RS, 90610-000, Brazil

* Corresponding author: Ruy C. R. Beck

Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga, 2752, CEP 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil

Tel +55 51 3308-5951 Fax: +55 55 3308-5090

E-mail address: ruy.beck@ufrgs.br

ABSTRACT

Aqueous redispersion of spray-dried powders containing tretinoin-loaded lipid-core nanocapsules have shown an increase of tretinoin photostability under UV light. The advantages of using powders instead of liquid forms as intermediate products in the pharmaceutical industry can be explained by their better storage properties, lesser total volume and lower risk of microbiological contamination. Thus, the goal of our work was to evaluate the feasibility of using these spray-dried powders in the preparation of semisolid dermatological nanomedicines without changing their protective property against UV radiation. Spray-dried tretinoin-loaded lipid-core nanocapsules (SD-TTN-NC) were prepared using lactose as drying adjuvant. Two approaches were evaluated in the development of hydrogels: a) dispersing Carbopol Ultrez 10[®] in an aqueous redispersion of the SD-TTN-NC (method 1); b) directly incorporating SD-TTN-NC in a hydrogel previously formed (method 2). All formulations presented drug content close to theoretical value, adequate pH values (5.6 - 6.3) and pseudo-plastic behavior ($n < 1$). In general, the presence of lactose led to a decrease in the spreadability of the formulations ($p \leq 0.05$). Hydrogels prepared by method 1 showed lower spreadability ($1.61 \pm 0.13 \text{ mm}^2 \cdot \text{g}^{-1}$) than that prepared by method 2 ($2.17 \pm 0.05 \text{ mm}^2 \cdot \text{g}^{-1}$). Photodegradation of tretinoin in hydrogels prepared by both methods showed similar half-life times (19.7 ± 0.2 hours and 19.5 ± 0.3 hours, respectively) compared to the hydrogels prepared with the original nanocapsule suspension (20.7 ± 1.4 hours). Spray-dried powders containing tretinoin-loaded lipid-core nanocapsules are feasible materials to be used as intermediate products in the development of hydrogels intended for cutaneous application without losing their ability to increase the photostability of tretinoin.

Keywords: Hydrogels, nanocapsules, photostability, spray drying, tretinoin.

INTRODUCTION

Retinoids are a group of molecules derived from vitamin A which are effective in the treatment of acne vulgaris, ichthyosis, psoriasis, skin cancer and photoaging. Tretinoin (TTN), the most active retinoid derivative, acts by modulating the proliferation and differentiation epidermal and inhibiting follicular keratinization. Their topical application could produce smoother, less wrinkled and less pigmented skin after a short time of treatment due to the increased number of epidermal cell layers and epidermal thickness besides strato corneo compactation (1-2). This drug is available commercially in the form of hydroalcoholic gels and creams for skin topical treatment. However, lack of adherence to the treatment with such formulations due to the appearance of erythema, dryness, itching, irritation and burning after drug application has been frequently reported (1, 3).

Despite their recognized efficacy in dermatological treatments, TTN presents some drawbacks like its poor aqueous solubility, instability against light and air as well as irritation in the area of application. Some works in the literature have showed that TTN undergoes considerable photodegradation when incorporated into semisolid dosage forms. A commercial lotion containing TTN has showed that 10 minutes of light radiation caused degradation of 70% of the drug (4-6). Moreover, due to its insolubility in water it is necessary the use of ethanol, propyleneglycol or other co-solvents to obtain hydrogels as dosage forms. These co-solvents, along with the drug, can increase the skin irritation after their cutaneous administration.

Concerning the characteristics of tretinoin, the use of nanotechnology has been suggested as an alternative to reduce its adverse effects on the skin and overcome problems like instability under light exposition and low aqueous solubility. Some studies in the literature have reported its association with liposomes (7, 8), solid lipid nanoparticles (5), niosomes (9), nanocapsules (10, 11) and lipid-core nanocapsules (12).

Polymeric nanocapsules are vesicular nanocarriers in which an oily phase is confined in a cavity surrounded by a thin polymeric layer (13). On the other hand, lipid-core nanocapsules have a multicomponent core formed by a dispersion of solid and liquid lipids (12, 14). Semisolid formulations containing polymeric nanocapsules and lipid-core nanocapsules have been studied to control the release of substances (15), to improve their photostability (12, 16, 17) and to modulate their cutaneous permeation (18-20).

For example, hydrogels containing nimesulide-loaded nanocapsules presented a higher penetration of nimesulide in the deeper skin in comparison to the formulations containing nimesulide-loaded nanospheres or nanoemulsion (19). Moreover, hair follicles can act as a

drug reservoir after the topical application of a formulation containing nanoparticles. Nanoparticles can be stored in the hair follicles up to 10 days after topical administration, while the non-nanoparticulated form could be detected only up to 4 days (21).

The scientific literature presents other studies reporting the development of semisolid dosage forms containing polymeric nanoparticles (16, 19, 22). These and other studies report the preparation of hydrogels in which colloidal suspensions are responsible by swelling of the gel forming polymer (15, 23, 24). Thereby, the incorporation of polymeric nanocapsules in dermatological hydrogels has been done by the direct addition of colloidal suspensions instead of water on the gel forming polymer or on the emulsion. This can be an obstacle for the development of some formulations requiring high concentration of drugs or the addition of other functional adjuvants. Generally, the relatively low concentration of drug in nanoparticle suspensions requires the addition of large volumes of suspension to obtain a dosage form with the desired concentration. To overcome these potential disadvantages, Terroso and co-workers in 2009 developed hydrogels prepared with the spray-dried coenzyme Q10-loaded nanocapsules instead of the original nanocapsule suspension, as an innovative cosmetic formulation (25).

Besides excellent results related with the better photostability and high apparent aqueous solubility of nanoencapsulated tretinoin (10-12, 17) compared to the free drug, the physicochemical instability inherent to nanocapsule suspensions may limit their wide use in the pharmaceutical industry as an intermediate product for the development of semisolid dosage forms. Recently, our research group has showed the feasibility of obtaining spray-drying powders containing tretinoin-loaded lipid-core nanocapsules (SD-TTN-NC) with similar functional properties of the original lipid-core nanocapsule suspensions. Recovery of nanoparticles after their aqueous redispersion was also demonstrated. Furthermore, the spray-drying process did not affect the protection of tretinoin against UV light. The ability of the lipid-core polymeric nanocapsules to protect tretinoin against UVA photodegradation remained intact even after the spray-drying process (17).

Based on the results cited, in the present work we evaluated two strategies to incorporate these redispersible powders in hydrogels intended to cutaneous administration a) dispersing Carbopol Ultrez 10[®] in an aqueous redispersion of the SD-TTN-NC (method 1) or b) directly incorporating SD-TTN-NC in a hydrogel previously formed (method 2). The feasibility of both strategies was evaluated regarding the physicochemical and rheological properties of formulations as well as the feasibility of these approaches to maintain a higher tretinoin photostability. Up to the best of our knowledge these approaches to obtain hydrogels

with better tretinoin photostability have not yet been explored in the literature and may lead to important findings for the development of topical nanomedicines containing photolabile substances.

MATERIAL AND METHODS

Materials

Tretinoin was a gift from Roche (Switzerland). Poly(ϵ -caprolactone) (PCL) and sorbitan monostearate were purchased from Sigma-Aldrich (São Paulo, Brazil); caprylic/capric triglyceride mixture was delivered from Brasquim (Porto Alegre, Brazil); polysorbate 80 was supplied by Henrifarma (São Paulo, Brazil) and acetone from Vetec (Rio de Janeiro, Brazil). Carbopol Ultrez 10[®] and triethanolamine were obtained from DEG (São Paulo, Brazil) and imidazolidinyl urea (Germall 115[®]) was acquired from Alpha Química (São Paulo, Brazil). Lactose monohydrate and butylhydroxytoluene (BHT) were obtained from Delaware (Porto Alegre, Brazil). HPLC grade methanol was acquired from Tedia (São Paulo, Brazil). All chemicals and solvents presented pharmaceutical or HPLC grade and were used as received.

Preparation of tretinoin-loaded nanocapsules and respective spray-dryer powder

Tretinoin-loaded lipid core nanocapsules (TTN-NC) were prepared by interfacial deposition of preformed polymers at a concentration of 0.5 mg.mL⁻¹ of tretinoin, as previously described (17), stored at room temperature (25 ± 2° C) and protected from light (amber glass bottles). Drug content was determined by liquid chromatography (17). For the preparation of redispersible spray-dried powders, lactose (10 % w/v) was mixed with the suspensions (TTN-NC) under magnetic stirring for 20 minutes. This mixture was fed into a spray dryer (Spray-dryer MSD 1.0, Labmaq, Ribeirão Preto, Brazil) in order to obtain the dried powder (SD-TTN-NC), according to the conditions described in our previous work (17). Drug content in the spray-dried powders was assayed by liquid chromatography (17).

Preparation of hydrogels containing the spray-dried powder

Two different strategies (methods) were evaluated in the preparation of Carbopol hydrogels (Carbopol Ultrez 10[®]): method 1 and method 2. In the first method (Method 1) hydrogels were prepared dispersing the polymer (Carbopol Ultrez 10[®]) in an aqueous redispersion of the SD-NC-TTN. The second strategy (Method 2) was based on the direct addition of the SD-NC-TTN in a preformed hydrogel network. These formulations were

named HG-NC-1 and HG-NC-2, respectively, presenting a final theoretical tretinoin content of 0.05 % (w/w). In addition, hydrogels prepared using TTN-NC (HG-TTN-NC), blank nanocapsules (without drug) (HG-B-NC) or spray-dried lactose (HG-L) was also obtained. For this last formulation, a lactose solution was spray-dried with water (10 % w/v) in order to obtain spray-dried lactose (SD-L). This powder was used in the preparation of hydrogel controls by both methods (HG-L-1 and HG-L-2, respectively). Table 1 shows the qualitative composition of each hydrogel. In order to establish an adequate comparison, we also prepared similar hydrogels by the dispersion of Carbopol Ultrez 10[®] in the aqueous TTN-loaded nanocapsule suspension or blank nanocapsule suspension (HG-NC-TTN and HG-NC-B, respectively), as described by Ourique and co-workers (6). All formulations were stored protected from light and at room temperature (25 ± 2 °C).

TABLE 1 Quali-quantitative composition of hydrogels

	HG-TTN-NC	HG-NC-B	HG-NC-1 and 2	HG-L-1 and 2
Carbopol Ultrez 10 [®]	0.5 g	0.5 g	0.5 g	0.5 g
Imidazolidinyl urea	0.6 g	0.6 g	0.6 g	0.6 g
Triethanolamine	0.2 g	0.2 g	0.2 g	0.2 g
TTN-NC	up to 100 g	----	----	----
B-NC	----	up to 100 g	----	----
SD-TTN-NC	----	----	17.1 g	----
SD-L	----	----	----	17.1 g
Distilled water	----	----	ad 100 g	ad 100 g

Physicochemical and rheological characterization of hydrogels

All hydrogels were characterized by means of pH, drug content, rheological behavior and spreadability. pH measurements were carried out using a calibrated potentiometer (MPA-210 Model, MS-Tecnopon, São Paulo, Brazil) after dilution of the samples in water (10 % w/v). Drug content in hydrogels was assayed by liquid chromatography. The amount of 1g of each formulation was quantitatively transferred to a 50 mL volumetric flask using methanol as solvent. This mixture was kept under ultrasonic agitation for 30 minutes followed by centrifugation (3,500 rpm), filtering through a paper filter (Quantitative filter paper, JP4, 28 µm) and through a membrane (Sartorius Biolab Products 0.45 µm). TTN was assayed by HPLC according to a method previously validated to assay tretinoin in hydrogels (6). The

equipment consists of a Shimadzu instrument (LC-10AVP Pump, UV-VIS SPD-10AVP Module, Class-VP Software, Shimadzu, Tokyo, Japan) equipped with a Gemini RP-18 column (150 mm × 4.60 mm, 5 μm, Phenomenex, Torrance, USA). The mobile phase was composed of 85 % methanol, 15 % Milli-Q® water and 1 % glacial acetic acid and pumped at a flow rate of 1 mL.min⁻¹. The injected volume was 20 μL with UV detection at 342 nm (room temperature).

Rheological properties of all semisolid formulations were evaluated using a rotational viscometer, SC4-25 spindle and a small sample adapter (LV DV-II+ PRO Digital Viscosimeter, Brookfield Instruments, UK). Analyses were performed at 25 ± 1° C and results were analyzed using the Rheocalc software (V3.1-1 version, Brookfield, UK). The shear stress ramp was built with 10 points, using a shear rate interval of 0.05 s⁻¹. The mathematical modeling of data was done using different flow models: Power Law ($\tau = \kappa\gamma^{0.5}$), Casson ($\tau = \tau_0^{0.5} + \eta^{0.5} \gamma^{0.5}$), Bingham ($\tau = \tau + \eta\gamma$) and Herschel-Bulkley ($\tau = \tau_0 + \kappa\gamma^{0.5}$). Being, τ_0 the yield stress, η the viscosity, n the index flow, κ the index of consistency, τ the shear stress and γ the shear rate (26). The model presenting the best regression coefficient was chosen to describe the rheological behavior of each sample.

The spreadability (S_i) was performed at room temperature using the parallel plate method (27). The sample was introduced in a central hole (1 cm) of a mold glass plate. The mold plate was carefully removed and the sample was pressed subsequently with glass plates of known weights with intervals of 1 minute between each plate. The spreading area was measured in millimeters between each addition of a glass plate. The results were expressed in terms of spreading area as a function of the applied mass according to Equation 1:

$$S_i = \frac{d^2 \cdot \pi}{4} \quad (1)$$

in which S_i is the spreading area (mm²) after the application of a determined mass i (g), and d is the mean diameter (mm) reached by each sample.

The spreadability factor (S_f) represents how much a formulation is able to expand on a smooth horizontal surface when 1 g of weight is added on it, under the conditions described in the methodology above. The following equation (Equation 2) was used to calculate the spreadability factor (28):

$$S_f = \frac{A}{W} \quad (2)$$

where, S_f ($\text{mm}^2 \cdot \text{g}^{-1}$) is the spreadability factor resulting from the ratio between (A) the maximum spread area in mm^2 after the addition of the sequence of weights used in the experiment and (W) the total weight added (g).

Photodegradation studies

In order to evaluate the feasibility of both strategies to prepare suitable hydrogels using spray-dried powders containing tretinoin-loaded lipid-core nanocapsules without changing the ability of these nanocapsules to protect the drug (tretinoin) against UV photodegradation, a photostability study was carried out. Photostability studies were performed using a UVA lamp (Fluorescent Blacklight blue lamps, 30 W, Ecolume). UV-transparent disposable cuvettes containing exactly 1 g hydrogels were introduced in a closed chamber at a fixed distance of 10 cm ($n = 3$) and exposed to the UVA radiation. For each time interval (0, 2, 4, 6 and 8 hours) individual cuvettes were used. The hydrogel was removed quantitatively to a volumetric flask of 50 mL performing the same procedure described above. TTN was assayed by liquid chromatography after an extraction with methanol, according to the experimental procedure described in section above. The following samples were submitted to the photostability study: HG-NC-1, HG-NC-2, HG-NC-TTN and a marketed hydrogel formulation containing tretinoin at $0.5 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ (HG-C). The results were analyzed to establish the kinetics order of degradation of TTN in the formulations, calculating the respective half-life times (7, 10). In order to ensure that the degradation of TTN was due to the UVA light, the amount of remained TTN was evaluated in parallel from a cuvette containing the same sample completely covered by aluminum foil.

RESULTS AND DISCUSSION

In our previous works, we reported the feasibility to prepare spray-dried powders containing TTN-loaded lipid-core nanocapsules (SD-TTN-NC) using lactose as drying adjuvant. This formulation showed a higher photostability under UVA light compared to the TTN methanolic solution and similar photostability compared to the TTN-loaded lipid-core nanocapsule suspension (12,17). Such results showed that the ability of lipid-core nanocapsules to prevent tretinoin photodegradation was maintained even after the drying process. In the cited work we suggested the use of such powders as an intermediate product to prepare nanomedicines. In the present work, we evaluated two strategies to prepare hydrogels containing tretinoin-loaded lipid-core nanocapsules intended to cutaneous administration: using an aqueous redispersion of spray-dried powders to swell the polymer (Method 1) or

adding the spray-dried powder directly in a preformed hydrogel (Method 2). The use of nanostructured systems in solid form to produce the hydrogels allowed preparing them without using organic cosolvents to solubilize the drug (tretinoin). Control formulations were also prepared adding spray-dried lactose in hydrogels and using the original tretinoin-loaded lipid-core nanocapsule suspension (or blank nanocapsules suspension) to swell the polymer. Hydrogels showed glossy and homogeneous aspect. Hydrogels containing tretinoin presented a bright yellow color and those not containing the drug showed white color. Table 2 shows the physicochemical and spreadability characteristics of all hydrogels. All hydrogels presented drug content close to theoretical value and pH values between 5.6 and 6.3 (even those prepared with the original nanocapsule suspension), which is compatible to dermal application.

TABLE 2 Physicochemical and spreadability characteristics of hydrogels prepared with spray-dried powders by method 1 and 2 (HG-NC-1 and HG-NC-2, respectively), blank lipid-core nanocapsules (HG-B-NC) and TTN-loaded lipid-core nanocapsules (HG-TTN-NC).

Formulation	Drug content (mg. g ⁻¹)	pH	S _f (mm ² .g ⁻¹)
HG-NC-1	0.51 ± 0.01	6.34 ± 0.04	1.61 ± 0.13 ^a
HG-NC-2	0.51 ± 0.01	5.72 ± 0.15	2.17 ± 0.05 ^b
HG-TTN-NC	0.50 ± 0.02	6.16 ± 0.09	2.73 ± 0.03 ^c
HG-B-NC	0.00 ± 0.00	5.66 ± 0.08	3.20 ± 0.21 ^d

Means, in column, with the same letter are not statistically different (Anova, Tukey test, $p \leq 0.05$).

The spreadability is an important feature in dermatological formulation being responsible for transferring the correct dose at the application site (29). HG-NC-1 and HG-NC-2 were the formulations that showed lower spreadability factor (ANOVA, $p \leq 0.05$) indicating that the presence of the spray-dried powder influences this feature. These results suggest an increase in the viscosity of these formulations by the presence of the lactose. Indeed, hydrogels prepared with the spray-dried lactose presented similar spreadability factors (1.58 and 2.39, for HG-L-1 and HG-L-2) compared to their respective formulation HG-NC-1 or HG-NC-2. Regarding the two methods, hydrogels prepared by method 2 showed a better spreadability compared to the hydrogels prepared by method 1 (ANOVA, $p \leq 0.05$), suggesting that the direct addition of the spray-dried powder led to a lower decrease of the spreadability factor. These results indicate the influence of the presence of lactose on the viscosity and rheological behavior of such formulations. In the method 1, the presence of

redispersed powders, before neutralization with triethanolamine, may have interfered in the formation of the gel network, which is accomplished by the reaction of triethanolamine with the acid groups of the Carbopol Ultrez 10[®]. Meanwhile, in the method 2, the gel was already formed when the powders was incorporated. Thus, it is evident that the gel structure was formed under different circumstances (in the presence or absence of spray dried powders) in each of the proposed methods, and therefore distinct behaviors were observed with respect to the spreadability.

The rheological characterization of pharmaceutical systems helps to understand the characteristics related to stability, filling and removal of packing material, adhesion to the skin and acceptability by the patient (27). The viscosity of non-Newtonian fluids changes according to the applied shear rate and these systems can be classified in three types: plastic, pseudo-plastic and dilatants. The samples analyzed appear to have pseudo-plastic behavior by presenting a decline of viscosity with the increase of the shear rate (Figure 1) (30). This rheological behavior is preferred for dermatological dosage form because the formulation flow resistance is low when it is applied under medium to high shear conditions thus it becomes more fluid when submitted to external pressure and therefore it spreads more easily in the applied region (24). In order to determine the flow model that best describes the rheograms obtained by plotting the applied shear rate as a function of the shear stress, the results of each formulation were analyzed according to four models: Casson, Power Law, Bingham and Herschel-Bulkley. The modeling results are shown in Table 3. All formulations fit better to the Herschel-Bulkley model due to higher values of regression coefficient (r^2). Hydrogels prepared with the spray-dried lactose (HG-L-1 and HG-L-2) showed similar fitting profile. These data suggest that the presence of lactose in hydrogels did not influence the rheological modeling of our formulation. On the other hand, Terroso and co-workers (2009) showed that hydrogels containing spray-dried Q10 coenzyme-loaded nanocapsules showed a different rheological behavior (Ostwald model) compared to the hydrogel prepared with the original nanocapsule suspension (Herschel-Bulkley model). This lack of concordance can be related to the differences in the Carbopol concentration (0.2 to 0.5 %) and in its type (Carbopol 940[®] and Carbopol Ultrez 10[®]). Previous work showed that Carbopol hydrogels can fit to different rheological models, depending on the type of acid acrylic polymer (Carbopol 940[®] or Carbopol Ultrez 10[®]) and its concentration (16, 23, 24). However, our research group has reported that Carbopol Ultrez 10[®] hydrogels at 0.5% containing polymeric nanoparticles or lipid nanoemulsion usually shows a non-Newtonian pseudoplastic behavior according to the Herschel-Bulkley model (6, 31, 32).

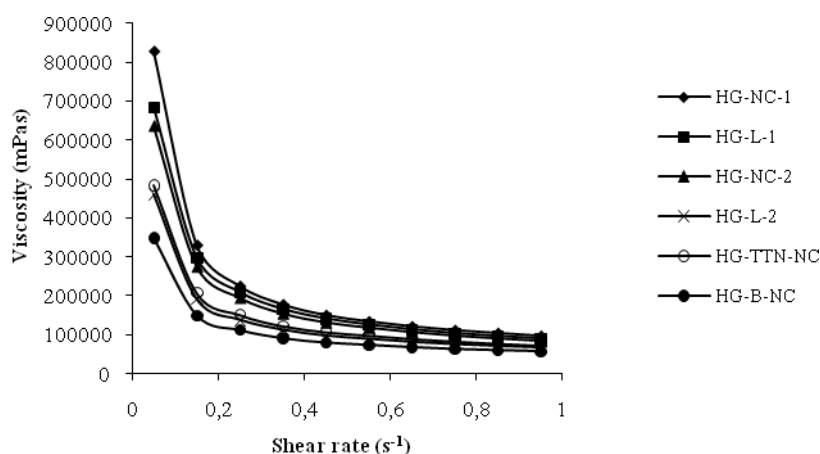


FIGURE 1 Graphical representation of viscosity (mPa.s) of hydrogels prepared by methods 1 and 2 using spray-dried powders containing TTN-loaded lipid-core nanocapsules or spray-dried lactose (HG-NC-1, HG-NC-2, HG-L-1 and HG-L-2, respectively) and HG prepared with TTN-loaded lipid-core nanocapsules and blank lipid-core nanocapsules (HG-TTN-NC and HG-B-NC, respectively) as a function of the shear rate (s^{-1}).

TABELA 3 Regression coefficient (r^2) obtained in the mathematical modeling of the hydrogels using four different flow models to describe the shear rate–shear stress curve.

Formulation	Bingham	Casson	Power Law	Herschel-Bulkley
HG-NC-1	0.892 ± 0.084	0.949 ± 0.035	0.905 ± 0.039	0.954 ± 0.065
HG-NC-2	0.963 ± 0.014	0.990 ± 0.001	0.968 ± 0.025	0.999 ± 0.001
HG-TTN-NC	0.932 ± 0.034	0.977 ± 0.027	0.934 ± 0.05	0.981 ± 0.029
HG-B-NC	0.974 ± 0.020	0.988 ± 0.004	0.942 ± 0.022	0.999 ± 0.001

Afterwards, the yield stress (YS), flow (n) and consistency indices (κ) were determined for all formulations, according to the selected model. Results are shown in Table 4. All samples showed flow indices lower than 1, indicating a pseudoplastic behavior and confirming our previous suggestion. The YS is the minimum tension demanded for a material to start flowing. Hydrogels prepared with the spray-dried powder showed higher YS compared to that prepared with the nanocapsule suspensions (ANOVA, $p \leq 0.05$). This result confirmed our previous suggestion that the lower spreadability factors of the formers could be explained by their different viscosity and rheological behavior compared to the latter. Furthermore, the HG-NC-1 and HG-NC-2 had similar YS values compared to the hydrogels prepared with the spray-dried lactose (22 and 17.6 Pa, for HG-L-1 and HG-L-2, respectively),

showing that the addition of lactose to hydrogels demands them more strength to start flowing. Regarding the consistency index, all hydrogels presented similar values (ANOVA, $p > 0.05$), except the formulation prepared with blank nanocapsules, which presented the lowest value. On the other hand, a tendency to a higher consistency index could be observed for those formulations prepared with the spray-dried powders.

TABLE 4 Flow (n) and consistency (κ) indexes and yields stress (YS) of hydrogels prepared using spray-dried powders containing TTN-loaded lipid-core nanocapsules (HG-NC-1 and HG-NC-2), placebo lipid-core nanocapsules (HG-B-NC) and tretinoin-loaded lipid-core nanocapsule (HG-TTN-NC).

Formulation	n *	κ (mPa.s)*	Yield stress* (Pa)
HG-NC-1	0.82 ± 0.11	71298 ± 5969^a	19.0 ± 3.6^a
HG-NC-2	0.57 ± 0.22	65471 ± 4649^a	$17.6 \pm 3.0^{a,b}$
HG-TTN-NC	0.71 ± 0.19	$58180 \pm 4699^{a,b}$	13.9 ± 0.4^b
HG-B-NC	0.83 ± 0.22	43935 ± 10478^b	12.5 ± 0.9^b

Means, in column, with the same letter are not statistically different (Anova, Tukey test, $p \leq 0.05$).

* According to the Herschel–Bulkley model

The feasibility of preparing hydrogels using spray-dried powders containing nanoencapsulated tretinoin could be demonstrated using two technological strategies. The type of strategy did not influence significantly the physicochemical and rheological properties of such hydrogels. However, our previous reports showed that an interesting advantage of using nanoencapsulated tretinoin in hydrogels is the possibility to increase the photostability of the drug (6). The ability of lipid-core nanocapsules to protect tretinoin against UV radiation even after the spray-dried process (after their conversion to a redispersible spray-drier powder) was also previously reported by our group (17). In this way, to demonstrate the potential of using these spray-dried powders as intermediate product to prepare hydrogels without losing the good tretinoin photostability, by means of its nanoencapsulation, a photostability study was carried out. Hydrogels prepared by both methods (HG-NC-1 and HG-NC-2) were evaluated in order to study the influence of the method in this ability of lipid-core nanocapsules. In addition, a photostability study of hydrogels prepared with the original TTN-loaded lipid-core nanocapsules was also carried out.

Figure 2 shows the degradation profile of TTN in the different semisolid formulations. Formulations prepared by both methods (HG-NC-1 and HG-NC-2) showed similar profiles

compared to the formulation prepared with the original suspension (HG-TTN-NC). Our results were also compared to the photodegradation data from a commercial hydroalcoholic gel (HG-C) (6). After 8 hours of exposure to UVA radiation, the percentage of TTN degraded in the HG-NC-1, HG-NC-2, HG-TTN-NC and HG-C was 38.75 ± 0.53 %, 35.51 ± 4.03 %, 32.20 ± 4.89 % and 68.64 ± 2.92 %, respectively. The method of preparation of hydrogels did not influence the ability of lipid-core nanocapsules to protect TTN against UVA radiation (ANOVA, $p > 0.05$). A parallel experiment was carried out using a cuvette containing the same formulations covered by aluminum foil in order to demonstrate that the degradation was a result of the UVA radiation. No decayment of drug content was detected in this last experiment, showing that the degradation was really induced by the UVA radiation.

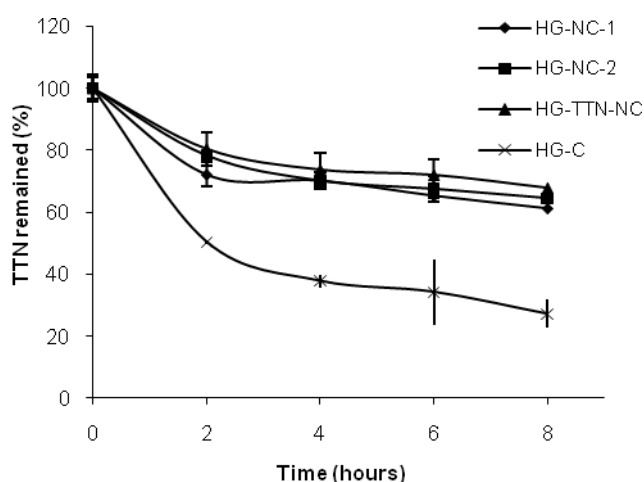


FIGURE 2 Photodegradation profile of hydrogels prepared by methods 1 and 2 using spray-dried powders containing TTN-loaded lipid-core nanocapsules (HG-NC-1 and HG-NC-2, respectively), hydrogels prepared using TTN-loaded lipid-core nanocapsules and commercial hydroalcoholic gel containing free TTN (HG-C), exposed to UVA light for 8 hours. Concentration of TTN remaining *versus* time.

Photodegradation profiles of all formulations prepared using spray-dried powders as intermediate product or the original lipid-core nanocapsule suspensions fit better to the second order kinetic model (highest coefficient of correlation plotting the inverse of TTN concentration as a function of time). The half-life values were calculated according to this model and are showed in Table 5. The half-life time of tretinoin after the UVA exposition of hydrogels prepared with the spray-dried powders showed similar values (19.7 ± 0.2 hours and 19.5 ± 0.3 for HG-NC-1 and HG-NC-2) compared to the formulation prepared with the

original formulation (20.7 ± 1.4 hours), regardless of the method (ANOVA, $p > 0.05$). The results showed that the use of these powders instead of the original suspensions does not alter the formulation photostability. Furthermore, it is evident that the proposed formulations have better photostability than the commercial gel (ANOVA, $p \leq 0.05$) (6). An increase of the bioavailability and residence time of the drug on the skin could be suggested after cutaneous administration of such formulations due to the higher photostability.

TABLE 5 Half-life time and percentage (%) of photodegradation of TTN in hydrogels prepared with the spray-dried powders (HG-NC-1 and HG-NC-2), lipid-core nanocapsule suspension (HG-TTN-NC) and the marketed hydrogel (HG-C).

	HG-NC-1	HG-NC-2	HG-TTN-NC	HG-C
$t_{1/2}$ (hours)*	19.7 ± 0.2^a	19.5 ± 0.3^a	20.7 ± 1.4^a	3.80 ± 0.4^b
% Photodegradation	38.7 ± 0.5^a	35.5 ± 4.0^a	32.2 ± 4.9^a	68.6 ± 2.9^b

* calculated according to the second order kinetic

Means, in line, with the same letter are not statistically different (Anova, Tukey test, $p \leq 0.05$).

CONCLUSIONS

Hydrogels prepared using spray-dried powder containing tretinoin-loaded lipid-core nanocapsules instead of the original lipid-core nanocapsule suspension presented appropriate characteristics for dermatological use (pH, spreadability and rheology). Both methods of preparation (by addition of the aqueous redispersion or by direct addition of powders) led to a similar behavior. On the other hand, the photostability study proved that the addition of the spray-dried powders in hydrogels did not influence the photoprotective ability of lipid-core nanocapsules, regardless of the approach used to their preparation. From these results, it is evident that both methods of preparation can be efficiently used and that these hydrogels show good performance as dermatological dosage forms containing nanoencapsulated tretinoin.

Acknowledgements: A.F.O. thanks Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) for her fellowship. The authors thank the financial support of CNPq/Brazil, INCT-IF, FAPERGS, PRONEX-FAPERGS/CNPq, SCT-RS and Rede Nanocosméticos CNPq/MCT//Brazil.

REFERENCES

- [1] Rigopoulos, D., Ioannides D., Kalogeromitros, D., and Katsambas, A. (2004) Comparison of topical retinoids in the treatment of acne. *Clin. Dermatol.* 22: 408-411.
- [2] Fischer, G.J., and Voorhess J.J. (1996) Molecular mechanisms of retinoids actions in skin. *FASEB J.* 10: 1002-1013.
- [3] Berger, R., Rizer, R., Barba, A., Wilson, D., Stewart, D., Grossman, R., Nighland, M., and Weiss, J. (2007) Tretinoin gel microspheres 0.04% versus 0.1% in adolescents and adults with mild to moderate acne vulgaris: A 12-week, multicenter, randomized, double-blind, parallel-group, phase IV trial. *Clin. Ther.* 29: 1086-1097.
- [4] Brisaert, M., and Plaizier-Vercammen, J. (2000) Investigation on the photostability of a tretinoin lotion and stabilization with additives. *Int. J. Pharm.* 199: 49 – 57.
- [5] Shah, K.A., Date, A.A., Joshi, M.D., and Patravale, V.B. (2007) Solid lipid nanoparticles (SLN) of tretinoin: Potencial in topical delivery. *Int. J. Pharm.* 345: 163-171.
- [6] Ourique, A.F., Silva, C.B., Beck, R.C.R. (2010) Hydrogel containing tretinoin-loaded nanocapsules for dermatological treatments: development and photostability study 2010b. *A ser submetido.*
- [7] Brisaert, M.G., Everaerts, I., and Plaizier-Vercammen, J.A. (1995) Chemical stability of tretinoin in dermatological preparations. *Pharm. Acta Helv.* 70: 61-166.
- [8] Ioele, G., Cione, E., Risoli, A., Genchi, G., and Ragno, G. (2005) Accelerated photostability study of tretinoin and isotretinoin in liposomes formulations. *Int. J. Pharm.* 293: 251-260.
- [9] Manconi, M., Donatella, V., Sinico, C., Loy, G., and Fadda, A.M. (2003) Niosomes as carriers for tretinoin II. Influence of vesicular incorporation on tretinoin photostability. *Int. J. Pharm.* 260: 261-272.
- [10] Ourique, A.F., Pohlmann, A.R., Guterres, S.S., and Beck, R.C.R. (2008) Tretinoin-loaded nanocapsules: preparation, physicochemical characterization and photostability study. *Int. J. Pharm.* 352: 1-4.
- [11] Fachinetto, J.M., Ourique, A.F., Lubini, G., Tedesco, S.B., Silva, A.C.F., and Beck, R.C.R. (2008) Tretinoin-loaded polymeric nanocapsules: evaluation of the potential to improve the antiproliferative activities on *Allium cepa* root-tip compared to the free drug. *Lat. Am. J. Pharm.* 27: 668 – 673.
- [12] Ourique, A.F., Lima, S.I., Ferreira, C.V., Silva, C.B., Marchiori, M.C.L., Pohlmann, A.R., Guterres, S.S., and Beck, R.C.R. (2010) Lipid-core nanocapsules as a

- nanomedicine for parenteral administration of tretinoin: development and in vitro antitumor activity on human myeloid leukaemia cells. *J. Biomed. Nanotechnol.* 6: 214-226.
- [13] Vauthier, C., and Bouchemal, K. (2009) Methods for the preparation and manufacture of polymeric nanoparticles. *Pharmaceut. Res.* 26: 1025-1058.
- [14] Jager E., Venturini, C.G., Poletto, F.S., Colomé, L.M., Pohlmann, J.P.U., Bernardi, A., Battastini, A.M.O., Guterres, S.S., and Pohlmann, A.R. (2009) Sustained release from lipid-core nanocapsules by varying the core viscosity and the particle surface area. *J. Biomed. Nanotechnol.* 5: 130-144.
- [15] Marchiori, M.C.L., Lubini, G., Dalla Nora, G., Friedrich, R.B., Fontana, M.C., Ourique, A.F., Bastos, M.O., Rigo, L.A., Silva, C.B., Tedesco, S.B., and Beck, R.C.R. (2010) Hydrogel containing dexamethasone-loaded nanocapsules for cutaneous administration: preparation, characterization and in vitro drug release study. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 36: 962-971.
- [16] Paese, K., Jäger, A., Poletto, F.S., Fonseca, E.P., Rossi-Bergmann, B., Pohlmann, A.R., and Guterres, S.S. (2009) Semisolid Formulation Containing a Nanoencapsulated Sunscreen: Effectiveness, *In Vitro* Photostability and Immune Response. *J. Biomed. Nanotechnol.* 5: 240–246.
- [17] Marchiori, M.C.L., Ourique, A.F., Silva, C.B., Pohlmann, A.R., Guterres, S.S., and Beck, R.C.R. (2010) Spray-dried powders containing tretinoin-loaded engineered nanoparticles: development and photostability study. *J. Photoch. Photobio. B. A ser submetido.*
- [18] Jiménez, M.M., Pelletier, J., Bobin, M.F., and Martini, M.C. (2004) Influence of encapsulation on the in vitro percutaneous absorption of octyl methoxycinnamate. *Int. J. Pharm.* 272: 45-55.
- [19] Alves, M.P., Scarrone, A.L., Santos, M., Pohlmann, A.R., and Guterres, S.S. (2007) Human skin penetration and distribution of nimesulide from hydrophilic gels containing nanocarriers. *Int. J. Pharm.* 341: 215-220.
- [20] Guterres, S.S., Alves, M.P., and Pohlmann, A.R. (2007) Polymeric nanoparticles, nanospheres and nanocapsules, for cutaneous applications. *Drug Target Insights* 2:147-157.

- [21] Lademann, J., Richter, H., Teichmann, A., Otberg, N., Blume-Peytave, U., Luengo, J., Weib, B., Scafefer, U.F., Lehr, C.M., Wepf, R., and Sterry, W. (2007) Nanoparticle – An efficient carrier of drug delivery into the hair follicles. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 66:150-164.
- [22] Luengo, J., Weiss, B., Schneider, M., Ehlers, A., Stracke, F., König, K., Kostka, K.H., Lehr, C.M., and Schaefer, U.F. (2006) Influence of nanoencapsulation on human skin transport of flufenamic acid. *Skin Pharmacol. Physiol.* 19: 190–197.
- [23] Milão, D., Knorst, M., Richter, W., and Guterres, S.S. (2003) Hydrophilic gel containing nanocapsules of diclofenac: development, stability study and physico-chemical characterization. *Pharmazie.* 58: 325-329.
- [24] Alves, M.P., Pohlmann, A.R., and Guterres, S.S. (2005) Semisolid topical formulations containing nimesulide-loaded nanocapsules, nanospheres or nanoemulsion: development and rheological characterization. *Pharmazie.* 60: 900-904.
- [25] Terroso, T., Kulkamp, I.C., Jornada, D.S., Pohlmann, A.R., and Guterres, S.S. (2009) Development of semi-solid cosmetic formulations containing coenzyme Q10-loaded nanocapsules. *Lat. Am. J. Pharm.* 26: 819-826.
- [26] Kim, J., Song, J., Lee, E., and Park, S. (2003) Rheological properties and microstructures of Carbopol gel network system. *Colloid. Polym. Sci.* 281: 614 – 623.
- [27] Borghetti, G.S., and Knorst, M.T. (2006) Desenvolvimento e avaliação da estabilidade física de loções O/A contendo filtros solares. *Rev. Bras. Cienc. Farm.* 42: 531–537.
- [28] Milan, A.L.K., Milão, D., Souto, A.A., and Corte, T.W.F. (2007) Estudo da hidratação da pele por emulsões cosméticas para xerose e sua estabilidade por reologia. *Rev. Bras. Cienc. Farm.* 43: 649–657.
- [29] Garg, A., Aggarwal, D., Garg, S., and Singla, A. (2002) Spreading of semisolid formulations. *Pharm. Technol.* 26: 84-105.
- [30] Lee, C.H., Moturi, V., and Lee, Y. (2009). Thixotropic property in pharmaceutical formulations. *J. Control. Release* 136: 88 – 98.
- [31] Fontana, M.C., Coradini, K., Pohlmann, A.R., Guterres, S.S., and Beck, R.C.R. (2010) Nanocapsules prepared from amorphous polyesters: effect on the physicochemical characteristics, drug release and photostability. *J. Nanosc. Nanotechnol.* A ser submetido.
- [32] Almeida, J.S., Coradini, K., Benvenegnú, D.M., Bouffleur, N., Reckziegel, P., Barcelos, R.C.S., de Carvalho, L.M., Bürger, M.E., and Beck, R.C.R. (2010) Hydrogels

containing rutin intended to cutaneous administration: development, rheological characterization and *in vivo* wound healing. *Soft Materials. A ser submetido.*

DISCUSSÃO GERAL

A pesquisa e o desenvolvimento de sistemas nanocarreadores de fármacos têm apresentado um considerável aumento nos últimos anos. Em especial, as nanocápsulas poliméricas demonstraram uma grande capacidade de encapsular diversos tipos de substâncias ativas lipofílicas, conferindo inúmeras vantagens relacionadas com o aumento da eficácia (FACHINETTO *et al.*, 2008; BERNARDI *et al.*, 2009; MARCHIORI *et al.*, 2010), redução dos efeitos colaterais, segurança (PAESE *et al.*, 2009, CASTRO *et al.*, 2009), aumento da estabilidade e melhora das características físico-químicas dos fármacos associados (OURIQUE *et al.*, 2008; ALMEIDA *et al.*, 2009; KÜLKAMP *et al.*, 2009; ALMEIDA *et al.*, 2010; OURIQUE *et al.*, 2010a). Recentemente, nosso grupo de pesquisa realizou um estudo, onde foi demonstrado aumento na fotoestabilidade e na solubilidade aquosa da tretinoína associada a nanocápsulas poliméricas (OURIQUE *et al.*, 2008). Com o intuito de aumentar a estabilidade físico-química desta formulação, foi proposta a preparação de nanocápsulas de núcleo lipídico, compostas por um núcleo central formado pela mistura de lipídio líquido (triglicerídeos de cadeia média) e lipídio sólido (monoestearato de sorbitano) à temperatura ambiente. Esta formulação apresentou uma maior estabilidade físico-química frente ao armazenamento quando comparada à formulação de nanocápsulas convencionais (OURIQUE *et al.*, 2008; OURIQUE *et al.*, 2010a). Com base nesta formulação, foi proposta a conversão da suspensão coloidal de nanocápsulas de núcleo lipídico contendo tretinoína, em material pulverulento, através da técnica de secagem por aspersão, utilizando lactose como adjuvante de secagem. A principal hipótese desta etapa do trabalho foi avaliar a habilidade das nanocápsulas de núcleo lipídico em proteger a tretinoína contra a fotodegradação, mesmo após a sua conversão em sistemas pulverulentos derivados.

Em geral, as nanopartículas poliméricas são incorporadas em formulações dermatológicas na forma de suspensão coloidal aquosa, como sendo um líquido de entumescimento do polímero formador de gel ou um constituinte aquoso de uma emulsão (MILÃO *et al.*, 2003; ALVES *et al.*, 2005; MARCHIORI *et al.*, 2010). Em alguns casos a adição de um grande volume da suspensão aquosa é necessária para o ajuste da concentração final do semissólido. Desse modo, a conversão das nanocápsulas em uma forma intermediária sólida, representaria uma alternativa de incorporação de sistemas nanoestruturados em formas farmacêuticas finais, como os hidrogéis. Essa conversão foi anteriormente proposta por

Terroso e colaboradores (2010), na preparação de hidrogéis contendo coenzima Q10 nanoencapsulada. Entretanto, a aplicabilidade desta estratégia a substâncias fotossensíveis e que apresentem um aumento na sua fotoestabilidade pela nanoencapsulação, ainda não foi explorada na literatura científica (TERROSO *et al.*, 2010).

No capítulo 1, foi descrita a obtenção de tretinoína associada a nanocápsulas de núcleo lipídico, através da técnica de deposição interfacial de polímero pré-formado (FESSI *et al.*, 1988). Durante a etapa de preparação foi adicionado, na fase orgânica, um antioxidante lipofílico, o butilhidroxitolueno (BHT), com a função de proteger a tretinoína de processos oxidativos que poderiam ocorrer durante a posterior secagem por aspersão. Além disso, este excipiente não poderia ser adicionado na etapa de preparação dos hidrogéis, devido ao seu caráter hidrofóbico, justificando, dessa maneira, a presença do BHT na formulação de nanocápsulas. A eficiência de incorporação da tretinoína nas nanocápsulas de núcleo lipídico foi maior que 99%, estando de acordo com a literatura (OURIQUE *et al.*, 2008; OURIQUE *et al.*, 2010a) e indicando que a presença do BHT não prejudicou a encapsulação do fármaco.

Para avaliar a influência da parede polimérica das nanocápsulas nas características do pó, foi preparada uma formulação omitindo-se a presença da poli(ϵ -caprolactona), obtendo-se, portanto, uma nanoemulsão. As nanocápsulas de núcleo lipídico e nanoemulsões foram caracterizadas quanto ao tamanho médio de partículas, índice de polidispersão, pH e potencial zeta. Após o preparo, ambas as formulações apresentaram adequado tamanho de partícula (em torno de 200 nm), pH em torno de 6,0, potencial zeta negativo e o índice de polidispersão inferior a 0,25. Os valores encontrados estão de acordo com aqueles normalmente relatados para as nanocápsulas e nanoemulsões preparadas pela mesma técnica (FRIEDRICH *et al.*, 2008; OURIQUE *et al.*, 2008; ALMEIDA *et al.*, 2009; OURIQUE *et al.*, 2010a).

O comportamento da mistura física entre lactose e as suspensões coloidais (nanocápsulas de núcleo lipídico e nanoemulsões), antes da submissão ao processo de secagem por aspersão, é uma etapa importante para compreender as características dos pós resultantes. A análise reológica das suspensões coloidais, acrescidas ou não de lactose, foi realizada para elucidarmos a possível interação entre o excipiente e as nanopartículas. Como resultado, foi observado um comportamento não-Newtoniano para todas as amostras, e um discreto aumento na viscosidade das suspensões após a adição de 10% de lactose. Desta forma, pode-se dizer que não foram observadas interações físico-químicas consideráveis entre os componentes desta mistura. Este resultado corrobora o estudo realizado por Tewa-Tagne e colaboradores em 2006, no qual foi demonstrado que as interações que ocorrem dependem da proporção entre o adjuvante de secagem (dióxido de silício coloidal) e as nanocápsulas.

Os pós obtidos foram caracterizados quanto ao rendimento do processo, eficiência de encapsulação, análise morfológica e perfil de fotoestabilidade do fármaco. A escolha de um excipiente hidrossolúvel, como a lactose, se deve à facilidade de redispersão destes pós e, conseqüentemente, à reconstituição dos sistemas nanoestruturados, o que é fundamental para alcançar os benefícios destes carreadores farmacêuticos (TEWA-TAGNE *et al.*, 2007a; KHO e HADINOTO, 2010). Considerando o rendimento do processo, não foram observadas diferenças estatísticas entre os pós contendo nanocápsulas de núcleo lipídico ou nanoemulsões (ANOVA, $p > 0,05$). Resultados similares foram observados para os pós obtidos a partir da secagem por aspersão de uma dispersão de lactose em água. Desse modo, foi evidenciado que a presença do polímero na constituição das nanopartículas não exerceu influência sobre o rendimento do processo de secagem. Quanto à eficiência de encapsulação, a presença da parede polimérica representou um efeito positivo, já que o pó contendo tretinoína associada às nanocápsulas de núcleo lipídico demonstrou uma maior eficiência de encapsulação do fármaco ($94,22 \pm 2,01$ %) quando comparado ao pó contendo tretinoína associada à nanoemulsão ($88,74 \pm 0,65$ %). Isso pode ser explicado pela tendência das gotículas de óleo em se aderir às paredes do equipamento, sugerindo uma perda seletiva de fármaco. Para assegurar que a perda não ocorreu por degradação durante o aquecimento na torre de secagem, uma dispersão aquosa de tretinoína, estabilizada pelos mesmos tensoativos que compõem a nanocápsula e a nanoemulsão, foi seca sob idênticas condições experimentais. Neste caso, a eficiência de encapsulação foi de 95 %, confirmando a hipótese de que a perda de tretinoína durante a secagem é devida à adesão das gotículas da nanoemulsão nas paredes do equipamento. A microscopia eletrônica de varredura mostrou que os pós preparados com nanocápsulas de núcleo lipídico apresentaram superfície lisa e partículas em tamanho menor que aquelas contendo nanoemulsões. Além disso, não foram observadas estruturas nanométricas na superfície dos pós, sugerindo que estas encontram-se no interior das partículas de lactose. Estes dados estão de acordo com relato prévio na literatura, no qual as nanopartículas não foram visualizadas na superfície de micropartículas de lactose (TEWA-TAGNE *et al.*, 2007a). Assim, pode-se sugerir que quando o adjuvante fica disperso, ou seja, não está solubilizado na suspensão aquosa de nanopartículas, como é o caso do dióxido de silício coloidal, as nanoestruturas tendem a se depositar sobre a superfície do adjuvante (MULLER *et al.*, 2000; BECK *et al.*, 2004; BECK *et al.*, 2006; BECK *et al.*, 2007). Entretanto, quando o adjuvante está solúvel, como é o caso da lactose, ele seca juntamente com as nanoestruturas e formam os microaglomerados com organização estrutural aleatória (TEWA-TAGNE *et al.*, 2007a; GUTERRES *et al.*, 2009).

A recuperação dos sistemas nanoestruturados, após a redispersão aquosa dos pós, teve como objetivo verificar se realmente não ocorriam alterações estruturais nas partículas nanométricas. Os resultados indicaram eficiente recuperação tanto das nanocápsulas de núcleo lipídico como das nanoemulsões (formulação controle). Entretanto, as nanoemulsões apresentaram um índice de polidispersão maior do que o das nanocápsulas de núcleo lipídico.

A obtenção de pós secos por aspersão, a partir de nanocápsulas de núcleo lipídico ou nanoemulsões, apresentou desempenho relativamente similar em aspectos como, rendimento do processo e recuperação das nanoestruturas após a redispersão aquosa dos sistemas pulverulentos. Entretanto, os pós preparados com tretinoína associada a nanocápsulas de núcleo lipídico apresentaram maior eficiência de encapsulação do fármaco e índice de polidispersão mais baixo após a redispersão aquosa dos pós. Desse modo, pode ser observado que a presença da poli(ϵ -caprolactona) na constituição das nanoestruturas exerceu uma influência positiva no desenvolvimento de pós secos por aspersão. Por este motivo, o pó contendo nanocápsulas de núcleo lipídico foi selecionado para prosseguir com o estudo de fotoestabilidade.

Finalizando o capítulo 1, experimentos de fotodegradação do fármaco frente à radiação ultravioleta (UVA) foram realizados. A suspensão aquosa original de nanocápsulas de núcleo lipídico protegeu efetivamente a tretinoína da degradação frente à radiação UVA (tempo de meia vida = 118 minutos). Neste caso, o tempo de meia-vida foi quase 3 (três) vezes maior do que aquele demonstrado pelo fármaco solubilizado em metanol (40 minutos), sob as mesmas condições experimentais. Dados similares foram obtidos para as nanocápsulas de núcleo lipídico, secas por aspersão, reconstituídas em água (tempo de meia vida = 118 minutos), mostrando que, após o processo de secagem, o sistema nanoestruturado ainda permanece com a capacidade de conferir fotoproteção à tretinoína, sugerindo que não ocorrem significativas alterações na sua organização supramolecular. O BHT não influenciou a fotoestabilidade da tretinoína nanoencapsulada, pois a formulação de nanocápsulas de núcleo lipídico proposta por Ourique e colaboradores (sem BHT em sua composição) demonstrou tempo de meia-vida de 124 ± 21 minutos, comportamento semelhante ao das nanocápsulas de núcleo lipídico desenvolvidas neste trabalho (OURIQUE *et al.*, 2010a).

Ao final deste capítulo, concluímos que o método proposto, bem como suas condições experimentais, é adequado para a secagem de nanocápsulas de núcleo lipídico contendo tretinoína. Após o processo de secagem por aspersão, as nanocápsulas de núcleo lipídico puderam ser recuperadas através da redispersão aquosa do pó, e ainda, conseguiram proteger o fármaco da degradação frente à radiação UVA, demonstrando que o processo pode ser uma

importante estratégia para conversão de substâncias fotolábeis associadas a nanocápsulas poliméricas, em produtos secos.

No capítulo 2 deste trabalho, os pós contendo a tretinoína associada a nanocápsulas de núcleo lipídico foram empregados como produtos intermediários na preparação de formas semisólidas, através de duas técnicas. Na primeira, o pó foi previamente disperso em água, e esta dispersão foi empregada como líquido de entumescimento do Carbopol Ultrez 10[®] (HG-NC-1). No segundo método, o pó foi adicionado no hidrogel previamente preparado (HG-NC-2). Baseado nestes mesmos critérios foram preparados hidrogéis contendo lactose seca por aspersão (HG-L-1 e HG-L-2). Além disso, para fins comparativos, foram preparados hidrogéis a partir da suspensão aquosa de nanocápsulas de núcleo lipídico brancas e associadas ao fármaco (HG-B-NC e HG-TTN-NC). A caracterização dos hidrogéis foi realizada através da análise do aspecto, teor, medida do pH, espalhabilidade, análise reológica e potencial de fotoproteção do sistema nanoestruturado incorporado nos hidrogéis. Logo após a preparação, o teor das formulações foi próximo ao valor teórico (0,5 mg/g) e as características visuais dos hidrogéis que continham o fármaco foram semelhantes, apresentando aspecto homogêneo, brilhante e coloração amarela clara. Os hidrogéis preparados com lactose nebulizada ou suspensão de nanocápsulas de núcleo lipídico brancas diferiram dos anteriores apenas pela coloração branca. No final da manipulação, foram obtidos hidrogéis com valor de pH adequado para aplicação cutânea (em torno de 6).

A espalhabilidade das amostras foi determinada através do método das placas paralelas e representada em termos de fator de espalhabilidade (BORGHETTI e KNORST, 2006). Os hidrogéis preparados com os pós, redispersos ou não, apresentaram os menores fatores de espalhabilidade ($1,61 \pm 0,13 \text{ mm}^2/\text{g}$, $2,17 \pm 0,05 \text{ mm}^2/\text{g}$, $1,58 \text{ mm}^2/\text{g}$ e $2,39 \text{ mm}^2/\text{g}$ para HG-NC-1, HG-NC-2, HG-L-1 e HG-L-2, respectivamente), indicando que a presença da lactose conduziu a um acréscimo na viscosidade, levando a uma menor espalhabilidade. Considerando as duas estratégias de preparação, os hidrogéis obtidos pela segunda técnica (HG-NC-2 e HG-L-2) apresentaram fatores de espalhabilidade maiores (ANOVA, $p \leq 0,05$) do que aqueles apresentados pelos hidrogéis preparados pelo método 1 (HG-NC-1 e HG-L-1). Neste método, a presença do pó redisperso, antes da neutralização com a trietanolamina, pode ter interferido na formação da rede do gel, a qual se efetua através da reação da trietanolamina com os grupamentos ácidos do Carbopol Ultrez 10[®]. Enquanto isso, no método 2, o gel já estava formado quando o pó foi incorporado. Dessa maneira, fica evidenciado que a estrutura do gel se formou em circunstâncias diferentes (em presença ou ausência do pó), em cada um

dos métodos propostos, e por isso foram observados comportamentos distintos relacionados com a espalhabilidade.

Quanto à reologia, as formulações foram caracterizadas como tendo comportamento pseudo-plástico, ajustado ao modelo de Herschel-Bulkley. Resultados similares têm sido relatados por nosso grupo de pesquisa (FONTANA, 2009; ALMEIDA, 2010) e também em trabalhos previamente publicados (ALVES *et al.*, 2005; PAESE *et al.*, 2009; OURIQUE *et al.*, 2010b). Com base na modelagem matemática, foi realizada a determinação do índice de fluxo, índice de consistência e valor de rendimento. O índice de fluxo foi menor que 1 para todas as amostras analisadas, o que significa que houve um comportamento pseudo-plástico, reafirmando nossa prévia sugestão. Considerando o índice de consistência, não foi observada diferença estatística entre os hidrogéis (ANOVA, $p > 0,05$), exceto para aquele preparado com a suspensão de nanocápsulas de núcleo lipídico brancas. Apesar disso, as formulações preparadas com os pós, por ambos os métodos, (HG-NC-1, HG-L-1, HG-NC-2 e HG-L-2) demonstraram uma tendência de ser mais consistentes (considerando apenas os valores médios obtidos para o índice de consistência), se comparadas com as formulações preparadas a partir das suspensões coloidais (HG-TTN-NC e HG-B-NC). O comportamento pseudo-plástico é caracterizado pela existência de um valor de rendimento, o qual deve ser excedido para que o material comece a fluir ou a deformar (CHHABRA e RICHARDSON, 2008). Sendo assim, o valor de rendimento (ou taxa de cedência) pode ser conceituado como a tensão mínima requerida para que um material comece a fluir. Os hidrogéis preparados através do método 1 apresentaram os mais altos valores de rendimento, juntamente com os preparados pelo método 2. Entretanto, as formulações preparadas pela segunda estratégia, também são estatisticamente semelhantes aos hidrogéis preparados com as suspensões aquosas, os quais tendem a um menor valor de rendimento. Desse modo, os maiores valores de rendimento podem ser correlacionados com os fatores de espalhabilidade mais baixos, como foi o caso dos HG-NC-1 e HG-L-1.

A tretinoína tem como importante característica a fotoinstabilidade. Desse modo, o desenvolvimento de estratégias que incrementem a sua estabilidade representa uma promissora alternativa, principalmente no que diz respeito à aplicação tópica. Os experimentos de fotodegradação foram realizados com o objetivo de avaliar a habilidade das nanocápsulas de núcleo lipídico em proteger a tretinoína da radiação UVA, após serem incorporadas nos hidrogéis sob forma sólida, considerando as duas abordagens de preparação. Um hidrogel preparado a partir da suspensão coloidal foi empregado como formulação controle. A fotodegradação foi descrita em termos de cinética de degradação e tempo de meia-

vida. Os hidrogéis obedeceram a uma cinética de degradação de segunda ordem (maior coeficiente de correlação plotando o inverso da concentração de tretinoína em função do tempo) e com base neste modelo foi calculado o tempo de meia-vida. As formulações preparadas com os pós apresentaram tempos de meia-vida similares ($19,7 \pm 0,2$ horas e $19,5 \pm 0,3$ horas, para HG-NC-1 e HG-NC-2, respectivamente), independente do método de preparação. O hidrogel controle também demonstrou o mesmo comportamento ($20,7 \pm 1,4$ horas), o que indica que a incorporação de nanocápsulas de núcleo lipídico, previamente secas por aspersão, não causa prejuízos relacionados à fotoestabilidade. Por outro lado, o potencial de prevenção da fotodegradação de um gel comercial (contendo tretinoína livre), quando comparado com as formulações em estudo, mostrou desempenho bem menos eficiente (tempo de meia-vida de $3,80 \pm 0,4$ horas) (OURIQUE *et al.*, 2010b).

Estes resultados demonstraram a viabilidade de obtenção de sistemas sólidos contendo tretinoína associada a nanocápsulas de núcleo lipídico, através da técnica de secagem por aspersão, utilizando lactose como adjuvante de secagem. Esta forma sólida intermediária foi eficientemente incorporada em formulações dermatológicas e permitiu a preparação de hidrogéis sem a necessidade de adição de co-solventes orgânicos e com adequadas características reológicas e de fotoestabilidade. Além disso, foi possível executar duas técnicas de preparação dos hidrogéis, as quais apresentaram como única diferença o fator de espalhabilidade entre as formulações preparadas.

CONCLUSÕES

- Foram desenvolvidas nanocápsulas de núcleo lipídico associadas à tretinoína, contendo butilhidroxitolueno como excipiente antioxidante. Esta formulação apresentou características físico-químicas compatíveis com os sistemas nanométricos e conferiu maior fotoestabilidade ao fármaco;
- Foi possível empregar a secagem por aspersão para obtenção de pós contendo tretinoína associada a nanocápsulas de núcleo lipídico. Os sistemas nanoestruturados puderam ser facilmente reconstituídos através da redispersão aquosa destes pós;
- O processo de conversão das suspensões de nanocápsulas de núcleo lipídico em formas sólidas, não alterou a habilidade destas formulações em proteger a tretinoína da degradação frente à radiação UVA;
- As formas sólidas obtidas através da secagem por aspersão foram utilizadas como produtos intermediários na preparação de hidrogéis destinados a aplicação cutânea, empregando-se duas técnicas distintas de incorporação: através da prévia redispersão aquosa dos pós ou através da adição direta dos pós ao semissólido previamente preparado;
- Os hidrogéis preparados pelas duas técnicas apresentaram características reológicas e físico-químicas semelhantes. A única diferença observada está relacionada com a espalhabilidade das preparações. Todas as formulações apresentaram características compatíveis com a aplicação cutânea;
- O emprego dos pós secos por aspersão como produtos intermediários para a preparação de hidrogéis, não alterou a habilidade das nanocápsulas de núcleo lipídico em proteger a tretinoína frente a radiação UVA, nos semissólidos, demonstrando que tanto o processo de secagem, quanto a posterior incorporação nas formulações dermatológicas, mostraram-se promissores no desenvolvimento de nanomedicamentos contendo substâncias fotolábeis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

ALMEIDA, J. S. Formulações nanoestruturadas contendo rutina: Desenvolvimento, atividade anti-oxidante in vitro e efeito sobre a cicatrização cutânea. 2010. 139f. (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.

ALONSO, M. J. Nanomedicines for overcoming biological barriers. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 58, p. 168-172, 2004.

ALVAREZ-ROMAN, 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**, n. 60, p. 900-904, 2005.

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

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

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

BECK, R. C. R.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Nanoparticle-coated microparticles: preparation and characterization. **Journal of Microencapsulation**, v. 21, p. 499-512, 2004.

BECK, R. C. R.; POHLMANN, A. R.; BENVENUTTI, E. V.; DALLA COSTA, T.; GUTERRES, S. S. Nanostructure-coated diclofenac-loaded microparticles: preparation,

morphological characterization, *in vitro* release and *in vivo* gastrointestinal tolerance. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 6A, p. 1233-1240, 2005.

BECK, R. C. R.; HASS, S. E.; GUTERRES, S. S.; RÉ, M. I.; BENVENUTTI, E. V.; POHLMANN, A.R. Nanoparticle-coated organic-inorganic microparticles: Experimental design and gastrointestinal tolerance evaluation. **Química Nova**, v. 29, n. 5, p. 990-996, 2006.

BECK, R. C. R.; POHLMANN, A. R.; HOFFMEISTER, C.; GALLAS, M. R.; COLLNOT, E.; SCHAEFER, U. F.; GUTERRES, S. S.; LEHR, C. M. Dexamethasone-loaded nanoparticle-coated microparticles: correlation between *in vitro* drug release and drug transport across caco-2 cell monolayers. **European Journal of Pharmaceutics and Bioharmaceutics**, v. 67, p. 18-30, 2007.

BECK, R. C. R.; LIONZO, M. I. Z.; COSTA, T. M. H.; BEMVENUTTI, E. V.; RÉ, M. I.; GALLAS, M. R.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Surface morphology of spray-dried nanoparticles-coated microparticles designed as an oral drug delivery system. **Brazilian Journal of chemical engineering**, v. 25, n. 2, p. 389-398, 2008.

BERNARDI, A.; BRAGANHOL, E.; JÄGER, E.; FIGUEIRÓ, R.; EDELWEISS, M. I.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S.; BATTASTINI, A. M. O. Indomethacin-loaded nanocapsules treatment reduces *in vivo* glioblastoma growth in a rat glioma model. **Cancer Letters**, v. 281, n. 1, p. 53-63, 2009.

BERGER, R.; RIZER, R.; BARBA, A.; WILSON, D.; STEWART, D.; GROSSMAN, R.; NIGHLAND, M.; WEISS, J. Tretinoin gel microspheres 0.04% versus 0.1% in adolescents and adults with mild to moderate acne vulgaris: A 12-week, multicenter, randomized, double-blind, parallel-group, phase IV trial. **Clinical Therapeutics**, v. 29, p. 1086 – 1097, 2007.

BERSHAD, S. Developments in Topical Retinoid Therapy for Acne. **Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery**, v. 20, n. 3, p. 154-161, 2001.

BORGHETTI, G. S.; KNORST, M. T. Desenvolvimento e avaliação da estabilidade física de loções O/A contendo filtros solares. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêutica**, v. 42, p. 531–537, 2006.

BRISAERT, M.; 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.

BRISAERT, M. G.; MATTHIS, V.; PLAIZIER-VERCAMMEN, J. Liposomes with tretinoin: a physical and chemical evaluation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 26, p. 909-917, 2001.

CASTRO, G. A.; COELHO, A. L. L. R.; OLIVEIRA, C. A.; MAHECHA, A. B.; ORÉFICE, R. L.; FERREIRA, L. A. M. Formation of ion pairing as an alternative to improve encapsulation and stability and to reduce skin irritation of retinoic acid loaded in solid lipid nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 381, p. 77-83, 2009.

CHHABRA, R. P.; RICHARDSON, J. F. (Eds.). **Non-newtonian flow and applied rheology: engineering applications**. 2^a ed. Boston: BH/Elsevier. 2008.

CROSERA, M.; BOVENZI, M.; MAINA, G.; ADAMI, G.; ZANETTE, C.; FLORIO, C.; LARESE, F. F. Nanoparticle dermal absorption and toxicity: a review of the literature. **International Archives of Occupational Environmental Health**, v. 82, p. 1043-1055, 2009.

DAS, S.; GHORAMI, R. C.; CHATTERJEE, T.; BANERJEE, G. Comparative assessment of topical steroids, topical tretinoin (0.05%) and dithranol paste in alopecia areata. **Indian Journal of Dermatology**, v. 55, p. 148-9, 2010.

DEVALAPALLY, H.; CHAKILAM, A.; AMIJI, M. M. Role of nanotechnology in pharmaceutical product development. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 96, n.10, p.2547-2564, 2007.

DOMINGUES, G. S.; GUTERRES, S. S.; BECK, R. C. R.; POHLMANN, A. R. Micropartículas nanorrevestidas contendo um fármaco modelo hidrofóbico: preparação em etapa única e caracterização biofarmacêutica. **Química Nova**, v. 31, n. 8, 1966-1972, 2008.

ELBAUM, D. J. Comparison of the stability of topical isotretinoin and topical tretinoin and their efficacy in acne. **Journal of the American Academy of Dermatology**. v. 19, p. 486-491, 1988.

FACHINETTO, J. M.; OURIQUE, A. F.; LUBINI, G.; TEDESCO, S. B.; SILVA, A. C. F.; BECK, R. C. R. Tretinoin-loaded polymeric nanocapsules: evaluation of the potential to improve the antiproliferative activities on *Allium cepa* root-tip compared to the free drug. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 27, p. 668 – 673, 2008.

FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J. P. Procède de préparation des systèmes colloïdaux d'une substance sous forme de nanocapsules. **European Patent**, 0274961 A1, 1988.

FISCHER G. J.; VOORHESS J. J. Molecular mechanisms of retinoids actions in skin, **FASEB Journal**, v. 10, p. 1002-1013, 1996.

FONTANA, M. C.; CORADINI, K.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R.; BECK, R. C. R. Nanoencapsulation as a way to control the release and to increase the photostability of clobetasol propionate: Influence of the nanostructured system. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, n. 5, p. 254–263, 2009.

FONTANA, M.C. Nanopartículas contendo propionato de clobetasol: preparação, caracterização e incorporação em hidrogéis. 2009. 148f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2009.

FONTANA, M. C.; CORADINI, K.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R.; BECK, R. C. R. Nanocapsules prepared from amorphous polyesters: Effect on the physicochemical characteristics, drug release and photostability. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 10, p. 3091–3099, 2010a.

FRIEDRICH, R. B.; FONTANA, M. C.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S.; BECK, R. C. R. Development and physicochemical characterization of dexamethasone-loaded polymeric nanocapsule suspensions. **Química Nova**, v. 31, p. 1131-1136, 2008.

FRIEDRICH, R. B.; FONTANA, M. C.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S.; BECK, R.C.R. Drying polymeric drug-loaded nanocapsules: the wet granulation process as a promising approach. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 10, p. 616-621, 2010a.

FRIEDRICH, R. B.; BASTOS, M. O.; FONTANA, M. C.; OURIQUE, A. F.; BECK, R.C.R. Tablets containing drug-loaded polymeric nanocapsules: an innovative platform. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, 2010b, *in press*.

GILMAM, A. G.; RALL, T. W.; NIES, A. S.; TAYLOR, P. (Eds.). **Goodman & Gilman As bases farmacológicas da terapêutica**. 11^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2007.

GÓMEZ-GAETE, C.; TSAPIS, N.; BESNARD, M.; BOCHOT, A.; FATTAL, E. Encapsulation of dexamethasone into biodegradable polymeric nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 331, p. 153-159, 2007.

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

GUTERRES, S. S.; BECK, R. C. R.; POHLMANN, A. R. Spray-drying technique to prepare innovative nanoparticulated formulations for drug administration: a brief overview. **Brazilian Journal of Physics**, v. 39, p. 205-209, 2009

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

JAGER, A.; STEFANI V.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN A.R. Physicochemical characterization of nanocapsule polymeric wall using fluorescent benzenoic probes, **International Journal of Pharmaceutics**, v. 338, p. 297-3057, 2007.

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

JEONG, Y. I.; JIN, S. G.; KIM, I. Y.; PEI, J.; WEN, M.; JUNG, T. Y.; MOON, K. S.; JUNG, S. Doxorubicin-incorporated nanoparticles composed of poly(ethylene glycol)-grafted carboxymethyl chitosan and antitumor activity against glioma cells in vitro. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 79, p. 149-145, 2010.

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 Pharmaceutical**, v. 272, p. 45-55, 2004.

KHO K.; HADINOTO K. Aqueous re-dispersibility characterization of spray-dried hollow spherical silica nano-aggregates. **Powder Technology**, v. 198, p. 354-363. 2010.

KNORR, F.; LADEMANN, J.; PATZELT, A.; STERRY, W.; PEYTAVI, U. B.; VOGT, A. Follicular transport route – Research progress and future perspectives. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 71, p. 173–180, 2009.

KULKAMP, I. C.; PAESE, K.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Estabilização do ácido lipóico via encapsulação em nanocápsulas poliméricas planejadas para aplicação cutânea. **Química Nova**, v. 32, p. 2078-2084, 2009.

LADEMANN, J.; RICHTER, H.; TEICHMANN, A.; OTBERG, N.; BLUME-PEYTAVE, U.; LUENGO, J.; WEIB, B.; SCAHEFER, U. F.; LEHR, C. M.; WEPF, R.; STERRY, W. Nanoparticle – An efficient carrier of drug delivery into the hair follicles. **European Journal of Pharmaceutics e Biopharmaceutics**. v. 66 p. 150-164, 2007.

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

LIN, H. S.; CHEAN, C. S.; NG, Y. Y.; CHAN, S. Y.; HO, P. C. 2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin increases aqueous solubility and photostability of all-trans-retinoic acid. **Journal of Clinical and Pharmaceutical Therapy**, v. 25, p. 265-269, 2000.

LUENGO, J.; WEISS, B.; SCHNEIDER, M.; EHLERS, A.; STRACKE, K.; KÖNIG, K.; KOSTKAD, K. M.; LEHR, C. M.; SCHAEFER, U. F. Influence of nanoencapsulation on human skin transport of flufenamic acid. **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 19, p. 190–97, 2006.

MANCONI, M.; DONATELLA, V.; SINICO, C.; LOY, G.; FADDA, A. M. Niosomes as carriers for tretinoin II. Influence of vesicular incorporation on tretinoin photostability. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 260, p. 261-272, 2003.

MARCHIORI, M. C. L.; LUBINI, G.; DALLA NORA, G.; FRIEDRICH, R. B.; FONTANA, M. C.; OURIQUE, A. F.; BASTOS, M. O.; RIGO, L. A.; SILVA, C. B.; TEDESCO, S. B.; BECK, R. C. R. Hydrogel containing dexamethasone-loaded nanocapsules for cutaneous administration: preparation, characterization and in vitro drug release study. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 36, p. 962-971, 2010.

MILÃO, D.; KNORST, M.; RICHTER, W.; GUTERRES, S. S. Hydrophilic gel containing nanocapsules of diclofenac: development, stability study and physico-chemical characterization. **Pharmazie**, v. 58, p. 325-329, 2003.

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

MULLER, C. R.; BASSANI, V. L.; POHLMANN, A. R.; MICHALOWSKI, C. B.; PETROVICK, P. R.; GUTERRES, S. S. Preparation and characterization of spray-dried polymeric nanocapsules. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 26, n. 3, p. 343-347, 2000.

MÜLLER, R. H.; MÄDER, K.; GOHLA, S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery – a review of the state of the art. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 50, p. 161-167, 2000.

ORFANOS, C. E.; EHLERT, R.; GOLLNICK, H. The retinoids - a review of their clinical-pharmacology and therapeutic use. **Drugs**, v. 34, p. 459-503, 1987.

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

OURIQUE, A. F.; LIMA, S. I.; FERREIRA, C. V.; SILVA, C. B.; MARCHIORI, M. C. L.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S.; BECK, R. C. R. Lipid-core nanocapsules as a nanomedicine for parenteral administration of tretinoin: development and in vitro antitumor activity on human myeloid leukaemia cells. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 6, p. 214-226, 2010a.

OURIQUE, A. F.; BONA, C. S.; BECK, R. C. R. Hydrogel containing tretinoin-loaded nanocapsules for dermatological treatments: development and photostability study. *A ser submetido*, 2010 b.

PAESE, K.; JAGER, A.; POLETTO F. S.; FONSECA E. P.; 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. 240-246, 2009.

PARDEIKE, J.; HOMMOSS, A.; MÜLLER, R. H. Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 366, p. 170-184, 2009.

POHLMANN A. R.; WEISS, V.; MERTINS, O.; PESCE DA SILVEIRA, N.; GUTERRES, S. S. Spray-dried indomethacin-loaded polyester nanocapsules and nanospheres: Development, stability evaluation and nanostructure models. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 16, p. 305-312, 2002.

RAWAT, M.; SINGH, D.; SARAF, S. Nanocarriers: promising vehicle for bioactive drugs. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, p. 1790-1798, 2006.

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

SAEZ, M.; GUSMÁN, M.; MOLPECERES, J.; ABERTURAS, M. R. Freeze-drying of polycaprolactone and poly(D,L-lactic-glycolic) nanoparticles induce minor particle size changes affectin the oral pharmacokinetics of loaded drugs. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 50, p. 379-387, 2000.

SAHOO, S. K.; LABHASETWAR, V. Nanotech approaches to drug delivery and imaging. **Drug Discovery Today**, v. 8, n. 24, p. 1112-1120, 2003.

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

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, n. 5, p. 726-737, 2003a.

SCHAFFAZICK, S. R.; POHLMANN, A. R.; DALLA-COSTA, T.; GUTERRES, S. S. Freeze-drying polymeric colloidal suspensions: nanocapsules, nanospheres and nanodispersion. A comparative study, **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 56, p. 505-505, 2003b.

SCHAFFAZICK S. R.; POHLMANN, A. R.; MEZZALIRA, G.; GUTERRES, S. S. Development of nanocapsule suspensions and nanocapsule spray-dried powders containing melatonin, **Journal Brazilian Chemical Society**, v. 17, n.. 3, p. 562–569, 2006.

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

SCHMALTZ, C.; SANTOS, J. V.; GUTERRES, S. S. Nanocápsulas como uma tendência promissora na área cosmética: a imensa potencialidade deste pequeno grande recurso. **Infarma**, v. 16, n. 13-14, 2005

SONAJE, K.; LIN, K. J.; WEY, S. P.; LIN, C. K.; YEH, T. H.; NGUYEN, H. N.; HSU, C. W.; YEN, T. C.; JUANG, J. H.; SUNG, H. W. Biodistribution, pharmacodynamics and pharmacokinetics of insulin analogues in a rat model: Oral delivery using pH-Responsive nanoparticles vs. subcutaneous injection. **Biomaterials**, v. 31, p. 6849-6858, 2010.

TERROSO, T.; KÜLKAMP, I. C.; JORNADA, D. S.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Development of semi-solid cosmetic formulations containing coenzyme Q10-loaded nanocapsules. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 26, p. 819-826, 2009.

TEWA-TAGNE, P.; BRIANÇON, S.; FESSI, H. Spray-dried microparticles containing polymeric nanocapsules: Formulation aspects, liquid phase interactions and particles characteristics. **International Journal of Pharmaceutics** v. 325 p. 63–74, 2006.

TEWA-TAGNE, P.; BRIANÇON, S.; FESSI, H. Preparation of redispersible dry nanocapsules by means of spray-drying: Development and characterization. **European Journal of Pharmaceutics Sciences**, v. 30, p. 124-135, 2007a.

TEWA-TAGNE, P.; BRIANÇON, S.; FESSI, H. Spray-drying nanocapsules in presence of colloidal silica as drying auxiliary agent: Formulation and process variables optimization using experimental designs. **Pharmaceutical Research**, v. 24, p. 650-661, 2007b.

VAUTHIER, C.; BOUCHEMAL, K. Methods for the preparation and manufacture of polymeric nanoparticles. **Pharmaceutical Research**, v. 26, p. 1025-1058, 2009.

VETTOR, M.; BOURGEOIS, S.; FESSI, H.; PELLETIER, J.; PERUGINI, P.; PAVANETTO F.; BOLZINGER M. A. Skin absorption studies of octyl-methoxycinnamate loaded poly(D,L-lactide) nanoparticles: Estimation of the UV filter distribution and release behaviour in skin layers. **Journal of Microencapsulation**, v. 27, n. 3, p. 253-262, 2010.

ZACCARI, G.; CAROSIA, R.; FINI A.; MONTALDO, P. G.; ORIENTI, I. Modified polyvinylalcohol for encapsulation of all-trans-retinoic acid in polymeric micelles. **Journal of Controlled Release**, v. 103, p. 369-380, 2005.

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