

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

WILLIAM ROGER MACENHAN

ESTUDO DE PERMEAÇÃO CUTÂNEA “*IN VITRO*” DE MICROPARTÍCULAS
POLIMÉRICAS CONTENDO ADAPALENO POR ESPECTROSCOPIA
FOTOACÚSTICA

PONTA GROSSA

2019

WILLIAM ROGER MACENHAN

ESTUDO DE PERMEAÇÃO CUTÂNEA “*IN VITRO*” DE MICROPARTÍCULAS
POLIMÉRICAS CONTENDO ADAPALENO POR ESPECTROSCOPIA
FOTOACÚSTICA

Dissertação apresentada para
obtenção do título de Mestre na
Universidade Estadual de Ponta
Grossa, Área de Atenção
Interdisciplinar em Saúde

Orientadora: Prof^a. Dr^a Andressa
Novatski

Coorientador: Prof. Dr. Paulo Vitor
Farago

PONTA GROSSA

2019

M141 Macenhan, William Roger
Estudo de permeação cutânea “*in vitro*” de micropartículas poliméricas contendo adapaleno por espectroscopia fotoacústica/ William Roger Macenhan. Ponta Grossa, 2019.
93 f.; il.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde – Área de Concentração – Atenção Interdisciplinar em Saúde), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientadora: Profa. Dra. Andressa Novatski
Coorientador: Prof. Dr. Paulo Vitor Farago

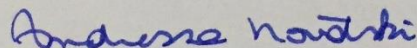
1. Adapaleno. 2. Liberação controlada. 3. Microencapsulação. 4. poli(ϵ -caprolactona). I. Novatski, Andressa. II. Farago, Paulo Vitor. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa- Mestrado em Ciências da Saúde. IV. T.
CDD : 616.5

WILLIAM ROGER MACENHAN

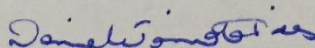
ESTUDO DE PERMEAÇÃO CUTÂNEA “IN VITRO” DE
MICROPARTÍCULAS POLIMÉRICAS CONTENDO ADAPALENO
POR ESPECTROSCOPIA FOTOACÚSTICA

Dissertação apresentada para obtenção do título de mestre em Ciências da Saúde na
Universidade Estadual de Ponta Grossa, Área de Atenção Interdisciplinar em Saúde.

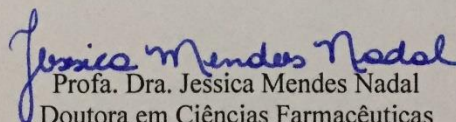
Ponta Grossa, 12 de novembro de 2018.



Profa. Dra. Andressa Novatski – Orientador
Doutora em Física
Universidade Estadual de Ponta Grossa



Profa. Dra. Daniele Toniolo Dias Ferreira Rosa
Doutora em Física
Universidade Tecnológica Federal do Paraná



Profa. Dra. Jessica Mendes Nadal
Doutora em Ciências Farmacêuticas
Universidade Estadual de Ponta Grossa

Dedico este trabalho a todos que direta ou indiretamente contribuíram para sua conclusão.

AGRADECIMENTOS

Faltam palavras para expressar o agradecimento a todos que estiveram envolvidos neste projeto.

No meio acadêmico, inicialmente agradeço a minha professora orientadora, Dr^a Andressa Novatski, que mesmo nos momentos mais difíceis e nas necessidades de adequações sempre esteve ao meu lado, acreditando no potencial da ideia concebida para este projeto. Ao professor coorientador, Dr. Paulo Vitor fica também o agradecimento pelo apoio prestado.

Agradeço também ao aluno de mestrado Guilherme Camargo e a professora Dr^a Jessica Mendes que auxiliaram com dados do projeto desenvolvido previamente por eles.

Um agradecimento muito especial cabe também a professora Dr^a Daniele Dias e seu esposo Adagil que tiveram muita paciência e compromisso em me auxiliar nos testes de espectroscopia de fotoacústica.

Agradeço também ao aluno de graduação João Roik pelo auxílio em muitos dos testes realizados neste projeto.

Um agradecimento especial a todos do corpo docente e coordenação do mestrado em Ciências da Saúde pelo comprometimento e empenho na condução do programa.

Com relação aos amigos pessoais, fica um agradecimento especial a todos que de certa forma sempre auxiliaram com alguma palavra de consolo ou até mesmo de incentivo, em especial a minha amiga Dr^a Débora Dalla Vechia com quem sempre pude contar desde o momento em que comecei a pensar na ideia de fazer mestrado.

Agradeço também aos colegas da turma de mestrado que fizeram com que nossas aulas pudessem ser mais dinâmicas e proveitosas.

Agradeço a todos da minha família em especial a minha mãe Sirlei por sempre acreditar em meu potencial.

E sem palavras, um agradecimento mais do que especial a minha querida esposa Francieli, que sempre esteve ao meu lado, me dando força, dizendo para ter paciência e sempre me auxiliando a ficar calmo quando o cérebro já estava quase “esgotado”. Você me faz ser melhor a cada dia que passa.

A quem talvez eu não tenha mencionado aqui, também fica o meu muito obrigado. Hoje na escrita dos agradecimentos do trabalho, percebi como foi importante o papel de tantas pessoas e que sem elas, talvez este trabalho não estaria aqui hoje.

O insucesso é apenas uma oportunidade
para recomeçar com mais inteligência.
(Henry Ford)

RESUMO

O adapaleno (ADAP) é uma importante droga amplamente utilizada no tratamento tópico da acne. É um retinoide de terceira geração e fornece ação queratolítica, anti-inflamatória e antiseborreica. No entanto, alguns efeitos adversos tópicos, como eritema, secura e descamação foram relatados com sua fórmula comercial. Nesse sentido, a microencapsulação desse fármaco usando poliésteres pode contornar seus efeitos colaterais tópicos e pode levar ao aumento da liberação de fármaco nas glândulas sebáceas. O objetivo deste trabalho foi obter micropartículas de poli (ϵ -caprolactona) (PCL) carregadas com ADAP, preparadas pelo método de emulsão simples / evaporação do solvente. Formulações contendo 10 e 20% de ADAP foram obtidas com sucesso e caracterizadas por estudos morfológicos, espectroscópicos e térmicos. Valores de eficiência de encapsulação acima de 98% foram alcançados. As micropartículas apresentaram forma esférica e superfície lisa. Os resultados de espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) não apresentaram ligação química do fármaco-polímero e a técnica de calorimetria exploratória diferencial (DSC) mostrou uma parcial amorfização do fármaco. A permeação do ADAP na membrana Strat-M® para teste de difusão transdérmica foi avaliada por espectroscopia fotoacústica (PAS) na região espectral entre 225 e 400 nm após 15 min e 3 h da aplicação de formulações de PCL carregadas com ADAP. A PAS foi utilizada com sucesso para investigar a penetração de micropartículas de poliéster. Além disso, a microencapsulação diminuiu a difusão transmembrana in vitro do ADAP.

Palavras-chave: Liberação controlada, microencapsulação, poli(ϵ -caprolactona)

ABSTRACT

Adapalene (ADAP) is an important drug widely used in topical treatment of acne. It is a third generation retinoid and provides keratolytic, anti-inflammatory, and antiseborrheic action. However, some topical adverse effects such as erythema, dryness, and scaling have been reported with its commercial formula. In this sense, the microencapsulation of this drug using polyesters can circumvent its topical side effects and can lead to the enhancement of drug delivery into sebaceous glands. The goal of this work was to obtain ADAP-loaded poly(ϵ -caprolactone) (PCL) microparticles prepared by simple emulsion/solvent evaporation method. Formulations containing 10 and 20% of ADAP were successfully obtained and characterized by morphological, spectroscopic and thermal studies. Values of encapsulation efficiency above 98% were achieved. Microparticles showed spherical shape and smooth surface. Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) results presented no drug-polymer chemical bond and differential scanning calorimetry (DSC) technique showed a partially amorphization of drug. ADAP permeation in Strat-M® membrane for transdermal diffusion testing was evaluated by photoacoustic spectroscopy (PAS) in the spectral region between 225 and 400 nm after 15 min and 3 h from application of ADAP-loaded PCL formulations. PAS was successfully used for investigating the penetration of polyester microparticles. In addition, microencapsulation decreased in vitro transmembrane diffusion of ADAP.

Keywords: Controlled release, microencapsulation, poly(ϵ -caprolactone)

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: ESTRUTURA QUÍMICA DO ADAP	28
FIGURA 2: MODELOS DE ESTRUTURA DAS MICROPARTÍCULAS	30
FIGURA 3: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO MECANISMO DE HIDRÓLISE DA PCL (MERKLI ET AL., 1998)	34
FIGURA 4: MECANISMOS DE GERAÇÃO DO SINAL FOTOACÚSTICO: A) DIFUSÃO TÉRMICA; B) EXPANSÃO TÉRMICA; C) EFEITO TERMOELÁSTICO; D) EFEITO FOTOBÁRICO.....	39
FIGURA 5: ESQUEMA REPRESENTATIVO DA RELAÇÃO ENTRE A FREQUÊNCIA UTILIZADA X PENETRAÇÃO DA AMOSTRA.....	41
FIGURA 6: FLUXOGRAMA DAS ETAPAS DA PESQUISA	45
FIGURA 7: ESPECTRO DE ABSORÇÃO DO ADAP E FORMULAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS F0.....	50
FIGURA 8: REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA CURVA ANALÍTICA PADRÃO PARA A DETERMINAÇÃO DE ADAP OBTIDA POR UV-VIS NA FAIXA DE CONCENTRAÇÃO DE 4 A 12 MG.ML ⁻¹	51
FIGURA 9: ESQUEMA REPRESENTATIVO PARA MEDIDA DE DIFUSIVIDADE TÉRMICA UTILIZADA NO LABORATÓRIO DE ESPECTROSCOPIA ÓPTICA E FOTOACÚSTICA (GEOFA) DA UEPG.....	57
FIGURA 10: ESQUEMA REPRESENTATIVO DA MEMBRANA SINTÉTICA UTILIZADA.....	59
FIGURA 11: MONTAGEM EXPERIMENTAL DA TÉCNICA DE FOTOACÚSTICA UTILIZADA NO LABORATÓRIO MULTIUSUÁRIO DE PROPRIEDADES TERMO-ÓPTICAS (LAPTO) – UTFPR	59
FIGURA 12: ASPECTOS MORFOLÓGICOS DO (A) ADAP PURO, (B) DA PCL TRITURADA, (C) DA MISTURA FÍSICA, (D), F0, (E) F10 E (F) F20 POR MEV-FEG.....	64
FIGURA 13: MICROGRAFIAS PARA AS AMOSTRAS (A) F0, (B) F10 E (C) F20 EXEMPLIFICANDO AS MEDIDAS DE DIÂMETRO EFETUADAS DURANTE AS MEDIDAS DE MEV-FEG	66
FIGURA 14: ESPECTROS FTIR DA PCL, DO ADAP PURO (ADAP), DA MISTURA FÍSICA PCL: ADAP (MF) E DAS MICROPARTÍCULAS POLIMÉRICAS (F0, F10 E F20).....	68
FIGURA 15: RESULTADOS DE TERMOGRAMA DA PCL, DO ADAP PURO, DA MISTURA FÍSICA PCL: ADAP (MF) E DAS MICROPARTÍCULAS POLIMÉRICAS (F0, F10 E F20)	69
FIGURA 16: CURVAS DE TG DO ADAP PURO, DA PCL E DA MISTURA FÍSICA (MF) PCL: ADAP (A) E DAS MICROPARTÍCULAS POLIMÉRICAS (F0, F10 E F20) (B).	70
FIGURA 17: AJUSTE DO SINAL FOTOACÚSTICO MEDIDO PARA MEMBRANA SINTÉTICA STRAT M® CONSIDERANDO A ESPESSURA DE 300 µM.	72
FIGURA 18: (A) ILUSTRAÇÃO DO COMPRIMENTO DE DIFUSÃO TÉRMICA EM UMA IMAGEM MEV (INCIDÊNCIA NO LADO INTERNO) DA MEMBRANA (B) MEDIÇÕES MEV DE CAMADAS DE MEMBRANA PARA A MESMA IMAGEM NA FIGURA (A).	73

FIGURA 19: ESPECTROS DE ABSORÇÃO DA MEMBRANA STRAT M® EM FUNÇÃO DA PROFUNDIDADE.....	74
FIGURA 20: ESPECTRO DE ABSORÇÃO ÓPTICA DO FÁRMACO E DAS MICROPARTÍCULAS OBTIDOS POR PAS.(A) ESPECTROS NORMALIZADOS PELO SINAL DO CARVÃO E (B) ESPECTROS NORMALIZADOS DE 0 A 1.	75
FIGURA 21: ESPECTRO FOTOACÚSTICO PARA O ADAP E PARA AS FORMULAÇÕES DE MICROPARTÍCULAS.....	77
FIGURA 22: ESPECTROS FOTOACÚSTICOS PARA AS MEMBRANAS SINTÉTICAS - STRAT M®	78
FIGURA 23: ESPECTROS FOTOACÚSTICOS PARA AS MEMBRANAS SUBMETIDAS ÀS FORMULAÇÕES APÓS 15 MIN DE APLICAÇÃO. ..	79
FIGURA 24: EVOLUÇÃO DA PENETRAÇÃO DO ADAP NA MEMBRANA EM FUNÇÃO DA PROFUNDIDADE DE PENETRAÇÃO APÓS 15 MIN (A) E 3 H (B) DE APLICAÇÃO. AS MARCAS TRACEJADAS APROXIMAM-SE DA POSIÇÃO DE APLICAÇÃO DAS FORMULAÇÕES.	80
FIGURA 25: ESTRUTURA DA MEMBRANA STRAT M® EM COMPARAÇÃO COM A PELE HUMANA.	81

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: FORMULAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS CONTENDO O FÁRMACO, OBTIDAS PELO MÉTODO DE EMULSÃO SIMPLES SEGUIDA DE EVAPORAÇÃO DO SOLVENTE	46
TABELA 2: CONCENTRAÇÕES UTILIZADAS PARA REALIZAÇÃO DA CURVA ANALÍTICA.....	51
TABELA 3: DADOS OBTIDOS POR MEIO DA ANÁLISE DA REGRESSÃO LINEAR	52
TABELA 4: RESULTADOS DA REPETIBILIDADE E PRECISÃO INTERMEDIÁRIA	53
TABELA 5: CONCENTRAÇÕES UTILIZADAS PARA TESTE DE EXATIDÃO DO MÉTODO.....	54
TABELA 6: RECUPERAÇÃO DO ADAP ADICIONADO À FORMULAÇÃO ANALISADA PELO MÉTODO PROPOSTO	55
TABELA 7: TEOR DE ADAP INCORPORADO NAS MICROPARTÍCULAS DE PCL (MG.ML ⁻¹) E EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO (EE,%)	56
TABELA 8: COMPOSIÇÃO DO GEL TESTE A SER UTILIZADO NO ENSAIO DE PERMEAÇÃO	57
TABELA 9: RENDIMENTO OBTIDO PARA AS FORMULAÇÕES F0, F10 E F20.....	61
TABELA 10: TEOR DE ÁGUA* OBTIDO PARA O ADAP, PARA A PCL E PARA AS MICROPARTÍCULAS F0, F10 E F20	62
TABELA 11: TAMANHO MÉDIO DAS PARTÍCULAS – FORMULAÇÕES F0, F10 E F20.....	65

LISTA DE SIGLAS

°C	Grau Celsius
ADAP	Adapaleno
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CED	Calorimetria Exploratória Diferencial
CMD	Concentração encontrada da amostra
DP	Desvio Padrão
DPR	Desvio Padrão Relativo
EE	Eficiência de encapsulação
EROs	Espécies Reativas do Oxigênio
F0	Micropartícula contendo 0% de adapaleno
F10	Micropartícula contendo 10% de adapaleno
F20	Micropartícula contendo 20% de adapaleno
FA	Fase Aquosa
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FO	Fase Orgânica
FTIR	<i>Fourier Transformed Infrared Radiation - IFT</i>
g	Gramas
ICH	<i>International Conference on Harmonization</i>
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
KBr	Brometo de potássio
Kv	Quilo Volts
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
m	Metro
mA	Miliampere
MEV-FEG	Microscopia eletrônica de varredura com fonte de emissão por efeito de campo
mg	Miligramas
min	Minutos

mL	Mililitro
MP	Micropartícula
nm	Nanômetros
OPC	Célula fotoacústica aberta
PAS	Espectroscopia fotoacústica
<i>P. acnes</i>	<i>Propionibacterium acnes</i>
PCL	Poli(ε-caprolactona)
Pval	Álcool polivinílico
RARs	Receptores intranucleares retinoides específicos
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
rpm	Rotação por minuto
TG	Termogravimetria
TLRs	Receptor toll-like2
Tween 80	Polissorbato 80
UV	Ultravioleta
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrometro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	OBJETIVOS	18
2.1	OBJETIVO GERAL	18
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3	REVISÃO DE LITERATURA.....	19
3.1	FISIOPATOLOGIA DA ACNE	19
3.2	PRINCIPAIS PROCESSOS FISIOPATOLÓGICOS ENVOLVIDOS NO DESENVOLVIMENTO DA ACNE	20
3.2.1	Liberação de mediadores inflamatórios na pele	20
3.2.2	Alteração no processo de queratinização	21
3.2.3	Produção de sebo aumentada e controlada pelo hormônio androgênico ..	21
3.2.4	Colonização folicular pela Propionibacterium acnes	22
3.3	TRATAMENTO DA ACNE	23
3.3.1	Tratamento tópico.....	23
3.3.2	Antimicrobianos tópicos	24
3.3.3	Retinoides tópicos	24
3.3.4	Adapaleno - ADAP	25
3.3.4.1	Mecanismo de ação – ADAP	26
3.3.4.2	Caracterização físico-química do ADAP	28
3.3.5	Sistemas de liberação controlada de fármacos.....	28
3.3.5.1	Micropartículas	30
3.3.5.2	Uso de sistemas de liberação modificada de fármacos para a aplicação tópica	32
3.4	POLÍMEROS BIODEGRADÁVEIS	32
3.4.1	Poli (ϵ -caprolactona) – PCL.....	33
3.5	TESTES DE PERMEAÇÃO CUTÂNEA.....	34
3.6	ESPECTROSCOPIA FOTOACÚSTICA (PAS)	35
3.6.1	Efeito fotoacústico.....	36
3.6.2	Sinal fotoacústico	38
3.6.3	Mecanismos de geração do sinal fotoacústico	38
3.6.4	Comprimento de difusão térmica: perfil de profundidade	39
4	MATERIAIS E MÉTODOS	42
4.1	EQUIPAMENTOS	42

4.2	REAGENTES E SOLVENTES	43
4.2.1	Fármaco.....	43
4.2.2	Polímero	43
4.2.3	Água purificada	43
4.2.4	Solventes e demais reagentes	43
4.2.5	Materiais	43
4.3	DESENHO EXPERIMENTAL.....	44
4.4	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	45
4.4.1	Preparação das micropartículas poliméricas contendo ADAP	45
4.4.2	Mistura física	46
4.4.3	Rendimento	46
4.4.4	Determinação do teor de umidade.....	47
4.4.5	Caracterização físico-química das micropartículas	47
4.4.5.1	Microscopia eletrônica de varredura com fonte de emissão por efeito de campo – (MEV-FEG)	47
4.4.5.2	Determinação do tamanho de partícula.....	47
4.4.5.3	Avaliação por espectroscopia na região do infravermelho por transformada em Fourier - FTIR	48
4.4.5.4	Calorimetria exploratória diferencial (CED)	48
4.4.5.5	Termogravimetria (TG)	48
4.4.6	Validação do método analítico para quantificação do ADAP	48
4.4.6.1	Quantificação do ADAP incorporado nas micropartículas	55
4.4.7	Testes de permeação cutânea “in vitro”	56
4.4.7.1	Medida da difusividade térmica – OPC.....	57
4.4.7.2	Espectroscopia fotoacústica – PAS	58
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
5.1	OBTENÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS	61
5.2	RENDIMENTO	61
5.3	DETERMINAÇÃO DO TEOR DE UMIDADE	62
5.4	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA COM FONTE DE EMISSÃO POR EFEITO DE CAMPO (MEV-FEG)	63
5.5	DETERMINAÇÃO DO TAMANHO DE PARTÍCULA	65
5.6	ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (IVTF)	67
5.7	CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (CED).....	68
5.8	TERMOGRAVIMETRIA (TG)	69

5.9	DIFUSIVIDADE TÉRMICA DAS MEMBRANAS SINTÉTICAS POR OPC.....	71
5.10	ESPECTROSCOPIA FOTOACÚSTICA – PAS	72
5.10.1	Medidas de absorção das membranas Strat M®.....	72
5.10.2	Medidas de absorção das amostras em pó para permeação	74
5.10.3	Avaliação da permeação por PAS	76
6	CONCLUSÕES	82
7	REFERÊNCIAS	83

1 INTRODUÇÃO

A acne (*acne vulgaris*), é uma doença inflamatória crônica que afeta cerca de 85 a 100% de adolescentes e adultos jovens, causando diversas manifestações clínicas que podem incluir o aumento da presença de gordura na pele, a ocorrência de lesões inflamatórias e não inflamatórias, podendo ser encontrada predominantemente nas regiões do corpo que possuem mais unidades pilosebáceas. O principal objetivo do tratamento farmacológico é controlar e tratar as lesões provocadas. Diversas abordagens de tratamento podem ser utilizadas, entre elas: tratamentos tópicos e sistêmicos (FOX et al., 2016; SHALITA, 2004; JACOB; DOVER; KAMINER, 2001; VAN ZUUREN et al., 2007; ROSAS VASQUEZ et al., 1996; ROSENFELD, 2008; LUCKY, 2008; VALEYRIE-ALLANORE et al., 2007).

Dentre as opções de tratamentos tópicos utilizados na patologia da acne, pode-se ressaltar o uso do ADAP que é um retinoide aprovado para uso no tratamento da acne vulgar e possui ação comedolítica, anti-inflamatória e propriedades anti-comedogênicas e pró-apoptóticas, além de apresentar um pico de ação mais rápido e efeito irritativo menor que a tretinoína (outro fármaco que também pode ser utilizado no tratamento da acne), sendo a concentração usada habitualmente de 0,1% em creme ou gel (YEH; BONATI; SILVERBERG, 2016).

Apesar de ser bem tolerado e possuir poucos efeitos colaterais, o uso do ADAP tópico, por ser um retinoide, pode acarretar em efeitos adversos bem característicos de sua classe farmacológica como eritema, secura, descamação e sensação de queimação nos locais da aplicação. Além disso, devido a sua baixa solubilidade em água, a indústria farmacêutica acaba tendo que solubilizar o ativo em certos veículos que podem também causar irritação ao entrarem em contato com o estrato córneo (KIM, S. Y.; OCHSENDORF, F. R., 2015; GUO, C. et al., 2016).

Diante desta situação, é necessário o aperfeiçoamento no processo de produção e obtenção destas formulações, garantindo assim uma melhor adequação de uso e diminuição do índice de abandono de tratamento. Dentre as possibilidades, uma alternativa é trabalhar com micropartículas poliméricas, que são sistemas de administração microparticulada. Estes sistemas permitem que os ativos sejam bem tolerados, reduzindo a irritação cutânea, sem diminuir sua atividade farmacológica, além de possivelmente reduzir os efeitos adversos locais, sistêmicos e de toxicidade, por diminuir a permeação do ativo pelas camadas da pele. Ademais, sistemas

microparticulados permitem uma maior estabilidade química das substâncias ativas e, com isso, menores concentrações e distribuição mais homogênea de substâncias de uso tópico (JUSTUS, B. *et. al.*, 2015; KUMAR, L. *et. al.*, 2013; SEVERINO, P. *et. al.*, 2011; LABOUTA, H. I.; EL-KHORDAGUI, L. K., 2010).

Por se tratar de um medicamento direcionado ao uso tópico, é necessário a realização de estudos de permeação transdérmica cutânea para o ADAP. A avaliação da permeação de ativos farmacêuticos através da pele é um passo importante no desenvolvimento de formulações de medicamentos que são utilizados para uso tópico (BARRY; SOUTHWELL; WOODFORD, 1984).

O uso de membranas artificiais para mimetizar o processo de absorção da pele se apresenta como uma importante ferramenta de estudo para avaliações de liberação e absorção transdérmica de medicamentos (CILURZO *et al.*, 2014). Um sintético introduzido recentemente no mercado é a membrana Strat-M da EMD Millipore, Danvers, MA que pode prever a permeação de drogas lipofílicas e hidrofílicas com melhor correlação com a pele humana (HAQ *et al.*, 2018).

A técnica de espectroscopia fotoacústica (PAS) é uma das formas de se avaliar a penetração transdérmica de medicamentos que tem sido aplicada em diversos estudos para a determinação de amostras “*in vivo*”, “*ex vivo*” ou “*in vitro*”, bem como da taxa de penetração de medicamentos e/ou protetores solares na pele humana ou em anexos. A possibilidade da realização de medidas de perfil de profundidade ao longo da amostra é uma característica única desta técnica (SEHN, *et al.*, 2005; SEHN, 2004; NUGLISCH, *et al.*, 2005).

Assim sendo, o objetivo deste trabalho foi desenvolver, caracterizar e quantificar micropartículas poliméricas de poli(ϵ -caprolactona) (PCL) contendo ADAP, para posterior avaliação da penetração cutânea “*in vitro*” das micropartículas desenvolvidas com o uso da metodologia de espectroscopia fotoacústica (PAS) frente a utilização de membrana sintética.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver, caracterizar, quantificar e avaliar permeação cutânea “*in vitro*” de micropartículas poliméricas contendo ADAP obtidas a partir do polímero PCL.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter micropartículas polimérica contendo o fármaco ADAP a partir do polímero PCL pelo método de emulsão simples seguida da evaporação do solvente orgânico;
- Caracterizar as micropartículas poliméricas obtidas por meio de estudos morfológicos, espectroscópicos e térmicos;
- Realizar a validação do método analítico com o uso de técnica de espectrometria na região do ultravioleta com posterior quantificação de fármaco presente nas micropartículas para determinação da taxa de eficiência de encapsulação;
- Realizar estudos de permeação das micropartículas com a utilização de formulações em géis frente a uma membrana sintética (Strat M[®]) com o uso da técnica de espectroscopia fotoacústica (PAS).

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 FISIOPATOLOGIA DA ACNE

A acne (*acne vulgaris*), pode ser entendida como uma desordem que acomete os folículos pilossebáceos, provocando características clínicas que incluem: seborreia (excesso de gordura), lesões não inflamatórias (comedões abertos e fechados), lesões inflamatórias (pápulas e pústulas) e vários graus de cicatrizes. A distribuição da acne esta intimamente ligada a regiões de maior densidade de unidades pilossebáceas (face, pescoço, ombros e costas) (SHALITA, 2004; JACOB; DOVER; KAMINER, 2001; VAN ZUUREN et al., 2007; ROSAS VASQUEZ et al., 1996; ROSENFELD, 2008; LUCKY, 2008; VALEYRIE-ALLANORE et al., 2007).

As estimativas de prevalência são de difícil avaliação, pois as definições e a gravidade da acne pode ser entendida de diferentes formas entre os vários estudos que tentam delimitar o problema (STATHAKIS; KILKENNY; MARKS, 1997). Embora o acometimento da doença seja mais comum em adolescentes, a acne frequentemente pode persistir na fase adulta (COLLIER et al., 2008; POLI et al., 2001). Um estudo populacional realizado na Alemanha mostrou que 64% de jovens com idade entre 20 a 29 anos e 43% de adultos com idade entre 30 a 39 anos apresentavam manchas de acne visível (SCHAFER et al., 2001).

O desenvolvimento da acne começa normalmente na puberdade com o aumento da produção da gordura (LUCKY, 1998). A acne se caracteriza por lesões oriundas de ações de hormônios sobre as glândulas de gorduras da pele, causando erupção pleomórfica dos comedões, pápulas eritematosas, pústulas, um certo grau de hiperpigmentação e podendo em alguns casos ocorrer a presença de certos tipos de nódulos que podem vir a causar cicatrizes. Atinge ambos os sexos, no entanto, podem ser mais prevalentes em indivíduos do sexo masculino (MONTAGNER; COSTA, 2010; SILVA; COSTA; MOREIRA, 2014; NELSON et al., 2016; JAFFARY et al., 2016).

Pode ser observada em alguns casos, a acne de início precoce (antes dos 12 anos de idade), que geralmente é de ação mais comedogênica do que ligada ao processo inflamatório, situação que pode ser explicada por que indivíduos dessa idade possuem uma pouca produção de gordura não sendo assim possível suportar uma grande quantidade de *Propionibacterium acnes* (FRIEDLANDER et al., 2010). Alguns

delimitantes da gravidade da acne podem ser determinados pelo início precoce da acne comedogênica e o número de indivíduos com a patologia dentro de uma mesma família (GHODI; ORAWA; ZOUBULIS, 2009).

A acne não é considerada uma doença infecciosa, no entanto, a presença de microrganismos existentes na superfície da pele, entre eles: *Propionibacterium acnes*, o *Staphylococcus epidermidis* e o *Staphylococcus aureus*, podem fazer com que a acne se torne uma lesão infecciosa (BISWAL et al., 2016).

A formação das lesões de acne, pode ser entendida sobre quatro processos principais: mediadores inflamatórios liberados pela pele, alteração do processo de queratinização levando ao aparecimento de comedões, produção de sebo aumentada e alterada sobre controle de hormônio androgênico (ou sensibilidade aumentada do receptor de androgênio) e colonização folicular pela *P. Acnes* (LEYDEN; STEINGOLD; WEISS, 2017; JAFFARY et al., 2016; BISWAL et al., 2016; SILVA; COSTA; MOREIRA, 2014; MONTAGNER; COSTA, 2010). É difícil precisar a sequência exata dos eventos e como eles e outros fatores interagem neste processo inflamatório que podem envolver linfócitos CD4+ e macrófagos que estimulam a vasculatura pilosebácea procedendo a hiperqueratinização folicular. As glândulas sebáceas funcionam como um órgão endócrino independente influenciado pelo CFH (hormônio liberador de corticotrofina) que pode mediar a ligação entre o estresse e as exacerbações da acne (KUROKAWA et al., 2009).

3.2 PRINCIPAIS PROCESSOS FISIOPATOLÓGICOS ENVOLVIDOS NO DESENVOLVIMENTO DA ACNE

3.2.1 Liberação de mediadores inflamatórios na pele

Após a detecção da *P. Acnes* pelo sistema imune, têm-se o início do processo inflamatório, a liberação dos fatores quimiostáticos pela bactéria causam lesão folicular, ruptura e extravasamento bacteriano. Os ácidos graxos e lipídeos presentes na pele auxiliam no aparecimento das lesões inflamatórias (FOX et al., 2016).

A formação da pápula é o início da ocorrência da lesão inflamatória, ocorre a invasão do folículo piloso por linfócitos CD4+ e por neutrófilos, a posterior ruptura do folículo implica no extravasamento de lipídeos, corneócitos e bactérias na derme, fazendo com que mediadores neuroinflamatórios e citocinas sejam liberados e

comecem a interagir com células de sebo, causando aumento tanto no tamanho quanto na produção da glândula sebácea (MONTAGNER; COSTA, 2010).

3.2.2 Alteração no processo de queratinização

Em indivíduos portadores de acne, ocorre um processo de excreção inadequada de queratinócitos, causando um processo de hiperqueratinização, o que resulta na descamação anormal dos corneócitos (células queratinizadas) que se acumulam nos folículos pilossebáceos, resultando em oclusão e produção de comedos (FOX et al., 2016; MONTAGNER; COSTA, 2010). Inicialmente ocorre a formação de um microcomedo que será o precursor das lesões acneicas. Com o acúmulo de lipídeos, bactérias e fragmentos celulares pelo folículo ocorre a formação do comedo que pode ser inflamatória nos casos em que se observa proliferação bacteriana associada com mediadores inflamatórios ou do tipo não inflamatória quando se observa a presença do comedo (aberto ou fechado) (FOX et al., 2016; MONTAGNER; COSTA, 2010).

As lesões por comedões abertos (cravos) se caracterizam pela dilatação na superfície da pele, com posterior oxidação do conteúdo lipídico ali existente, causando uma aparência enegrecida. Já os comedões fechados (ou brancos) aparecem abaixo da superfície da pele, sem a abertura de poros. Caso ocorra o aumento do conteúdo lipídico, este comedão poderá se expandir e romper com o tecido (FOX et al., 2016). O principal ácido graxo envolvido na fisiopatologia de formação dos comedos é o ácido linoleico, observa-se que nos comedões sua presença esta reduzida o que acarreta em processos de descamação da pele. O ácido linoleico tem significância na manutenção da barreira epidérmica e qualquer alteração nessa barreira acarreta na penetração da derme por organismos e ácidos graxos pró-inflamatórios presentes no sebo, promovendo infecção e inflamação (COSTA; ALCHORNE; GOLDSCHMIDT, 2008).

3.2.3 Produção de sebo aumentada e controlada pelo hormônio androgênico

Na fase da puberdade, observa-se a estimulação de glândulas sebáceas e de queratinócitos foliculares pela ação de hormônios androgênicos, resultando em uma

maior produção sebácea e uma hiperqueratose folicular, com a formação inicial dos micromedos que darão origem as lesões inflamatórias (MONTAGNER; COSTA, 2010).

Estes hormônios, em especial a testosterona, podem estimular o aumento da produção e secreção do sebo, aumento este responsável pela ocorrência e severidade das lesões (FOX et al., 2016). As glândulas sebáceas e os queratinócitos possuem enzimas (5α -redutase, 3β - e 17β -hidroxiesteróide deidrogenase) que possuem a função de metabolizar esses hormônios. Posteriormente observa-se a diferenciação e o rompimento destas células sebáceas com a liberação de lipídeos no ducto sebáceo e no folículo piloso (MONTAGNER; COSTA, 2010).

Pode-se observar a alteração na característica do sebo de indivíduos acneicos em relação a indivíduos sem a presença de acne. Nos dois grupos, pode-se identificar uma proporção de ácidos graxos livres, escaleno, colesterol e seus ésteres similares. No entanto, a proporção de triglicérides em indivíduos com acne é maior, pode-se apontar que os ácidos graxos livres se acumulam no infundíbulo glandular por um longo período de tempo, com a capacidade de causar a irritação do epitélio, levando ao processo de hiperqueratinização, com posterior processo de inflamação (COSTA; ALCHORNE; GOLDSCHMIDT, 2008).

3.2.4 Colonização folicular pela *Propionibacterium acnes*

A principal bactéria envolvida no desenvolvimento da acne vulgar é a *P.acnes*, uma bactéria anaeróbica, gram positiva, do gênero *Corynebacterium* e que normalmente faz parte da microbiota normal presente nos folículos pilosebáceos, acaba utilizando o sebo da pele que possui alta quantidade de lipídeos como fonte de nutriente (FOX et al., 2016).

Quando se observa a produção excessiva de sebo, conseqüentemente ocorre a proliferação bacteriana, favorecendo assim o aparecimento da acne (AL-HAMMADI et al., 2016). O sebo por ser uma substância hidrofóbica, facilita a lubrificação e proteção da pele. A *P.acnes* hidrolisa os triglicérides do sebo através de estearases que resultam em ácidos graxos livres que, por fim, promovem a irritação da parede folicular e induzem à queratinização (MONTAGNER; COSTA, 2010).

Como na maioria das doenças infecciosas, ocorre a resposta imune como um processo de defesa, no desenvolvimento da *P.acnes* também ocorre este processo

de ativação (MONTAGNER; COSTA, 2010). A inflamação observada ocorre pela ingestão de leucócitos polimorfonucleares no centro glandular. Com a liberação de enzimas hidrolíticas celulares, os anticorpos específicos contra a *P.acnes* presentes no micromedões interagem com estas enzimas liberando proteases hidrolíticas. Estas proteases atuam na parede do epitélio infundibular, irritando-a com a liberação de substâncias para a derme subjacente, resultando no processo inflamatório local (COSTA; ALCHORNE; GOLDSCHMIDT, 2008).

3.3 TRATAMENTO DA ACNE

O tratamento da acne deve ser elucidado através de diferentes perspectivas. Um dos primeiros pontos a ser levantado em relação ao tratamento das lesões refere-se aos cuidados com a higiene. No entanto, não há nenhuma boa evidência de que a acne seja causada ou curada por lavagem. Limpadores de pele antibacterianos podem beneficiar a acne leve, e barras de limpeza ácidas são provavelmente melhores do que sabonetes alcalinos padrão. Vale ressaltar que, o excesso de lavagem remove o óleo da superfície da pele, secando-a e estimulando a produção de óleo. Sabonetes ou géis cutâneos antibacterianos não fornecem benefícios adicionais aos pacientes que já usam outros tratamentos tópicos potencialmente irritantes (MAGIN et al., 2004).

3.3.1 Tratamento tópico

Agentes de uso tópico quando usados sozinhos ou em combinação são capazes de tratar a acne de natureza leve, composta por comedões abertos e/ou fechados, com poucas lesões inflamatórias (GOLLNICK et al., 2003). Os tratamentos tópicos funcionam somente onde são aplicados e como as terapias tópicas reduzem o desenvolvimento de novas lesões, faz-se necessário a aplicação em todas as áreas afetadas. A maioria dos agentes tópicos causam irritação inicial da pele, o que pode ocasionar a descontinuidade do tratamento em alguns casos. Esta irritação pode ser minimizada usando-se de preparações com menor intensidade e conseqüente aumento da frequência de aplicação ou até mesmo da dose (ZAENGLEIN et al., 2016).

3.3.2 Antimicrobianos tópicos

A principal ação dos antibióticos que o colocam como uma opção para o tratamento da acne, deve-se ao seu potencial bacteriostático sobre a *P.acnes* que se encontram dentro do ducto pilossebáceo (SIMONART; DRAMAIX, 2005). Para as lesões de acne consideradas mais graves, recomenda-se o uso do antibiótico tópico associado com outros produtos (retinoides ou peróxido de benzoíla). Dentre os principais antibióticos para uso tópico incluem-se: clindamicina, eritromicina e tetraciclina. Estes antibióticos tópicos podem ser usados associados com peróxido de benzoíla ou acetato de zinco (ZAENGLEIN et al., 2016).

Preparações a base de álcool proporcionam a diminuição da oleosidade da pele e, portanto, mais adequadas para o uso em peles mais oleosas. Observa-se um certo grau de resistência frente ao uso da eritromicina, o que leva em muitos casos ao seu uso associado com o peróxido de benzoíla (FOX et al., 2016; SILVA; COSTA; MOREIRA, 2014). O uso da eritromicina normalmente é feito na concentração que varia de 2 a 4% e a clindamicina tem sua concentração usual na faixa de 1%. Estas formas tópicos podem ser utilizadas na forma de gel e/ou loção. Normalmente o uso de antimicrobianos tópicos deve ser usado até o período de melhora das lesões inflamatórias (ocorre normalmente entre 2 a 6 semanas) (BRENNER et al., 2006).

O uso de antimicrobianos tópicos com retinoides tópicos leva a um sinergismo que acarreta a maior redução dos comedões e das lesões inflamatórias. A clindamicina reduz os efeitos irritantes da tretinoína (BRENNER et al., 2006).

3.3.3 Retinoides tópicos

Dentro do grupo de retinoides para tratamento da acne destaca-se a tretinoína, isotretinoína, ADAP e o tazaroteno. Os retinoides tópicos atuam sobre a queratinização anormal que ocorre na fisiopatologia da acne e também possuem ação anti-inflamatória (YENTZER; MCCLAIN; FELDMAN, 2009). Ensaios clínicos randomizados (RCT's) mostraram que preparações de maior concentração podem ter maior atividade do que as de baixa intensidade, mas à custa de mais irritação. Todos os retinoides tópicos induzem reações locais e devem ser descontinuados se forem graves. Os retinoides são os agentes comedolíticos mais efetivos para o tratamento da acne leve a moderada (FOX et al., 2016).

A tretinoína foi considerada como um dos principais retinoides tópicos para tratamento das lesões de acne, no entanto apresenta uso limitado devido a forte tendência de causar irritação logo após o início do seu uso (YENTZER; MCCLAIN; FELDMAN, 2009). A isotretinoína e o ADAP apresentam maior tolerabilidade no seu uso e podem ser associados com antibióticos em formulações tópicas para o tratamento da acne. A tretinoína e o ADAP podem reduzir a quantidade de ácidos graxos livres produzidos na metabolização de triglicérides através da enzima lipase da *P. acnes* dentro do micromedo (MONTAGNER; COSTA, 2010; BRENNER et al., 2006).

Os retinoides podem causar eritema, sensibilidade e descamação da pele com o decorrer do seu uso, recomenda-se o uso inicial do produto em concentrações baixas (0,010% - 0,025%) com gradual aumento da concentração atrelada a resposta clínica do paciente, faz-se necessário a recomendação do uso dos retinoides tópicos no período da noite, com posterior lavagem do rosto na manhã seguinte e uso de protetores solares de amplo espectro devido ao efeito fotossensibilizante causado pelos retinoides (SILVA; COSTA; MOREIRA, 2014).

3.3.4 Adapaleno - ADAP

O ADAP é um retinoide tópico que é aprovado para uso no tratamento da acne vulgar. O ADAP pode ser usado também para várias indicações terapêuticas, incluindo o tratamento de verrugas, molusco contagioso, doença de Darier, fotoenvelhecimento, distúrbios pigmentares, queratoses actínicas e alopecia areata (YEH; BONATI; SILVERBERG, 2016).

O ADAP foi inicialmente aprovado pelo FDA em 1996 para o tratamento da acne em pacientes com 12 anos de idade ou mais, pode ser utilizado em forma de creme, gel e loção em concentrações que variam de 0,1% a 0,3%. O gel de ADAP a 0,1% foi aprovado pela FDA em 2016 como um tratamento sem necessidade de prescrição para acne em pacientes com 12 anos de idade ou mais. Já nas formulações de ADAP loção a 0,1% e gel e creme de ADAP a 0,3% estão disponíveis apenas por prescrição (KASSUGA et al, 2012).

Estudos anteriores demonstram que o ADAP é eficaz no tratamento da acne vulgar. Cinco ensaios clínicos randomizados foram incluídos em uma meta-análise que sugeriu que o gel de ADAP na concentração usual de 0,1% tem eficácia

semelhante, mas tolerabilidade melhorada, no tratamento da acne, em comparação com o gel de tretinoína na concentração de 0,025% (IRBY; YENTZER; FELDMAN, 2008).

O ADAP também apresenta um bom desempenho quando comparado ao tazaroteno. Num estudo randomizado, cego por avaliador, de 12 semanas, comparando o gel de 0,3% de ADAP e o gel de tazaroteno a 0,1%, observou-se uma redução clinicamente significativa na contagem total de lesões em cada grupo. Uma redução de 61% nas lesões de acne foi observada com o uso de ADAP, e uma redução de 57% foi observada com o uso de tazaroteno. Descobriu-se que o gel de 0,3% de ADAP tinha eficácia equivalente ao gel de tazaroteno a 0,1%. No entanto, os pacientes que utilizaram ADAP apresentaram menos irritação do que os pacientes do grupo tratado com tazaroteno (THIBOUTOT; ARSONNAUD; SOTO, 2008).

O ADAP possui vantagens adicionais quando comparado a outros retinoides, por ser considerado uma molécula mais estável. Isto leva a menor preocupação com a fotodegradação da molécula, permitindo o uso durante o dia. Enquanto que a tretinoína e o tazaroteno são fotolábeis. O ADAP também exibe menos instabilidade química, permitindo o uso em combinação com o peróxido de benzoíla (PHILLIPS, 2005).

3.3.4.1 Mecanismo de ação – ADAP

O ADAP é um metabólito ativo e, portanto, não requer conversão metabólica. Quando aplicado topicamente, penetra nos folículos capilares devido à sua natureza lipofílica. A absorção folicular ocorre 5 minutos após a aplicação tópica. A medicação liga-se aos receptores do ácido retinóico nuclear (RAR), RAR-beta e RAR-gama. Esse complexo então se liga ao DNA através de elementos de resposta ao ácido retinóico e induz a transcrição gênica, levando à proliferação e diferenciação dos queratinócitos a jusante. Como resultado, o ADAP diminui as formações dos micromedos, promove a esfoliação de comedões maduros e tem efeitos anti-inflamatórios (JEREMY et al., 2003).

Com relação a ação do ADAP no que se refere a colonização pela *P. acnes*, pode-se entender que os mediadores de libertação de *P. acnes* contribuem para a ruptura de comedões e estimulam as células inflamatórias. A *P. acnes* estimula a via do receptor Toll-like II (TLR-2), que induz a liberação de moduladores pró-

inflamatórios. Isso leva ao recrutamento de neutrófilos e a liberação de enzimas que resultam na ruptura do epitélio folicular (FITZ-GIBBON et al, 2013). Um mediador, IL-12, promove uma resposta imune TH1. Estudos demonstram que o ADAP suprime a quimiotaxia dos linfócitos polimorfonucleares e regula negativamente a 15-lipoxigenase e o TLR-2, o que contribui para os seus efeitos anti-inflamatórios (LHEURE et al., 2016).

O ADAP deve ser aplicado uma vez por dia, de manhã ou ao deitar. O paciente deve ser aconselhado a lavar o rosto com um sabonete suave e deixar o rosto secar completamente. Uma quantidade do ADAP do tamanho de uma ervilha deve ser aplicada como uma camada fina em toda a face. Deve-se ter cuidado para evitar a aplicação nas pálpebras, lábios e membranas mucosas. Um hidratante sem óleo pode ser aplicado sobre o ADAP para ajudar a diminuir o risco de irritação. (PHILLIPS, 2005).

As reações adversas comuns relatadas pelo ADAP incluem fotossensibilidade, irritação, vermelhidão, ressecamento, coceira e queimação. Estes são geralmente eventos adversos leves (PHILLIPS, 2005). O ADAP é menos irritante em comparação com outros retinoides tópicos. Em um estudo de grupo paralelo, mascarado, randomizado, controlado por investigação de 591 pacientes com acne, em uma análise de segurança combinada conduzida nos Estados Unidos e na Europa, realizou-se a comparação do gel de ADAP a 0,1% e tretinoína a 0,025%. O número de pacientes que interromperam o estudo devido a eventos adversos foi cerca de duas vezes maior no grupo de pacientes que usaram a tretinoína (2,4%) em comparação com o ADAP (1,3%). Não houve reações adversas sistêmicas observadas no estudo. A maioria das reações adversas observadas estava relacionada à irritação da pele (IRBY; YENTZER; FELDMAN, 2008).

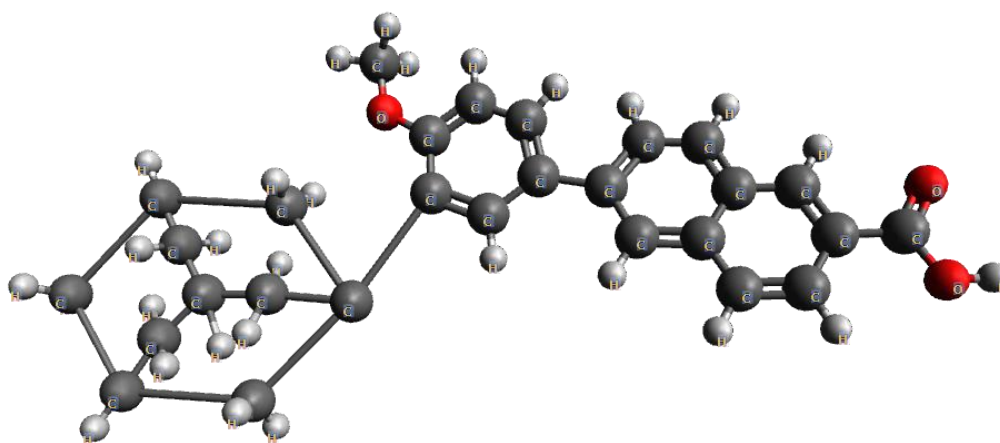
Reações alérgicas raras e graves podem ser caracterizadas por prurido, edema facial, inchaço dos lábios e/ou edema palpebral. Se um doente tiver reações anafiláticas com sintomas incluindo inchaço facial, urticária, dor no peito ou falta de ar, o ADAP deve ser descontinuado e o doente deve procurar uma avaliação médica imediata (PHILLIPS, 2005).

Segundo Zaenglein et al. (2016), o ADAP é um fármaco da categoria C para risco potencial ao feto, portanto, o paciente deve ser orientado sobre os riscos antes de iniciar o tratamento.

3.3.4.2 Caracterização físico-química do ADAP

O ADAP ou ácido 6-(3-(1-adamantil)-4-metoxifenil)-2-naftóico, possui fórmula molecular $C_{28}H_{28}O_3$, é um fármaco da classe dos retinoides tópicos de terceira geração, derivado do ácido naftóico e análogo da vitamina A. A estrutura química do ADAP pode ser visualizada na Figura 1 (PONCHET-OSMAN et al., 2017; MÜLLER-GOYMANN; LAUTERBACH, 2015).

Figura 1: Estrutura química do ADAP



Fonte: O autor

O ADAP possui boa solubilidade em solventes orgânicos e em álcool, porém é praticamente insolúvel em água. Possui estrutura molecular estável e capaz de emitir fluorescência pela presença de anéis aromáticos em ressonância em sua estrutura, ponto importante para sua quantificação e visualização tanto em formulação quanto na pele. Possui massa molar de $412,52 \text{ g.mol}^{-1}$, pKa de 4,23 e log P igual a 8,6 (BHATIA; ZHOU; BANGA, 2013).

3.3.5 Sistemas de liberação controlada de fármacos

A liberação de fármacos em sítios de ação específicos é um grande desafio dentro da área farmacêutica, pois vários fatores podem estar associados a este

processo, entre eles: processo de dissolução, redução da toxicidade, diminuição de efeitos colaterais, aumento da adesão e da conveniência do paciente ao tratamento. Neste cenário, as tecnologias de liberação modificada de fármacos representam uma importante área de estudo dentro da área farmacêutica, oferecendo diversas vantagens em relação as formas farmacêuticas convencionais (RESTANI et al, 2010).

Neste contexto, o desenvolvimento de formas farmacêuticas, que são capazes de permitir a otimização da velocidade de liberação e do regime posológico, promover o controle da liberação do medicamento em sítios de ação específicos tornaram-se constante objetos de estudos em pesquisas para administração de fármacos. Dentre os principais materiais utilizados com esta função, destaca-se os lipossomas, as micropartículas e as nanopartículas (MAINARDES, 2007). As micropartículas poliméricas são capazes de promover a liberação modificada de fármacos a partir do uso de uma ampla variedade de materiais poliméricos e por diversos métodos de obtenção (JUSTUS et al., 2015; LAUTERBACH; MUELLER-GOYMANN, 2014).

O processo de microencapsulação é capaz de permitir a proteção de fármacos sensíveis a questões ambientais, a eliminação de incompatibilidade entre dois ou mais ativos, diminuição de efeitos colaterais indesejados do fármaco e o mascaramento do sabor desagradável de certas substâncias (AHMAD et al., 2011; THOMPSON et al., 2007).

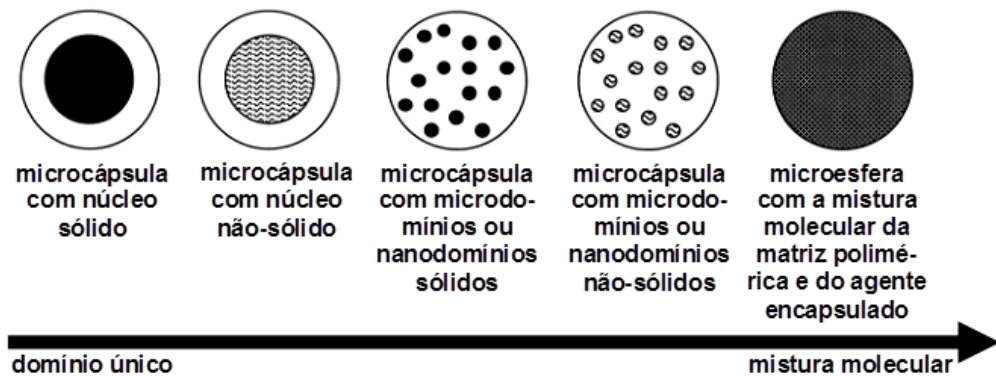
Este processo deve apresentar como características: rapidez, simplicidade, reprodutibilidade, baixo custo e facilidade de transposição para a escala industrial (GHARSALLAOUI et al., 2007). Um sistema de liberação controlada de fármacos ideal deve simultaneamente atender os requisitos de biocompatibilidade, ser capaz de carrear a maior quantidade de fármaco e controlar a liberação de forma precisa. O material do carreador deve ser química e biologicamente inerte para não causar nenhuma reação ou dano ao organismo. A quantidade de fármaco a ser carregado é o ponto chave da liberação controlada, não devendo conter a mais e nem a menos, para não prejudicar o processo terapêutico (DING et al., 2016). A utilização de sistemas de liberação modificada de fármacos também deve ser capaz de aumentar a adesão do paciente ao tratamento, promover a redução de efeitos secundários, pode ser capaz de evitar o metabolismo hepático de primeira passagem e proteger o fármaco frente a possíveis instabilidades e conseqüentemente aumentar a quantidade de fármaco no local de ação com a diminuição da dose necessária para se obter o efeito terapêutico desejado (RANCAN; BLUMEPEYTAVI; VOGT, 2014).

A eficiência de encapsulação pode ser entendida como sendo a diferença percentual entre a concentração de fármaco inicialmente adicionado na formulação e a concentração presente nas partículas (LI; ROUAUD; PONCELET, 2008).

3.3.5.1 Micropartículas

O termo micropartícula refere-se ao tamanho da partícula obtida após o método de obtenção utilizado, neste caso, a partícula apresenta um diâmetro médio entre 1 e 100 μm (GARAY; POCHEVILLE; MADARIAGA, 2010). Os diferentes polímeros biodegradáveis e biocompatíveis são capazes de liberar o fármaco por mecanismos de difusão e/ou degradação (erosão) do material polimérico. Normalmente, as micropartículas podem ser divididas em dois tipos diferentes de estruturas, as microesferas e as microcápsulas (Figura 2) (BIRNBAUM; BRANNON-PEPPAS, 2003).

Figura 2: Modelos de estrutura das micropartículas



Fonte: Adaptado de BIRNBAUM; BRANNON-PEPPAS, 2003.

As microesferas podem ser entendidas como estruturas em que o ativo se encontra homogeneamente distribuído dentro da matriz polimérica, já as microcápsulas são sistemas reservatórios, pois apresentam um núcleo diferenciado, com um material de cobertura que envolve a região central, e podem conter um ativo sólido ou líquido (ANTONIO et al., 2014; LABOUTA; EL-KHORDAGUI, 2010).

As micropartículas possuem facilidade no preparo e fornecem uma maior eficiência de incorporação quando comparadas às nanopartículas (JUSTUS et al., 2015). A questão da liberação do fármaco pode ser modulada alterando-se as

propriedades das micropartículas e com o uso de diferentes polímeros. As micropartículas obtidas podem ser administradas pelas vias parenterais, orais e tópicas (JUSTUS et al., 2015; LAUTERBACH; MUELLER-GOYMANN, 2014; KUMAR et al., 2013).

Dentre os diferentes métodos utilizados para a obtenção de sistemas microparticulados, a realização do método de emulsificação/evaporação do solvente orgânico apresenta-se como um método de fácil execução, com a necessidade da realização da correta seleção do solvente, emulsificante a ser utilizado, bem como as questões ideais de agitação (JUSTUS et al., 2015; ANTONIO et al., 2014; SEVERINO et al., 2011).

O método de emulsificação e evaporação do solvente orgânico tem sido frequentemente utilizado dentro das pesquisas na área de microtecnologia farmacêutica, devido à simplicidade dos procedimentos envolvidos e à possibilidade de modulação das características físicas e físico-químicas das partículas por meio da escolha dos componentes da formulação e das condições de preparação (LI; ROUAUD; PONCELET, 2008). Neste modelo, o fármaco é dissolvido ou disperso em uma solução orgânica volátil contendo o polímero. Essa fase orgânica é emulsionada em uma fase aquosa, contendo um estabilizante da dispersão. O solvente é removido da fase interna pelo uso de calor, ou ainda, pela evaporação em temperatura ambiente, que pode ser acelerada pela aplicação de pressão reduzida. As microesferas formadas são separadas por filtração ou centrifugação, lavadas com solvente adequado e secas sob condições apropriadas ou liofilizadas (TRAN; BENOÎTA; VENIER-JULIENNEA, 2011; OBEIDAT, 2009; JAIN, 2000).

A formação das micropartículas pelo método de emulsão/evaporação do solvente pode ser influenciada por diversos fatores, destacando-se a agitação e a natureza do estabilizante e dos solventes empregados na preparação. A capacidade de solvatação do polímero e, preferencialmente, de dissolução do fármaco são características desejáveis ao solvente da fase interna. Além desses aspectos, o solvente deve ser imiscível na fase contínua e apresentar baixa faixa de ebulição. A fim de garantir a formação das partículas e proporcionar uma elevada taxa de encapsulação, o fármaco e o polímero também devem ter baixa solubilidade na fase externa (HESLINGA; MASTRIA; ENIOLA-ADEFESO, 2009; LI; ROUAUD; PONCELET, 2008).

Quando o método de emulsão/evaporação do solvente é utilizado, a eficiência de encapsulação irá sofrer influência pelo coeficiente de partição do fármaco entre a fase interna e externa da emulsão. Moléculas químicas que são pouco hidrofílicas podem ser encapsuladas com sucesso pela formação de uma emulsão fase orgânica em fase aquosa (O/A). Entretanto, quando utilizamos molécula com elevada hidrofília, baixas taxas de encapsulação têm sido observadas. Nesse caso, a encapsulação pode ser realizada por meio da formação de uma emulsão inversa (A/O), na qual um solvente polar contendo o fármaco e o polímero são emulsionados em uma fase oleosa, como o óleo mineral (LI; ROUAUD; PONCELET, 2008). Para fármacos hidrofílicos, é possível, ainda, a obtenção de uma emulsão múltipla (A/O/A), em que a fase aquosa contendo o fármaco é dispersa em uma solução do polímero no solvente volátil, e essa emulsão resultante (A/O) é, por sua vez, dispersa em uma segunda fase aquosa (OBEIDAT, 2009).

3.3.5.2 Uso de sistemas de liberação modificada de fármacos para a aplicação tópica

Novos sistemas de liberação controlada têm sido explorados para o tratamento tópico de inúmeras doenças que acometem a região cutânea, incluindo, lipossomas, niossomas, etossomas, microemulsões, nanopartículas, micelas e micropartículas (RANCAN; BLUMEPEYTAVI; VOGT, 2014; KUMAR et al., 2013). O desenvolvimento de um sistema modificado de administração tópica de fármacos é capaz de realizar o aumento do tempo em que o ativo permanece em contato com a superfície da pele ou epiderme. A estabilidade e a liberação controlada são pontos fundamentais para o uso de sistemas microparticulados em retinoides (LAUTERBACH; MUELLER-GOYMANN, 2014; OLIVEIRA et al., 2014; VYAS; SONKER; GIDWANI, 2014; PROW et al., 2011).

As micropartículas são consideradas um excelente veículo de transporte para a penetração folicular, capazes de penetrar o folículo piloso e as glândulas sebáceas (JUSTUS et al., 2015; LAUTERBACH; MUELLER-GOYMANN, 2014; KUMAR et al., 2013).

3.4 POLÍMEROS BIODEGRADÁVEIS

Polímeros biodegradáveis possuem amplo espectro de ação em aplicações biomédicas, em tecidos e em medicina regenerativa. Poliésteres como poli-ácido

lático (PLA), poli-ácido glicólico (PGA), poli-trimetileno carbonato (PTMC) e poli- ϵ -caprolactona (PCL) são um importante grupo de polímeros biodegradáveis para uso na tecnologia farmacêutica (SEVERINO et al., 2011; SOPPIMATH et al., 2001). A taxa de degradação destes polímeros dependem de vários fatores, tais como: comprimento de cadeia (peso molecular), cristalinidade, extensão de ramificação, bem como a forma e o meio em que o polímero é introduzido. Tais características podem ser obtidas através do uso de diferentes técnicas de polimerização, uso de diferentes reagentes e monômeros durante a produção final ou através de modificações do polímero obtido, o que é capaz de fornecer polímeros com uma ampla gama de propriedades, tais como: rigidez, extensibilidade e solubilidade (MALIKMAMMADOV et al., 2017).

3.4.1 Poli (ϵ -caprolactona) – PCL

A PCL é um poliéster obtido pela polimerização da abertura dos anéis ϵ -monômeros da caprolactona que podem ocorrer por via aniônica, catiônica, condensação ou mecanismos de polimerização. Diferentes mecanismos de polimerização da caprolactona são descritos para obtenção do polímero. Estes, são capazes de gerar a formação de um polímero com diferentes pesos moleculares e índices diferentes de polidispersibilidade (HOSKINS; GRAYSON, 2009; AZIMI et al, 2014; WOODRUFF; HUTMACHER, 2010).

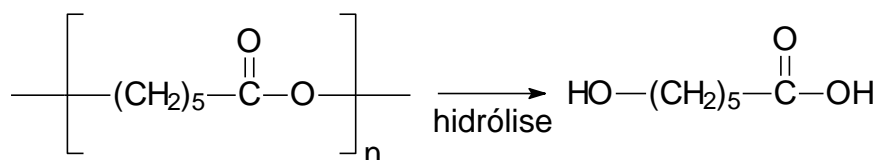
A PCL apresenta boa solubilidade em benzeno, clorofórmio, ciclohexanona, diclorometano, tolueno. Apresenta baixa solubilidade em acetona, acetonitrila e acetato de etila e é imiscível em água, álcool etílico, éter dietílico e éter de petróleo. Sua temperatura de fusão ocorre entre 59 e 64°C, e sua transição vítrea (T_g), geralmente, está entre -70 e -60°C. Sua biocompatibilidade permite diversas aplicações no campo biomédico e na indústria farmacêutica. Apresenta-se como cristalino em temperaturas ambientes (HOSKINS; GRAYSON, 2009).

A PCL é biodegradável, sendo sua degradação realizada de forma enzimática, que depende de fatores tais como: peso molecular, teor de monômero residual, autocatálise, além de outros fatores (WOODRUFF; HUTMACHER, 2010).

Em condições fisiológicas, sua degradação ocorre em duas etapas: a primeira etapa corresponde a hidrólise (Figura 3) não enzimática dos grupos ésteres e, na segunda etapa, macrófagos e fagossomos promovem sua degradação

intracelularmente, sendo assim, a PCL é absorvida completamente pelo organismo. A vantagem da utilização desse polímero é que o mesmo evita a criação de um ambiente ácido no tecido, além de possuir estabilidade *in vitro* (JUSTUS et al., 2015; PIRES; BIERHALZ; MORAES, 2015; KUMARI; YADAV; YADAV, 2010).

Figura 3: Representação esquemática do mecanismo de hidrólise da PCL (MERKLI et al., 1998)



Fonte: Adaptado de MERKLI et al., 1998

3.5 TESTES DE PERMEAÇÃO CUTÂNEA

A pele é uma via atrativa para a administração de medicamentos transdérmicos e tópicos. A avaliação da permeação de ativos farmacêuticos através da pele é um passo importante no desenvolvimento de formulações de medicamentos aplicados topicamente. Estudos de difusão são geralmente conduzidos usando modelos de pele humana ou animal, como por exemplo a pele de porco. No entanto, a pele humana possui muita variabilidade na sua composição entre diferentes indivíduos (BARRY; SOUTHWELL; WOODFORD, 1984).

Além disso, o local de administração (braço, perna, tronco), idade, sexo e raça pode influenciar a taxa de difusão dos ativos na pele (NINO et al., 2010). A perda de permeabilidade e difusão da pele é frequentemente associada com a função de barreira do estrato córneo que esta associada com o transporte de compostos hidrofílicos e lipofílicos (CILURZO et al., 2014).

Para eliminar a necessidade de membranas biológicas em estudos-piloto, membranas sintéticas são frequentemente usadas. Na maioria das membranas artificiais, o domínio aquoso (caminho hidrofílico) ou o domínio lipídico (caminho lipofílico) da pele é imitado (CILURZO et al., 2014).

O uso de membranas artificiais para mimetizar o processo de absorção da pele se apresenta como uma importante ferramenta de estudo para avaliações de liberação e absorção transdérmica de medicamentos. Dentre estas membranas, pode-se citar o uso da membrana de acetato de celulose que pode ser utilizada para estudos de

difusão e liberação tópica por um período longo de tempo, no entanto, possui como limitação o fato de que seus poros são maiores em comparação com a pele humana (MONTENEGRO et al., 2006). Além disso, pode interagir com alguns produtos químicos em uma formulação de droga e pode afetar a permeação de drogas e em consequência mostrar valor incorreto da permeabilidade do fármaco CILURZO et al., 2014).

Um sintético introduzido recentemente no mercado é a membrana Strat-M[®] da EMD Millipore, Danvers, MA que pode prever a permeação de drogas lipofílicas e hidrofílicas com melhor correlação com a pele humana (HAQ et al., 2018).

A membrana STRAT M[®] é uma membrana de ultrafiltração composta por duas camadas de poliéter que fornece um certo grau de resistência à permeação de substâncias ativas e logo na sequência apresenta uma camada de poliolefina que possui trama mais aberta e portanto mais permeável. A junção destas camadas poliméricas criam uma estrutura porosa que é impregnada com a mistura de lipídios sintéticos que fornecem gradiente de tamanho de poros e de difusividade (KARADZOVSKA; RIVIERE, 2013).

A membrana STRAT M[®] pode ser aplicada e usada como uma estratégia para avaliar as taxas de distribuição e permeação de fármacos hidrofílicos e lipofílicos em estudos de difusão de fase inicial para formulações tópicas e transdérmicas. Seu uso não requer pré- tratamento e sua estrutura uniforme elimina a variabilidade inerente à pele (HAQ, M. et al, 2018).

A membrana Strat-M[®] tem melhor correlação com a pele humana em termos de características de difusão em comparação a membrana de acetato de celulose (ou outras membranas de polímero) que foram usadas no passado (HAQ, M. et al, 2018).

3.6 ESPECTROSCOPIA FOTOACÚSTICA (PAS)

A espectroscopia fotoacústica (PAS) é uma técnica de importante relevância utilizada para se determinar a penetração e a distribuição de formulações em sistemas biológicos (ASTRATH, 2011)

Esta técnica é baseada no efeito fotoacústico medido quando a radiação eletromagnética (geralmente no intervalo de onda infravermelho), com modulação de intensidade periódica, é focada em uma amostra. Como resultado, a absorção de luz com subsequente aquecimento periódico da amostra é observada. As mudanças de

temperatura moduladas são dependentes da variação da intensidade da luz focalizada. Esta geração periódica de calor produz ondas acústicas na atmosfera dentro de uma célula fechada contendo a amostra. Nesse ambiente, um microfone ultrasensível detecta essas ondas e gera o sinal fotoacústico, que representa o espectro da amostra (GORDILLO-DELGADO et al., 2012; MICHAELIAN, 2010).

Uma limitação atual das técnicas espectroscópicas em geral é a dispersão de luz. Por outro lado, tais interferências não ocorrem na espectroscopia fotoacústica desde que a luz absorvida pela amostra seja convertida em sinal. Do ponto de vista operacional, a técnica de fotoacústica não exige uma preparação rigorosa da amostra e é uma análise não destrutiva (MICHAELIAN, 2010).

A PAS fornece espectros de absorção óptica de sólidos, semi-sólidos, líquidos e gases, e oferece uma grande vantagem na análise de amostras opticamente opacas. O sinal fotoacústico contém informações de camadas superficiais e internas das amostras, o que permite a avaliação de materiais com gradiente composicional (GORDILLO-DELGADO et al., 2012; MICHAELIAN, 2010).

Além de análises espectroscópicas de caracterização, a espectroscopia Fotoacústica tem sido aplicada em diversos estudos para a determinação de amostras “*in vivo*”, “*ex vivo*” ou “*in vitro*”, bem como da taxa de penetração de medicamentos e/ou protetores solares na pele humana ou em anexos. A possibilidade da realização de medidas de perfil de profundidade ao longo da amostra é uma característica única desta técnica, devido ao fato da detecção ser realizada a partir do calor gerado na amostra via relaxação não radiativa e não a partir da transmitância, refletância ou fluorescência (SEHN et al., 2005; SEHN, 2004; NUGLISCH, et al., 2005).

Para cada proposição de estudo utilizando a técnica de fotoacústica é importante estabelecer previamente as regiões espectrais. Na região do ultravioleta e visível (UV-VIS), os mecanismos responsáveis pela absorção da luz são governados essencialmente por processos que envolvem transições eletrônicas. Nestes casos, o espectro fotoacústico permite obter as bandas de absorção óptica associadas às moléculas, aglomerados ou íons presentes na amostra (GASPARRI; MUZIO, 2003).

3.6.1 Efeito fotoacústico

Alexandre Graham Bell descobriu o efeito fotoacústico em 1880. Ele observou que efeitos sonoros podiam ser ouvidos quando um feixe de luz solar modulado incidia

sobre um sólido posicionado em uma câmara fechada (ROSENCWAIG; GERSHO, 1976)

Graham Bell fez experimentos subsequentes com uma variedade de sólidos, líquidos e gases. Em seus experimentos foi possível observar que os efeitos sonoros induzidos dependiam da natureza das substâncias expostas à radiação e ainda do respectivo comprimento de onda utilizado (ROSENCWAIG; GERSHO, 1976).

Em 1973, Allan Rosencwaig e Allen Gersho foram responsáveis pelo desenvolvimento do modelo teórico para descrever o efeito fotoacústico gerado em amostras sólidas. Neste modelo eles obtiveram como resultado equações analíticas que permitiam determinar as propriedades ópticas e térmicas das amostras. Da realização deste modelo, a espectroscopia fotoacústica tornou-se uma ferramenta valiosa para o estudo de materiais. Entre outros fatores, os autores destacaram a possibilidade do método fornecer o perfil de profundidade de centros absorvedores distribuídos ao longo da espessura das amostras (SEHN, 2006; ASTRATH, 2007).

O modelo permitia a utilização de equações analíticas para descrever o comportamento do sinal fotoacústico tanto em termos da potência de luz incidente, como da frequência de sua modulação. Em seus experimentos, foi possível demonstrar que o sinal fotoacústico era o resultado do fluxo periódico de calor, induzido após a incidência de luz entre a superfície da amostra e o gás contido na célula fotoacústica, relacionando portanto, um fenômeno fototérmico (SEHN, 2006; ASTRATH, 2007; ASTRATH, 2011).

O efeito fotoacústico consiste na geração de uma onda acústica e pode ser observado quando a luz modulada é absorvida por uma amostra posicionada dentro de uma célula fechada contendo gás, que pode ser o próprio ar (SONG; WANG, 2013).

A incidência da luz e sua consequente absorção resultam em excitação dos níveis de energia da amostra. Como consequência ocorrerá relaxação, que se for não radiativa, induzirá geração de calor no material. Ao se utilizar excitação modulada, este aquecimento torna-se periódico, gerando uma onda de pressão no gás em contato com a amostra. Um microfone acoplado na câmara fotoacústica detecta esta variação da pressão, produzindo o sinal fotoacústico. Sua intensidade depende da frequência de modulação da luz incidente. Portanto, o sinal fotoacústico é o resultado da interação da radiação com a matéria. Sua natureza é definida pelas propriedades ópticas e térmicas das amostras (SEHN, 2006; ASTRATH, 2007; ASTRATH, 2011).

3.6.2 Sinal fotoacústico

O sinal fotoacústico é gerado pela variação de pressão do gás no interior da célula fotoacústica. Um fato importante é que o sinal fotoacústico é processado por um analisador síncrono, o *lock-in*, que sincroniza os sinais elétricos provenientes do microfone e do modulador da luz. Isto significa que o sinal processado é o componente não temporal da variação da pressão na célula. A fase é o atraso temporal entre o sinal elétrico do modulador e o sinal proveniente do microfone. Este atraso está ligado com o intervalo de tempo entre o instante em que ocorre a absorção da radiação pela amostra até aquele instante no qual a variação de pressão no gás é detectada pelo microfone. Em outras palavras, está ligado ao valor do tempo de relaxação não radiativa do centro absorvedor na amostra (SEHN, 2006; ASTRATH, 2007; ASTRATH, 2011).

A amplitude e a fase são os principais parâmetros em medidas experimentais com a fotoacústica. A intensidade do sinal depende linearmente da potência luminosa e do inverso do comprimento da coluna de gás (SONG; WANG, 2013).

O sinal depende ainda do comprimento de onda utilizado e da frequência de modulação com que esta radiação chega até o material a ser estudado. O caráter modulado da radiação influencia diretamente a intensidade do sinal, via comprimento de difusão térmica, μs . Por outro lado, a fase do sinal fotoacústico independe da potência incidente. Ela é diferente para cada comprimento de difusão térmica, μs , variando com a profundidade onde há geração de calor. Além disso, ela depende do tempo de relaxação não radiativa de cada centro absorvedor na amostra (SEHN, 2006; ASTRATH, 2007; ASTRATH, 2011; SONG; WANG, 2013).

3.6.3 Mecanismos de geração do sinal fotoacústico

A geração do sinal fotoacústico pode ocorrer por pelo menos quatro mecanismos principais, sendo eles: difusão térmica; expansão térmica; efeito termoelástico e efeito fotobárico (ROSENCWAIG; GERSHO, 1976).

Difusão térmica: o calor periódico local produzido na amostra se difunde através do material até atingir a interface amostra-gás. Há então o aquecimento de uma fina camada de gás em contato com a amostra que passa a se expandir e a se

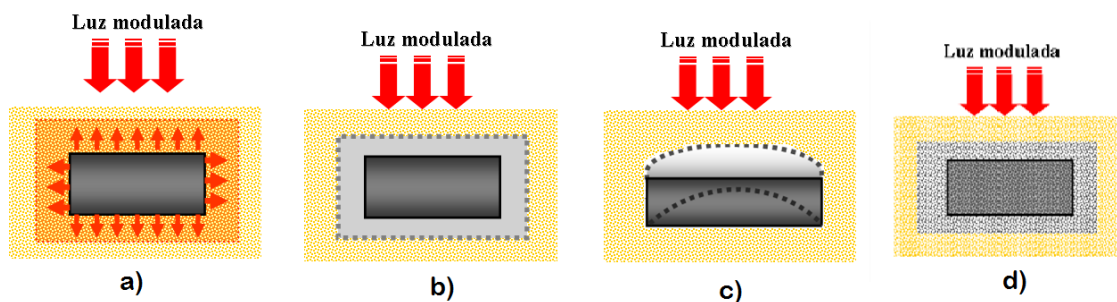
contrair periodicamente como um pistão vibratório gerando uma onda de pressão no interior da câmara fechada, Figura 4.a (PEREIRA, 1994).

Expansão térmica: neste mecanismo, a própria amostra se expande e contrai devido ao aquecimento periódico causado pela absorção da luz modulada. Deste modo o movimento da superfície da amostra atua sobre a coluna de gás gerando nele uma onda acústica, Figura 4.b. A intensidade do sinal é governada pelo coeficiente de expansão térmica do material.

Efeito termoelástico: este tipo de mecanismo está presente em amostras cuja absorção de radiação modulada gera um gradiente de temperatura perpendicular a seu plano. Estando as bordas da amostra fixas, sua superfície irá flexionar periodicamente gerando uma onda de pressão no gás, Figura 4.c (ROUSSET; LEPOUTRE; BERTRAND, 1983).

Efeito Fotobárico: refere-se à variação adicional do sinal fotoacústico induzida pelo volume de gás residual gerado no interior da célula fotoacústica por amostras fotoquimicamente ativas, ou seja, com trocas gasosas entre a amostra e o gás da célula fotoacústica, Figura 4.d. Por exemplo, folhas de plantas que liberam oxigênio quando realizam fotossíntese (BULTS et al., 1982; PEDROCHI, 2008).

Figura 4: Mecanismos de geração do sinal fotoacústico: a) difusão térmica; b) expansão térmica; c) efeito termoelástico; d) efeito fotobárico.



Fonte: Adaptado de ASTRATH, 2011

3.6.4 Comprimento de difusão térmica: perfil de profundidade

A importância da determinação da difusividade térmica está intimamente ligada ao procedimento de PAS, já que a partir do momento em que se escolhe uma frequência de modulação no experimento de PAS, a difusividade térmica de um dado material é capaz de fornecer a camada da amostra (no lado da incidência da luz) que

a radiação absorvida é convertida em calor para formação do sinal fotoacústico (SEHN, 2006; ASTRATH, 2007; ASTRATH, 2011).

Por definição, a difusividade térmica, D_s , é a condutividade térmica dividida pela densidade e capacidade específica de calor a pressão constante, e representa a capacidade de um material de conduzir energia térmica em relação à sua capacidade de armazenar energia térmica (CIRIELLO et al., 2015).

Valores precisos de difusividade térmica podem resultar em modelagem térmica de pré-tratamento eficiente e planejamento de tratamento, menos ajustes improvisados durante os tratamentos, maior eficácia e segurança no tratamento de dados (HASGALL et al., 2013).

A difusão térmica num dado material pode ser monitorada mediante a medida da velocidade com que o calor se propaga neste meio, sendo que a propriedade térmica medida é a própria difusividade térmica, D_s , que descreve processos transientes ou periódicos de transmissão de calor. Além desse parâmetro tem-se a condutividade térmica que é definida a partir do fluxo de calor na amostra (SEHN, 2006; ASTRATH, 2007; ASTRATH, 2011; SONG; WANG, 2013).

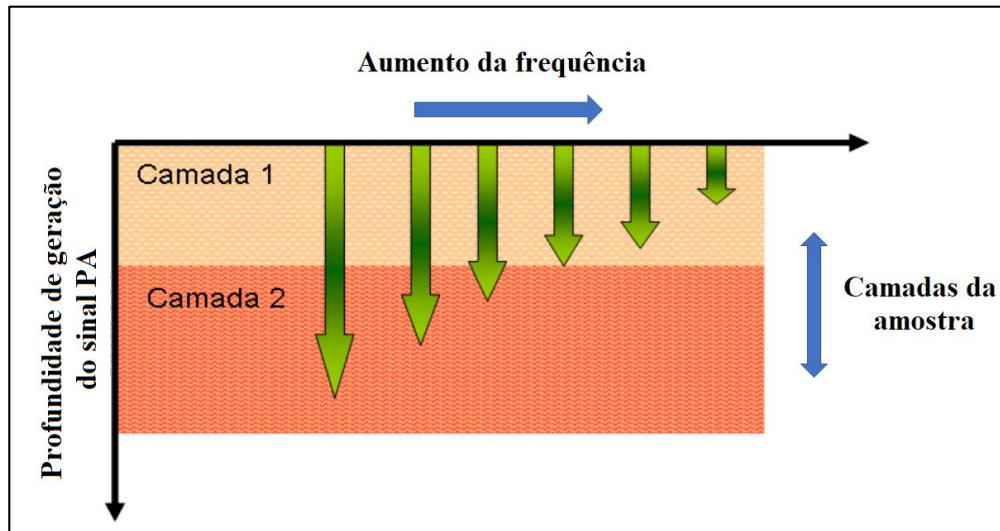
A difusão térmica em um dado material é governada pelo grau de cristalinidade e imperfeições na sua estrutura. Um pulso ocorre quando o calor gerado em um dado ponto da amostra se propaga para outros pontos, que sofrem uma elevação e subsequente queda na temperatura. Pode-se definir o comprimento de difusão térmica da amostra, (μ_s), Equação 1, o que permite avaliar a profundidade encontrada da amostra mediante uma frequência utilizada gerada na técnica fotoacústica (DIAS, 2001; OLENKA, 1996; SEHN et al., 2003). Na Equação 1, valor de f pode ser entendido como a frequência de modulação da luz incidente e o valor de D_s refere-se a difusividade térmica.

$$\mu_s = \sqrt{\frac{D_s}{\pi f}} \quad (1)$$

A Figura 5 representa o perfil de penetração da amostra em relação a variação da frequência estipulada na técnica. As setas representam as profundidades até onde o sinal fotoacústico é gerado para a respectiva frequência de modulação. Nesta figura,

pode-se observar que, quanto menor a frequência de modulação da luz maior será a profundidade de geração do sinal fotoacústico.

Figura 5: Esquema representativo da relação entre a frequência utilizada x penetração da amostra



Fonte: O autor

Após a radiação ser absorvida, acontecem processos de transferência da energia térmica que é gerada na profundidade atingida pela luz. A transmissão da energia térmica para o restante da amostra caracteriza a difusão térmica, que por sua vez, depende da profundidade do ponto de geração e da frequência de modulação da luz utilizada. O comprimento de difusão térmica, é definido como a profundidade na qual a onda de calor gerada pode-se propagar até a superfície contribuindo para a geração do sinal fotoacústico (SEHN, 2006; ASTRATH, 2007; ASTRATH, 2011).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 EQUIPAMENTOS

- Agitador mecânico (FISATOM, modelo 235, Diadema, Brasil);
- Analisador de umidade por infravermelho (SHIMADZU, modelo MOC63u, Quioto, Japão);
- Balança analítica (CELTAC, modelo FA2104N, São Paulo, Brasil);
- Centrífuga para tubos (BIO ENG, modelo BE-4004, São Paulo, Brasil);
- Destilador de água (FANEM LTDA, modelo 724/2-A, São Paulo, Brasil);
- Difratorômetro de raio-X (Rigaku, modelo ultima IV, Quioto, Japão);
- Espectrofotômetro na região do ultravioleta-visível (THERMO FISHER SCIENTIFIC, Genesys 10 UV Scanning, Madison, Estados Unidos);
- Espectrômetro infravermelho com transformada de Fourier (SHIMADZU, modelo IR Prestige-21, Quioto, Japão);
- Espectroscópio fotoacústico – Lâmpada de xenônio de 1000 W (66926 da Newport Corporation/Oriel);
- Espectroscópio fotoacústico - Chopper (SR540 Stanford Research System);
- Espectroscópio fotoacústico - Amplificador *lock-in* de duas fases (SR830 da Stanford Research System);
- Espectroscópio fotoacústico - Monocromador (74100 da Newport Corporation/Oriel);
- Espectroscópio fotoacústico - Microfone (4953 da Brüel & Kjaer);
- Espectroscópio fotoacústico - Pré-amplificador (2669-L da B&K) e canal de condicionamento (2690-A-0S1 da B&K);
- Estufa (QUIMIS, modelo Q-136M4, Diadema, Brasil);
- Metalizador (SHIMADZU, modelo IC-50 Ion Coater, Quioto, Japão);
- Microscópio eletrônico de varredura com fonte de emissão por efeito de campo (TESCAN, modelo MIRA 3, Brno, República Checa);
- Placa de agitação e aquecimento (FISATOM, modelo Q261-22, Diadema, Brasil)

4.2 REAGENTES E SOLVENTES

4.2.1 Fármaco

- ADAP (99,13% de pureza, Fagron S.A., Rotterdam, Holanda);

4.2.2 Polímero

- Poli(ϵ -caprolactona) (M_w 14.000 g.mol⁻¹, Sigma-Aldrich®, São Paulo, Brasil);
- Poli (álcool vinílico) (Pval) (M_w 67.000 g.mol⁻¹, 88,5 mol% de hidrólise, Vetec, Rio de Janeiro, Brasil);

4.2.3 Água purificada

- Água purificada pelo processo de destilação (H₂O destilada), em equipamento tipo Pilsen (Fanem LTDA, modelo 724/2-A, São Paulo, Brasil);

4.2.4 Solventes e demais reagentes

- Diclorometano (CH₂Cl₂) (Hexis Científica S/A, Indaiatuba, Brasil);
- Brometo de potássio grau espectroscópico (KBr) (Aldrich Co., St. Louis, Estados Unidos);
- Monooleato de sorbitano etoxilado (polissorbato 80, Tween® 80, Delaware, Porto Alegre, Brasil);
- Propilenoglicol (C₃H₈O₂) (Synth S/A, Diadema, Brasil);
- Acetona (C₃H₆O) (Synth S/A, Diadema, Brasil);

4.2.5 Materiais

- Strat M® membrane, Merck.

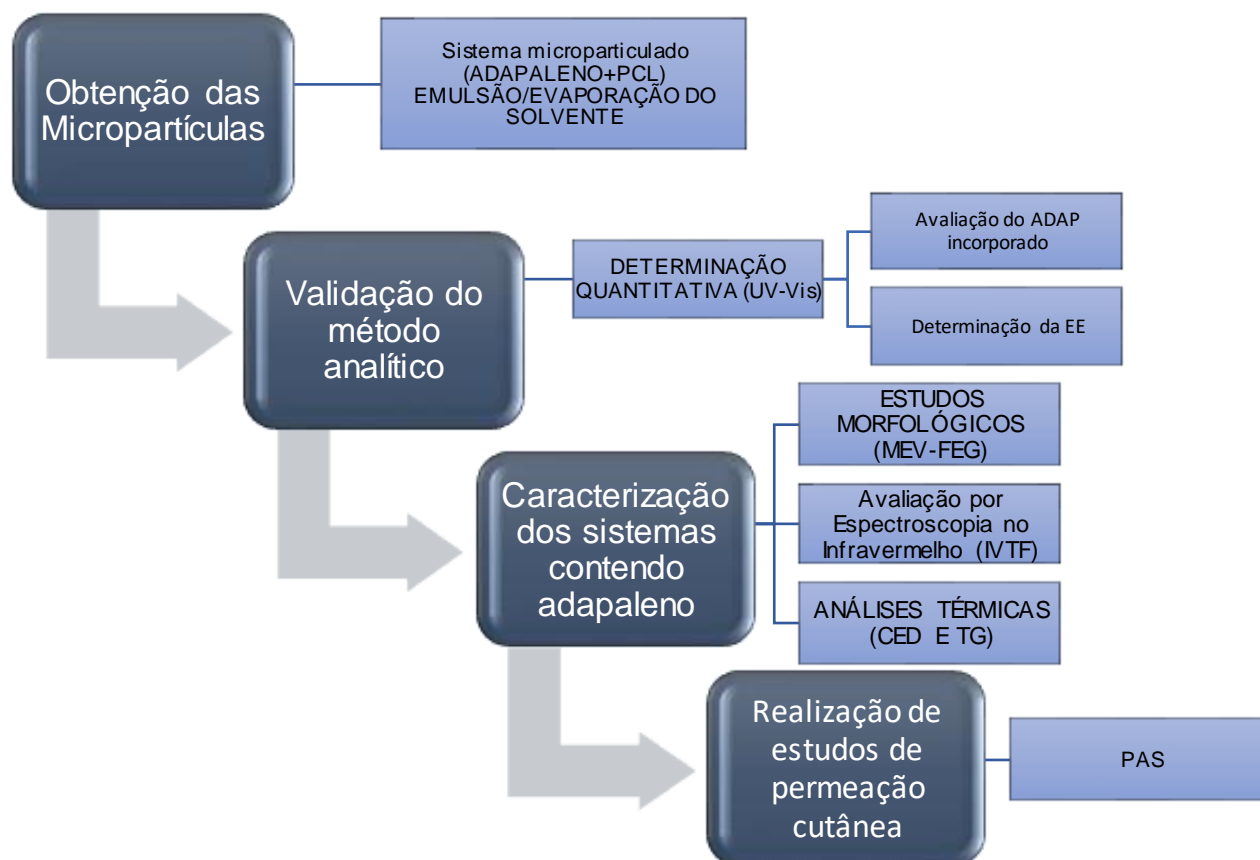
4.3 DESENHO EXPERIMENTAL

Em trabalho prévio (CAMARGO, 2017), nosso grupo de pesquisa elaborou formulações de micropartículas poliméricas de ADAP pelo método de emulsão/evaporação do solvente orgânico, seguido de estudos de caracterização das formulações obtidas.

Nesta dissertação de mestrado, foram realizados testes de permeação cutânea “*in vitro*” destas micropartículas com o uso da técnica de espectroscopia fotoacústica (PAS).

Este projeto teve início com a síntese das micropartículas poliméricas, tanto das formulações contendo o fármaco, como o controle sem o ativo. Em seguida as micropartículas foram caracterizadas por métodos morfológicos, espectroscópicos e térmicos. A quantificação de fármaco incorporado nas partículas foi realizada por meio da espectroscopia de UV-VIS, validado de acordo com a Resolução 166, de 24 de julho de 2017, avaliando assim, a eficiência de encapsulação do ADAP. A avaliação de permeação do respectivo gel de cada formulação foi realizada com o uso da técnica de PAS a fim de se determinar a capacidade de permeação de cada gel, com o intuito de se promover a validação da técnica de PAS. As etapas estão esquematizadas no fluxograma da Figura 6.

Figura 6: Fluxograma das etapas da pesquisa



Fonte: O autor

4.4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.4.1 Preparação das micropartículas poliméricas contendo ADAP

Para a obtenção das micropartículas foi utilizado o polímero PCL contendo o fármaco ADAP, que foram preparados pela metodologia da emulsão simples, seguida pela evaporação do solvente orgânico. Primeiramente foram preparadas as soluções utilizadas para o desenvolvimento. O fármaco e o polímero foram dissolvidos em diclorometano, para a formação da fase orgânica (FO) que foi vertida em uma fase aquosa (FA) composta por poli (álcool vinílico) (Pval) e polissorbato 80, sob agitação intensa ($5.000 \text{ rev.min}^{-1}$) por 5 min. A emulsão formada foi mantida em agitação (800 rev.min^{-1}) por um período de 4 horas para total evaporação do solvente. Após esse

tempo, as micropartículas foram separadas por centrifugação (2.000 rev.min⁻¹, por 5 min) e lavadas 3 vezes, com água purificada para remoção do Pval aderido na superfície das partículas. Em seguida, todas as micropartículas foram secas em estufa a 35 ± 1°C e armazenados a temperatura ambiente. Todas as formulações foram preparadas em duplicata (n=2).

As diferentes formulações (Tabela 1) foram obtidas em concentrações teóricas de 10 e 20% de ADAP em sua composição (F10, e F20 respectivamente). Paralelamente, foi preparada uma formulação contendo todos os componentes da formulação, exceto o ADAP, denominada formulação controle (F0).

Tabela 1: Formulação das micropartículas contendo o fármaco, obtidas pelo método de emulsão simples seguida de evaporação do solvente

Composição	Formulação		
	F0 (0%)	F10 (10%)	F20 (20%)
Fase aquosa			
Polissorbato 80 (g)	0,5	0,5	0,5
Solução de Pval 2% (ml)	200	200	200
Fase orgânica			
ADAP (g)	-	0,2	0,4
PCL (g)	2	1,8	1,6
Diclorometano (ml)	40	40	40

Fonte: O autor

4.4.2 Mistura física

A mistura física (MF) na proporção, em massa, de 1:1 (ADAP:PCL) (50% m/m) foi preparada para uma caracterização comparativa.

4.4.3 Rendimento

O rendimento foi calculado pela razão entre a massa obtida após a preparação das micropartículas, pela soma das massas do polímero, fármaco e do tensoativo polissorbato 80 (Tween® 80), excluindo os demais componentes, conforme apresentado na Equação 2 a seguir, onde R, representa o rendimento obtido:

$$R = \frac{m_{micro}}{m_{PCL} + m_{ADA} + m_{ps80}} \times 100 \quad (2)$$

4.4.4 Determinação do teor de umidade

O conteúdo de água presente no ADAP puro, na PCL e nas micropartículas F0, F10 e F20 foram determinados por analisador de umidade por infravermelho (SHIMADZU, modelo MOC63u, Quioto, Japão), previamente calibrado conforme as indicações do fabricante.

Para cada amostra, uma massa exata, de aproximadamente 0,050 g foi colocada em um prato de alumínio e mantida em aquecimento a 105°C, até peso constante, resultando no teor de umidade expresso em porcentagem. Os ensaios foram realizados em triplicata (n=3).

4.4.5 Caracterização físico-química das micropartículas

4.4.5.1 Microscopia eletrônica de varredura com fonte de emissão por efeito de campo – (MEV-FEG)

A avaliação morfológica e de superfície dos materiais de partida e das micropartículas preparadas foram realizadas em microscópio eletrônico de varredura por emissão de campo (TESCAN, modelo Mira 3, Brno, República Tcheca). As amostras foram submetidas à metalização com ouro em metalizador IC-50 Ion Coater (SHIMADZU, Quioto, Japão). Para obtenção das eletromicrografias, foi empregada voltagem de aceleração de 15 kV e utilizado software específico (Electron Optical Design).

4.4.5.2 Determinação do tamanho de partícula

O tamanho das partículas foi estimado a partir da medição de 100 partículas, de formato esférico, encontradas numa área escolhida em micrografias ampliadas com o uso da técnica de MEV-FEG, utilizando uma ampliação de 2000x.

4.4.5.3 Avaliação por espectroscopia na região do infravermelho por transformada em Fourier - FTIR

As micropartículas poliméricas foram analisadas por espectroscopia na região do infravermelho, utilizando pastilhas de brometo de potássio (KBr), empregando 4 mg de cada amostra e 196 mg de KBr grau espectroscópico (2%, m/m), no equipamento IR Prestige-21 (SHIMADZU, Quito, Japão), na faixa de 4000-400 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} e 32 scan.min^{-1} . Os espectros obtidos foram avaliados frente aos espectros do fármaco puro, PCL, MF e das formulações sem a adição do fármaco (F0) e com 10 e 20% de fármaco (F10 e F20).

4.4.5.4 Calorimetria exploratória diferencial (CED)

As amostras foram colocadas em célula calorimétrica de alumina. O instrumento STA 6000 (Perkin Elmer, Waltham, MA, Estados Unidos) foi calibrado usando índio (In; P.F.= 156,6°C; $\Delta H_{\text{fusão}} = 28,54 \text{ J.g}^{-1}$) como padrão. As amostras foram aquecidas a uma taxa constante de 10 $^{\circ}\text{C.min}^{-1}$, de 20 a 600 $^{\circ}\text{C}$, sob fluxo de nitrogênio (50 mL.min^{-1}) constante.

4.4.5.5 Termogravimetria (TG)

A análise termogravimétrica foi realizada no equipamento, STA 6000 (Perkin Elmer, Waltham, MA, Estados Unidos), utilizando célula calorimétrica de alumina, onde as amostras foram aquecidas a uma taxa constante de 10 $^{\circ}\text{C.min}^{-1}$, de 20 a 600 $^{\circ}\text{C}$, sob fluxo de nitrogênio (50 mL.min^{-1}) constante.

4.4.6 Validação do método analítico para quantificação do ADAP

A validação do método analítico foi efetuada pelo aluno de graduação GUILHERME DOS ANJOS CAMARGO durante seu trabalho de conclusão de curso em 2017 (CAMARGO, 2017). Para se garantir a qualidade e confiabilidade nos resultados obtidos dentro da pesquisa científica, faz-se necessário o uso de métodos que atendam estas exigências e, ainda, sejam de fácil execução e baixo custo. O processo de validação é responsável por garantir que os resultados obtidos sejam

condizentes com a real situação de pesquisa obtida (RIBANI, et al., 2004). Segundo a Resolução da Diretoria Colegiada Nº 166, de 24 de julho de 2017, a validação deve comprovar que o método analítico empregado produz resultados confiáveis e é adequado para o fim ao qual foi destinado e, para isso, deve respeitar rigorosamente alguns parâmetros, estabelecidos por esta resolução.

No Brasil existem dois órgãos responsáveis por determinar parâmetros de validação: a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) e o INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial). Em âmbito mundial, na tentativa de minimizar as divergências que ocorrem entre diferentes organizações, representantes das indústrias e agências reguladoras dos Estados Unidos, Europa e Japão criaram a ICH (International Conference on Harmonization) que apresenta parâmetros próprios a serem seguidos (RIBANI et al., 2004).

O método foi validado conforme o preconizado na Resolução RE nº 166, de 24 de Julho de 2017 e com as recomendações da ICH (The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use). Os parâmetros avaliados foram seletividade, linearidade e faixa de trabalho, limite de quantificação (LQ) e detecção (LD), precisão e exatidão.

Inicialmente foram preparadas as soluções padrão e amostras. Para a solução padrão utilizou-se 10 mg de fármaco, que foi dissolvido em 20 mL de acetona num balão volumétrico de 100 mL e deixado sob agitação por 30 minutos em temperatura ambiente. Decorrido esse tempo, acrescentou-se etanol, permanecendo por mais 10 minutos em agitação para total dissolução do fármaco. Por fim, o volume do balão foi completado com etanol e a solução obtida filtrada. Para o preparo das soluções amostras, pesou-se o equivalente a 10 mg de fármaco de cada uma das formulações F10 e F20 e transferiu-se para balões volumétricos de 100 mL cada. Em seguida, foi acrescentado 20 mL de acetona e deixado sob agitação por 4 horas em temperatura ambiente. Na sequência, foi adicionado etanol, permanecendo por mais 20 horas sob agitação para total extração e dissolução do fármaco. Ao final das 24 horas, completou-se o volume dos balões com etanol e filtrou-se as soluções obtidas.

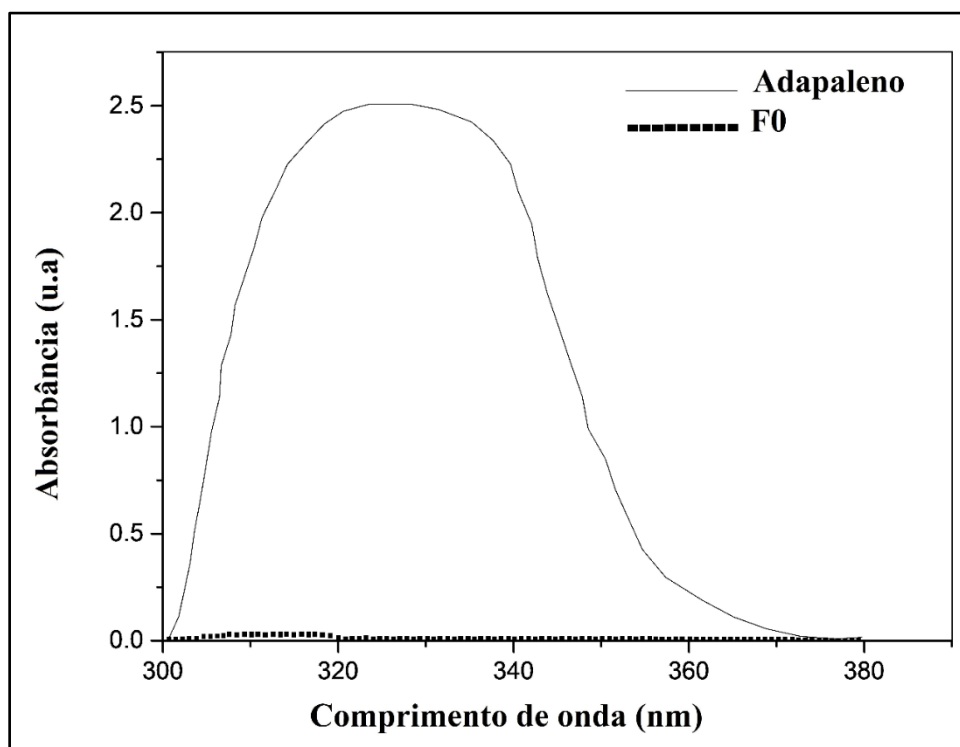
A seletividade deve assegurar a capacidade do método de identificar ou quantificar a substância em estudo, em meio a qualquer outro componente que não se tenha interesse, como impurezas, diluentes e componentes de matriz. Além de assegurar resultado positivo para o analito e negativo para as demais substâncias

(BRASIL, 2017), a seletividade certifica que a resposta gerada como resultado seja exclusiva da amostra de interesse (RIBANI et al., 2004).

A seletividade foi determinada a partir da comparação do espectro gerado pela solução padrão e a solução amostra da formulação F0. Ambas as soluções foram submetidas a varredura no espectrofotômetro na faixa entre 300 e 400 nm. Para estabelecer a linha de base do equipamento, foi utilizada uma solução contendo 20% de acetona em etanol.

O método desenvolvido para quantificação do ADAP mostrou-se seletivo, já que não houve sobreposição de leitura da formulação F0 na mesma faixa de leitura do fármaco como pode ser observado na Figura 7, indicando que nenhum componente da formulação apresentou absorção da radiação eletromagnética neste intervalo de comprimento de onda.

Figura 7: Espectro de absorção do ADAP e formulação de micropartículas F0



Fonte: CAMARGO, 2017

A linearidade do método foi avaliada por meio da construção de uma curva de calibração, em triplicata. Para isso, os pontos da curva foram obtidos a partir de diluições da solução padrão em etanol, conforme representados na Tabela 2, e lidos em espectrofotômetro em 321 nm. A faixa de trabalho foi definida com base na

concentração teórica da solução amostra de $8 \mu\text{g.mL}^{-1}$, contemplando um intervalo de $4 \mu\text{g.mL}^{-1}$ a $12 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

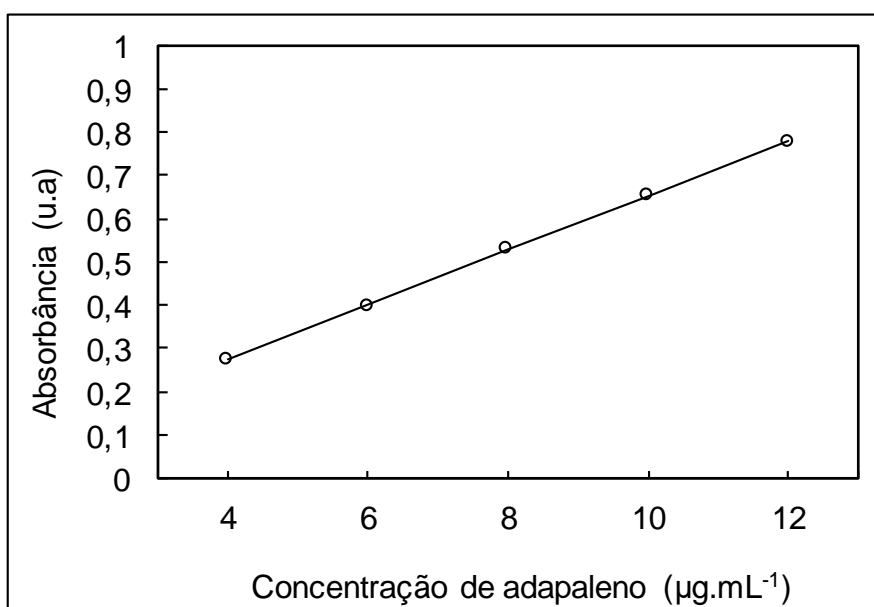
Tabela 2: Concentrações utilizadas para realização da curva analítica

Volume da solução mãe (μL)	Volume final - balão volumétrico (ml)	Concentração final ($\mu\text{g/ML}$)
400	10	4
600	10	6
800	10	8
1000	10	10
1200	10	12

Fonte: O autor

A linearidade de um método deve ser compreendida como a capacidade do mesmo em obter respostas proporcionalmente equivalentes a concentração do analito em estudo, dentro de uma determinada faixa de trabalho definida. Para isso, o teste foi realizado em cinco concentrações diferentes do analito. A curva analítica média obtida está representada na Figura 8.

Figura 8: Representação gráfica da curva analítica padrão para a determinação de ADAP obtida por UV-Vis na faixa de concentração de 4 a $12 \mu\text{g.mL}^{-1}$.



Fonte: CAMARGO, 2017

Por meio da análise de regressão linear, foram obtidos os valores de coeficiente angular (inclinação da reta), coeficiente linear (intercepção com o eixo y) para poder estimar a absorvância de ADAP. Observou-se um coeficiente de determinação (r^2) de regressão linear próximo de 1, o que evidencia a qualidade de regressão e a pequena dispersão entre os pontos, garantindo confiança aos resultados (BRASIL, 2017; RIBANI et al., 2004). Os resultados obtidos estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3: Dados obtidos por meio da análise da regressão linear

Parâmetros	Resultados
Faixa de trabalho	4 a 12 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
Equação da reta ($y= ax +b$)	$y = 0,0672x + 0,0023$
Inclinação da reta (a)	0,0672
Intercepto com o eixo y (b)	0,0023
Coeficiente de determinação (r^2)	0,9998

Fonte: CAMARGO, 2017

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram calculados a partir dos parâmetros de três curvas analíticas, conforme representado nas Equações 3 e 4, em que σ é o desvio padrão dos coeficientes lineares e IC é a média dos coeficientes angulares das curvas:

$$LD = \left(\frac{3,3\sigma}{IC} \right) \quad (3)$$

$$LQ = \left(\frac{10\sigma}{IC} \right) \quad (4)$$

O Limite de Detecção (LD) refere-se a menor concentração de analito possível de se detectar. Por outro lado, o Limite de Quantificação (LQ) é a menor quantidade de substância que a metodologia utilizada consegue quantificar com precisão e exatidão (BRASIL, 2017; RIBANI et al., 2004). Os valores de LD e LQ encontrados foram, respectivamente, 0,28 e 0,86 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, assegurando a viabilidade de aplicação do método dentro da faixa de trabalho definida.

A repetibilidade foi avaliada por meio da análise de três concentrações diferentes (4, 8 e 12 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), totalizando nove determinações em diferentes períodos de um mesmo dia (manhã, tarde e noite), pelo mesmo analista, utilizando um mesmo instrumento. A precisão intermediária foi determinada pela análise nas mesmas concentrações utilizadas para a repetibilidade, porém as medidas foram realizadas em dias diferentes, com analistas diferentes, ainda empregando o mesmo instrumento. Os resultados destas análises foram expressos na forma de Desvio Padrão Relativo (DPR), de acordo com a equação abaixo (5), onde DP é o desvio padrão da série de medições e CMD a concentração média determinada.

$$DPR = \left(\frac{DP}{CMD} \right) \times 100 \quad (5)$$

A RDC Nº 166/2017 descreve que a precisão deve ser capaz de avaliar a proximidade entre os valores encontrados nos experimentos e deve ser expressa como repetibilidade e precisão intermediária. A repetibilidade mostra a concordância entre os resultados encontrados para um mesmo método, executado nas mesmas condições, em um breve intervalo de tempo. Enquanto a precisão intermediária mostra o efeito das variações, dentro de um mesmo laboratório, considerando dias diferentes de execução do método e analistas operadores (BRASIL, 2017; RIBANI et al., 2004). Os resultados de repetibilidade e precisão intermediária obtidos para o método desenvolvido encontram-se na Tabela 4.

Tabela 4: Resultados da repetibilidade e precisão intermediária

Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Absorbância média \pm desvio padrão (n=3)	Desvio padrão
<i>Repetibilidade</i>		
4	0,26 \pm 0,010	0,04
8	0,56 \pm 0,026	0,05
12	0,81 \pm 0,020	0,02
<i>Precisão intermediária</i>		
4	0,25 \pm 0,001	0,01
8	0,59 \pm 0,010	0,02
12	0,81 \pm 0,038	0,05

Fonte: CAMARGO, 2017

A Tabela 4 demonstra que os valores de desvio padrão relativo obtidos foram inferiores a 5,0%, portanto, o método foi considerado preciso.

A exatidão foi determinada aplicando o método proposto na análise da amostra, na qual quantidade conhecida do fármaco foi adicionado à solução do produto final. As amostras para este teste foram preparadas a partir de triplicatas das soluções padrão e soluções amostras das formulações F10 e F20, conforme descrito na Tabela 5, seguidas da leitura em espectrofotômetro em comprimento de onda de 321 nm.

Tabela 5: Concentrações utilizadas para teste de exatidão do método

Volume da solução padrão (µl)	Volume da solução amostra (µl)	Volume final - balão volumétrico (ml)	Concentração final (µg/ML)
400	200	10	6
600	200	10	8
800	200	10	10

Fonte: O autor

Os resultados da exatidão foram expressos na forma de porcentagem de recuperação do analito, a partir da Equação 6, em que C_{exp} refere-se a quantidade de ADAP encontrada e C_{teo} referindo-se a concentração teórica de ADAP.

$$EE = \left(\frac{C_{exp}}{C_{teo}} \right) \times 100 \quad (6)$$

Os resultados encontrados para a exatidão comprovaram a concordância entre os dados obtidos frente a um valor de referência real. A Tabela 6 descreve os dados do estudo, para a formulação F10 foram encontrados os valores de porcentagem de recuperação do fármaco entre 97,05% e 102,92% para as diferentes concentrações avaliadas. Para a F20 foram encontrados valores entre 98,74% e 99,03% para o mesmo parâmetro.

Tabela 6: Recuperação do ADAP adicionado à formulação analisada pelo método proposto

Concentração da solução padrão adicionada ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Concentração da solução amostra adicionada ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Concentração final de ADAP ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Absorbância \pm desvio padrão	Recuperação (%)
F 10				
4	2	5,82	$0,39 \pm 0,01$	97,05
6	2	8,23	$0,55 \pm 0,01$	102,92
8	2	10,15	$0,68 \pm 0,03$	101,53
F 20				
4	2	5,94	$0,40 \pm 0,02$	99,03
6	2	7,9	$0,53 \pm 0,01$	98,74
8	2	9,89	$0,66 \pm 0,02$	98,93

n= média de 3 determinações

Fonte: CAMARGO, 2017

Considerando os resultados obtidos o método foi considerado seletivo, linear para a faixa de aplicação proposta, preciso e exato, portanto, está devidamente validado. Diante do exposto é possível concluir que trata-se de um método capaz de quantificar o ADAP incorporado nas micropartículas fornecendo resultados confiáveis.

4.4.6.1 Quantificação do ADAP incorporado nas micropartículas

Após a realização da validação do método analítico foi possível proceder com a determinação do fármaco incorporado nas micropartículas a partir dos ensaios de quantificação desenvolvidos por espectrofotometria na região do ultravioleta, em equipamento THERMO FISHER SCIENTIFIC (Genesys 10 UV Scanning, Madison, Estados Unidos). A taxa de incorporação do fármaco foi calculada a partir da razão entre massa de fármaco obtida para as formulações em relação a massa inicial de fármaco adicionado em cada formulação, conforme descrito na Equação 7. As análises foram realizadas em triplicata.

$$\text{Taxa de incorporação} = \frac{M_{\text{adap}}}{M_{\text{teo}}} \times 100 \quad (7)$$

Os resultados da quantificação do fármaco estão resumidos na Tabela 7. Foi possível verificar que as duas formulações obtiveram eficiência de encapsulação acima de 99%. Isso se deve ao fato de que o método empregado no preparo das micropartículas (emulsão simples/evaporação do solvente orgânico) é adequado para fármacos altamente lipofílicos e otimiza a encapsulação nas micropartículas.

O valor de eficiência de encapsulação encontrado acima de 100% na formulação F10 pode ser justificado por uma possível perda de polímero durante o processo de evaporação do solvente e pelo baixo rendimento na formulação.

Tabela 7: Teor de ADAP incorporado nas micropartículas de PCL ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) e eficiência de encapsulação (EE, %)

Formulação	Concentração teórica de fármaco ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Concentração de fármaco incorporado nas micropartículas ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Eficiência de encapsulação (%)
F 10	8	8,36	104,44
F 20	8	7,95	99,37

Fonte: CAMARGO, 2017

4.4.7 Testes de permeação cutânea “*in vitro*”

Para a realização dos testes de espectroscopia fotoacústica (PAS) foi realizado o preparo de um gel de Natrosol (0,5%) de cada componente de interesse (ADAP, MF, F0, F10 e F20) para elucidação da permeação frente a membrana Strat M[®]. A formulação de cada gel pode ser observada na Tabela 8. Considerando que, para as micropartículas F10 e F20 foi realizada a correção do valor de suas respectivas massas conforme a eficiência de encapsulação obtida.

Tabela 8: Composição do gel teste a ser utilizado no ensaio de permeação

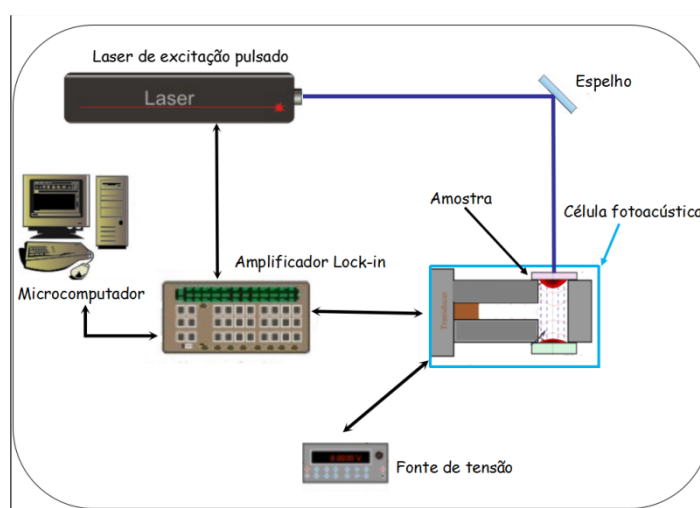
Gel	Componentes de cada gel teste					Gel de Natrosol 0,5%	
	Adap (g)	PCL (g)	F0	F10	F20		Propilenoglicol (ml)
ADAP	0,002					3	qsp. - 20 g
MF	0,002	0,002				3	qsp. - 20 g
F0			0,04			3	qsp. - 20 g
F10				0,02		3	qsp. - 20 g
F20					0,01	3	qsp. - 20 g

Fonte: O autor

4.4.7.1 Medida da difusividade térmica – OPC

A medida da difusividade térmica, pode ser obtida pelo uso da técnica de célula fotoacústica aberta (OPC), conforme representado na Figura 9.

Figura 9: Esquema representativo para medida de difusividade térmica utilizada no laboratório de espectroscopia óptica e fotoacústica (GEOFA) da UEPG



Fonte: O autor

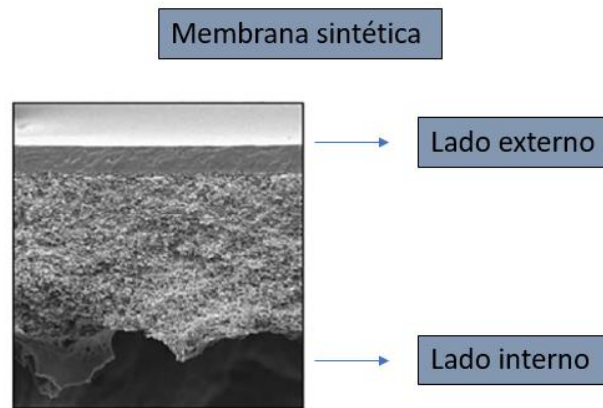
A luz proveniente do laser de diodo (modelo DHOM-T-473-200 com comprimento de onda de 473 nm e 200 mW de potência) incide sobre a amostra. A onda térmica gerada na superfície da amostra pela absorção da luz atravessa o material, é transmitida para a câmara fotoacústica (alimentada por uma fonte de tensão, 9 V), e produz uma variação de pressão no gás. O microfone de eletreto (Sennheiser, KE-4-211-2) detecta esta variação de pressão, a transforma num sinal elétrico amplificado, o qual é medido por meio de um aparelho *lock-in* (SR830-Stanford Research System). Este aparelho também controla a frequência do laser modulado via porta TTL (*Transistor Transistor Logic*). O computador comunica-se com o aparelho *lock-in*, que através de um software desenvolvido pelo GEOFA - UEPG (Grupo de espectroscopia óptica e fotoacústica do departamento de física da UEPG) gerencia a frequência de modulação desejada e faz a aquisição dos dados (amplitude e fase do sinal fotoacústico). Para cada frequência é realizada a média de 10 valores obtidos da amplitude e fase do sinal fotoacústico. Essa média é salva em um arquivo de extensão no formato (.dat) para posterior tratamento dos dados.

4.4.7.2 Espectroscopia fotoacústica – PAS

As medidas fotoacústicas foram realizadas em função de tempo referente a absorção do ADAP frente a membrana (Strat M®), que neste caso foi responsável por mimetizar as características da pele em suas duas camadas mais superficiais (epiderme e derme).

Realizou-se testes de permeação em dois tempos diferentes para cada gel, em 15 minutos e em 3 horas após a passagem do gel na membrana. Delimitou-se 4 frequências diferentes (5, 23, 51 e 203 Hz) de análise para visualização do sinal no lado interno da membrana e o uso da frequência de 23 Hz para visualização do sinal no lado externo da membrana. As questões de uso de lado externo e interno da membrana podem ser exemplificadas pelo fato de que o uso desta metodologia permite mensurar em que ponto da estrutura da membrana se tem a presença de medicamento. O lado externo refere-se ao lado mais superficial da membrana, simulando neste caso a epiderme humana, conforme demonstrado na Figura 10.

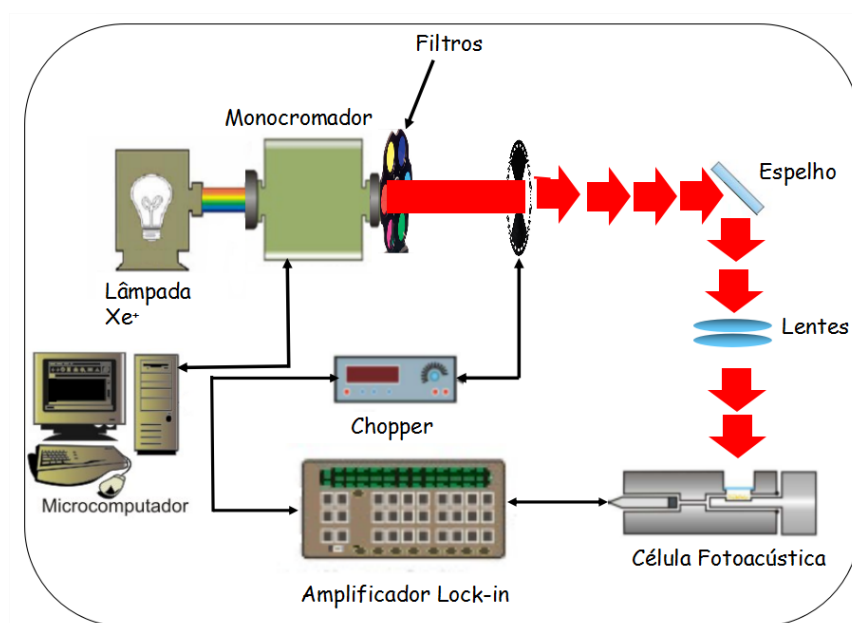
Figura 10: Esquema representativo da membrana sintética utilizada



Fonte: O autor

Na técnica utilizada, conforme apresentado na Figura 11, uma lâmpada de Xenônio com potência de 1000 W (66926 da Newport Corporation/Oriel), abrange comprimentos de onda específicos entre ultravioleta (UV) e infravermelho (IF) do espectro eletromagnético. A luz proveniente desta lâmpada é modulada por um *chopper* (SR540 Stanford Research System), com modulação da frequência de 4 Hz até 3,4 kHz, conforme as dimensões da pá giradora utilizada na modulação.

Figura 11: Montagem experimental da técnica de fotoacústica utilizada no laboratório multiusuário de propriedades termo-ópticas (LAPTO) – UTFPR



Fonte: O autor

Como a lâmpada de Xenônio não emite igualmente sinal de luz em todos os comprimentos de onda, faz-se necessário a normalização de todos os espectros fotoacústicos pelo espectro de emissão da mesma. Portanto, todos os espectros obtidos foram normalizados pelo espectro de um carvão puro, pois este material absorve toda radiação incidente na faixa de comprimentos de onda de interesse.

O sinal proveniente do modulador é fornecido para um canal de amplificação (amplificador *lock-in*, SR830 da Stanford Research System), e a luz modulada é então difratada, em um comprimento de onda selecionado por um monocromador (74100 da Newport Corporation/Oriel) que possui grades para visualização de comprimentos de onda na grandeza do ultravioleta /visível (UV/VIS), infravermelho próximo (IVP) e infravermelho médio (IVM).

A luz modulada percorre um caminho através de uma fenda estreita (tamanho de 3 mm), passa por filtros de ordem superiores de difração sendo então colimada por um espelho côncavo revestido com alumínio (distância focal efetiva 5 cm) e direcionada por duas lentes biconvexas de quartzo (distância focal efetiva 10 e 15 cm) até a amostra dentro da célula fotoacústica. A célula fotoacústica possui microfone (4953 da Brüel & Kjaer) que é capaz de gerar 50 mV/Pa com pré-amplificador (2669-L da B&K) e canal de condicionamento (2690-A-0S1 da B&K). O microfone também está conectado ao canal de referência do amplificador *lock-in* detectando assim, a intensidade e a fase do sinal fotoacústico. A célula fotoacústica projetada em alumínio possui uma janela óptica para a entrada de luz e o microfone é acoplado em seu interior.

Os dados obtidos referente ao sinal da amostra foram conduzidos a análise por meio de *software* específico que utiliza o algoritmo Levenberg Marquardt.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 OBTENÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS

O método utilizado garantiu com êxito a obtenção de micropartículas poliméricas de PCL contendo ADAP nas formulações (F10 e F20), bem como na formulação de controle negativo realizada (F0).

Após a etapa de secagem, pode-se avaliar que as micropartículas obtidas se apresentaram sob o aspecto de pó na coloração branca, semelhante ao polímero puro.

5.2 RENDIMENTO

Para o cálculo de rendimento, realizou-se a utilização da Equação 2. Os valores obtidos podem ser visualizados na Tabela 9. Os valores médios de eficiência de encapsulação foram de 58,2% para a formulação F0, 61,6% para a formulação F10 e 70,8% para a formulação F20. Pode-se avaliar que as formulações que continham o fármaco (F10 e F20) apresentaram um rendimento maior quando comparadas à formulação controle (F0). Os testes foram realizados em duplicata.

Tabela 9: Rendimento obtido para as formulações F0, F10 e F20

Formulação	Rendimento (%)
F 0	58,2 ± 0,3
F 10	61,6 ± 5,9
F 20	70,8 ± 0,6

* média (n = 2) ± desvio padrão

Fonte: CAMARGO, 2017

Neste trabalho, utilizou-se o Pval para a obtenção das micropartículas através do processo de emulsão simples/evaporação do solvente orgânico, este componente atua como tensoativo na elaboração da formulação, porém ele é tóxico e não biodegradável, acumulando no organismo. Desta forma, as micropartículas produzidas com Pval devem ser lavadas e centrifugadas para reduzir o resíduo de Pval contido na superfície das micropartículas o que diminui o rendimento do processo

e justifica os valores encontrados com relação a baixas porcentagens de rendimento (TRAN, 2011).

5.3 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE UMIDADE

A Tabela 10 fornece os resultados referentes ao teor de água presente nas micropartículas obtidas em relação aos valores estabelecidos para o ADAP puro (5,66%) e o polímero PCL (1,29%).

Tabela 10: Teor de água* obtido para o ADAP, para a PCL e para as micropartículas F0, F10 e F20

Material	Umidade (%)
Adap	5,7 ± 0,1
PCL	1,3 ± 0,1
F 0	3,06 ± 0,09
F 10	2,7 ± 0,1
F 20	2,91 ± 0,04

*média (n = 3) ± desvio padrão

Fonte: CAMARGO, 2017

Foi possível observar o maior valor de umidade percentual para o ADAP (5,66% ± 0,12), Por outro lado, para a PCL observou-se o menor valor de umidade percentual (1,29% ± 0,11).

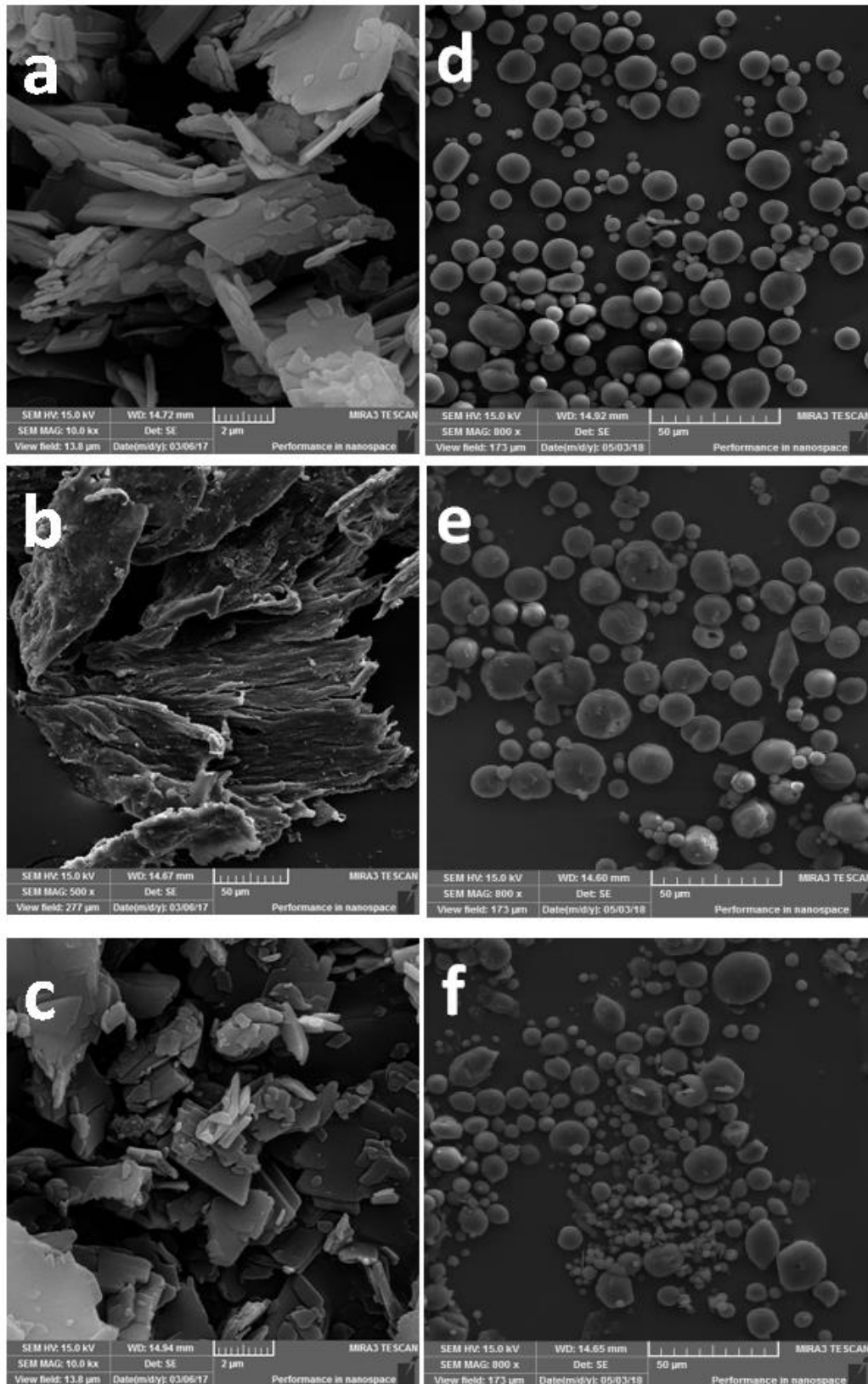
Estes dados demonstram que a secagem a vácuo realizada foi capaz de remover a água utilizada durante a microencapsulação. O teor de água residual em um pó influencia sua estabilidade física e controla a magnitude das forças capilares que contêm partículas em agregados (KARADZOVSKA; RIVIERE, 2013). Considerando os resultados obtidos, é possível estabelecer que o teor de água tem baixa interferência na estabilidade física das micropartículas de PCL.

5.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA COM FONTE DE EMISSÃO POR EFEITO DE CAMPO (MEV-FEG)

Na Figura 12 é possível observar os aspectos morfológicos do fármaco puro, da PCL triturada e da mistura física de fármaco com o polímero, realizados para possível comparação entre as formulações obtidas. O fármaco puro pode ser evidenciado como uma estrutura cristalina (Figura 12, a). O polímero (PCL) apresentou uma superfície levemente irregular (Figura 12, b). Enquanto que na mistura física é possível ver claramente a mistura das duas estruturas diferentes (Figura 8, c).

Entretanto para as micropartículas (Figuras 12, d,e,f), os resultados obtidos por MEV-FEG revelaram micropartículas com formato esférico e superfície lisa condizente com partículas poliméricas preparadas a partir do polímero PCL como nota-se na formulação F0 (Figura 12, d) sem o fármaco. As micropartículas F20 (Figura 12, f) apresentaram cristais de fármaco em torno da sua superfície, e isso deve-se a maior quantidade de ADAP presente nesta formulação quando comparada a F10 (Figura 12, e) (RIEKES, 2011; MENDES, 2012; ALMEIDA, 2014). Com isso, pode-se avaliar que a formulação F10 foi a melhor desenvolvida, já que a mesma possuía a concentração de fármaco mais adequada para realizar a incorporação nas micropartículas.

Figura 12: Aspectos morfológicos do (a) ADAP puro, (b) da PCL triturada, (c) da mistura física, (d), F0, (e) F10 e (f) F20 por MEV-FEG.



Fonte: o autor

5.5 DETERMINAÇÃO DO TAMANHO DE PARTÍCULA

Os resultados de diâmetro médio obtidos para as micropartículas encontram-se descritos na Tabela 11. Os diâmetros das micropartículas foram determinados durante a medida de MEV-FEG, utilizando uma ampliação de 2000x (n=100). Exemplos dessas medidas são apresentados na Figura 13 para as amostras F0, F10 e F20. Todas as micropartículas obtidas apresentaram um tamanho médio de 8 µm. Conforme demonstrado na Tabela 11, a encapsulação com ADAP não teve efeito no tamanho de partícula. O mesmo resultado foi obtido com a encapsulação de ADAP com Tyrosferas por RAMENZALLI e colaboradores em 2017. Não foi observado diferenças significativas entre o tamanho das partículas nas diferentes formulações.

Tabela 11: Tamanho médio das partículas – Formulações F0, F10 e F20

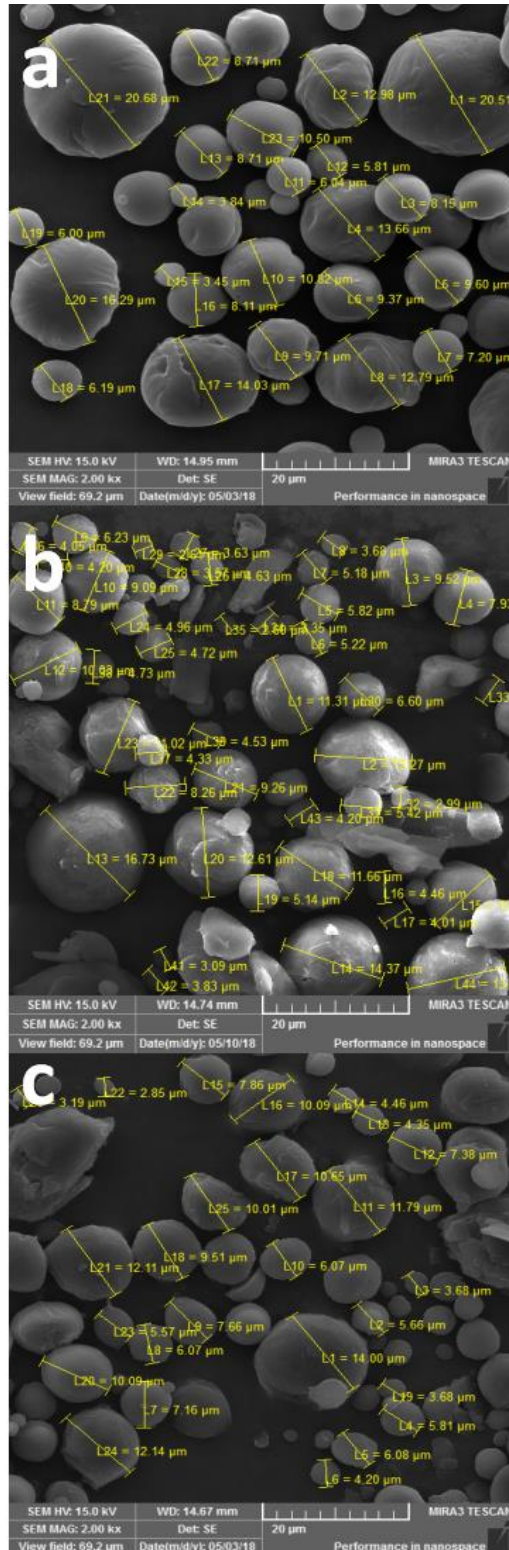
Formulação	Diâmetro médio (µm) ± DP*	Número de medições
F 0	9 ± 4	164
F 10	9 ± 4	132
F 20	8 ± 4	191

DP*: desvio padrão

Fonte: O autor

A análise do tamanho de partículas torna-se importante no caso de estudos de permeação da pele, e com isso, consegue-se prever a probabilidade dessas partículas penetrarem o estrato córneo e folículos pilosos afim de alcançar a epiderme viável (ALANCASTRE et al., 2006). Micropartículas com diâmetro variando entre 3-10 µm são capazes de penetrar os dutos foliculares (ROLLAND et al., 1993), sendo assim, os tamanhos médios das micropartículas obtidas neste trabalho apresentam potencial adequado para a utilização em formulações tópicas.

Figura 13: Micrografias para as amostras (a) F0, (b) F10 e (c) F20 exemplificando as medidas de diâmetro efetuadas durante as medidas de MEV-FEG



Fonte: O autor

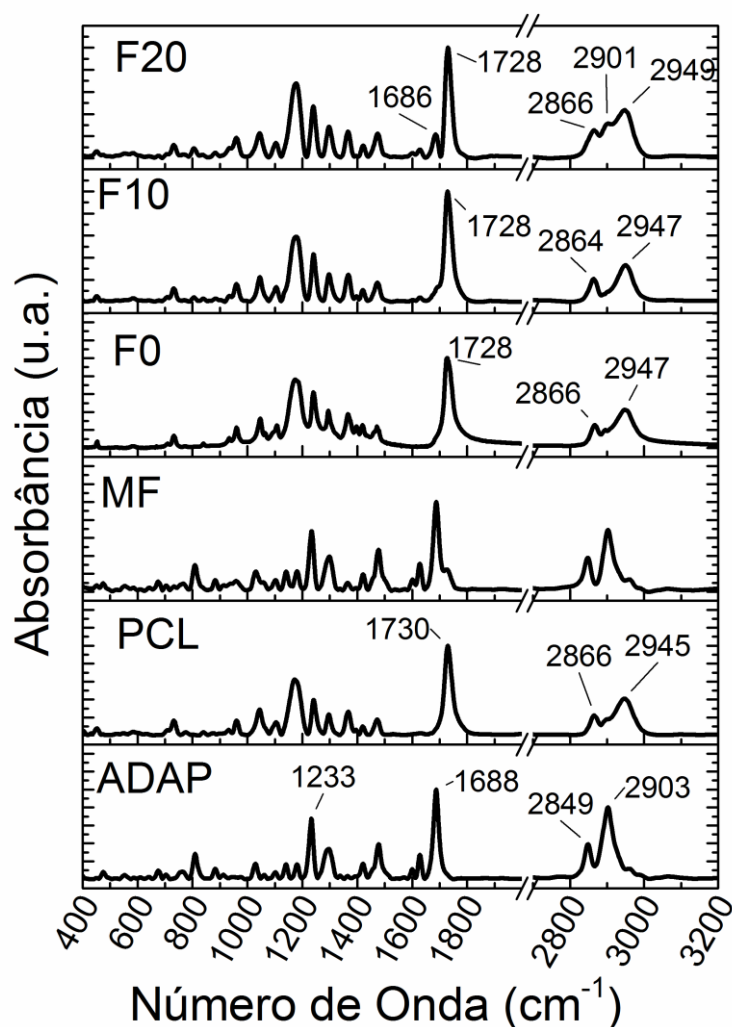
5.6 ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (IVTF)

A Figura 14 mostra o resultado dos espectros de infravermelho das amostras do fármaco puro, polímero (PCL), MF (proporção 1:1) e para as formulações F0, F10 e F20.

No espectro do fármaco é possível verificar a existência de uma banda em 1688 cm^{-1} correspondente ao estiramento C=O devido a conjugação do ácido carboxílico com o anel aromático. Assim como o estiramento C-O em 1233 cm^{-1} do ácido carboxílico. Em 2903 e 2849 cm^{-1} encontra-se duas bandas para as vibrações simétricas e assimétricas do grupo $-\text{CH}_2$ (GUO et al., 2014; BHALEKAR et al., 2015

Em relação ao espectro do polímero, é possível verificar a existência de uma banda em 1730 cm^{-1} típica do estiramento C=O do éster, uma banda em 1171 cm^{-1} característica do grupamento C-O e duas bandas em 2945 e 2866 cm^{-1} devido as vibrações simétricas e assimétricas do grupamento $-\text{CH}_2$. A mistura física (proporção 1:1) apresentou bandas de absorção nos mesmos números de onda tanto do polímero quanto para o fármaco. Para a formulação F0 observamos boa semelhança com o espectro da PCL em pó, mostrando que o método de obtenção da micropartícula não altera a estrutura química do polímero. Comparando as formulações pode-se observar que a F20 apresenta algumas absorções relativas ao ADAP, de maneira mais evidente nas regiões em 2901 e 1686 cm^{-1} as quais se apresentam sobrepostas as bandas do polímero. Para a F10 estas absorções mostraram-se menos evidentes. Também não se observou nenhum deslocamento nas absorções supracitadas nem o aparecimento de novos picos, o que indica que não ocorre interação química entre o fármaco e o polímero durante o processo de microencapsulação, mantendo o efeito terapêutico esperado do ADAP.

Figura 14: Espectros FTIR da PCL, do ADAP puro (ADAP), da mistura física PCL: ADAP (MF) e das micropartículas poliméricas (F0, F10 e F20).



Fonte: O autor.

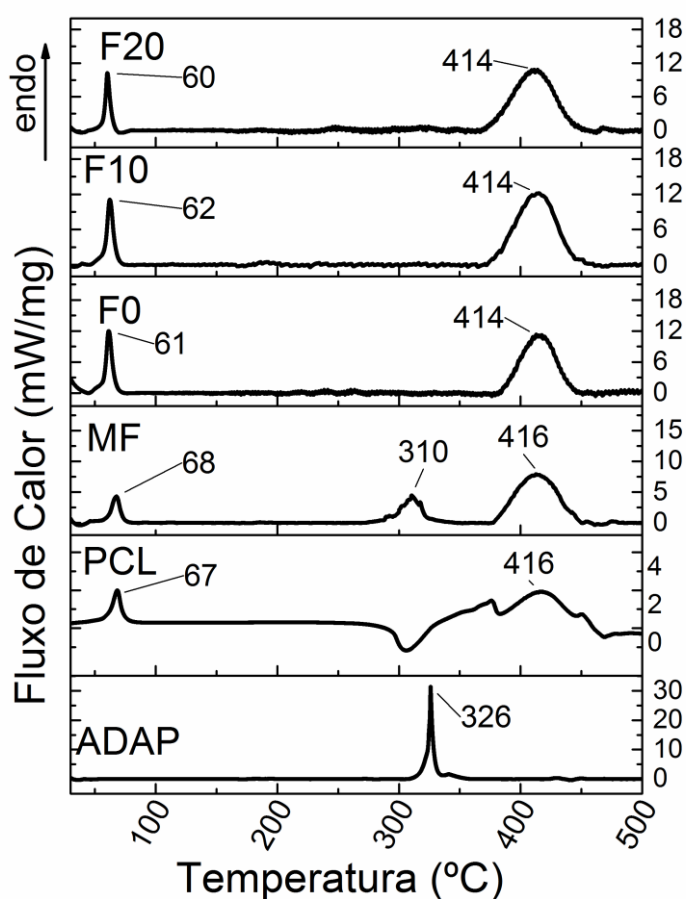
5.7 CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (CED)

Os resultados de termogramas do fármaco puro, do polímero (PCL), da mistura física (MF) e das micropartículas estão mostrados na Figura 15. Para o ADAP, é possível verificar o evento térmico de fusão em $326\text{ }^{\circ}\text{C}$, valor condizente com o encontrado na literatura (GUO et al., 2014). Pode-se observar que as micropartículas possuíram termogramas semelhantes ao da mistura física, os quais não mostram muitos picos de cristalinidade do fármaco nas micropartículas e, com isso, pode-se sugerir que ocorreu amorfização do fármaco. A PCL apresentou temperatura de fusão a $67\text{ }^{\circ}\text{C}$ e eventos de decomposição a $416\text{ }^{\circ}\text{C}$, confirmando dados previamente

relatados por ALMEIDA, et al.,2014. O termograma da mistura física mostrou eventos endotérmicos atribuídos ao polímero e à droga. No entanto, as micropartículas de PCL apresentaram apenas um evento de fusão na faixa de 60°C.

Dados da literatura demonstram que a PCL com massa molar da ordem de 10^4 a 10^5 Daltons podem apresentar altas taxas de cristalinidade variando entre 51 e 62% (SALOM, et al., 2006).

Figura 15: Resultados de termograma da PCL, do ADAP puro, da mistura física PCL: ADAP (MF) e das micropartículas poliméricas (F0, F10 e F20)



Fonte: O autor.

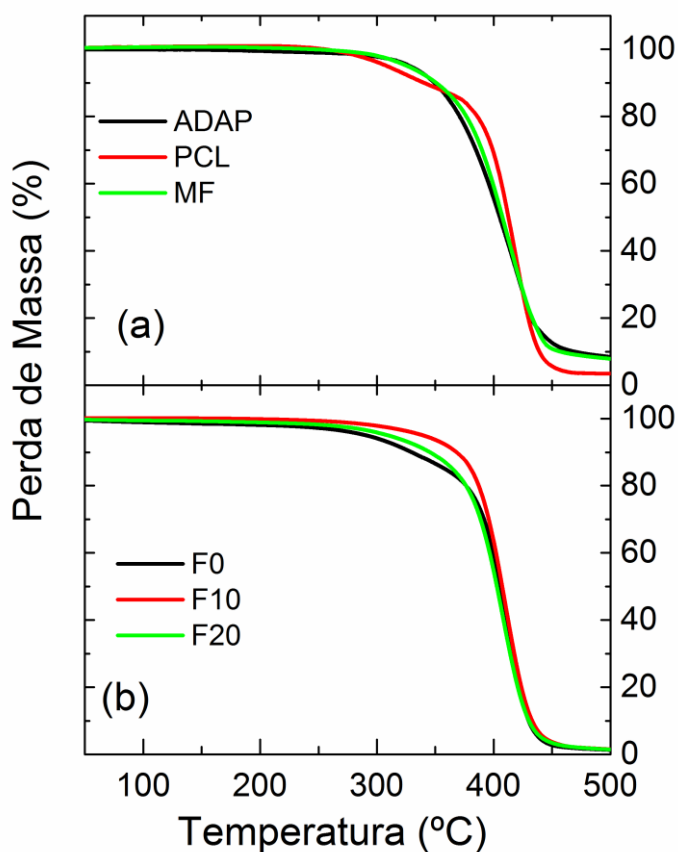
5.8 TERMOGRAVIMETRIA (TG)

As curvas de termogravimetria do fármaco puro, do polímero, da mistura física e das micropartículas estão representadas na Figura 16. É possível verificar um único evento de decomposição térmica, o que é sugestivo da degradação das amostras ou até mesmo um resultado que se refere a transformação da PCL, que apresenta um

importante estágio de transformação com perda de massa na temperatura de 405 °C (SALOM, et al., 2006).

É possível observar que tanto o polímero como a formulação F10 se mantiveram mais estáveis do que as demais amostras, iniciando o evento de decomposição térmica próximo a 300°C. O fármaco puro e a mistura física ficaram estáveis até a temperatura de 150°C, enquanto que as formulações F0 e F20 iniciaram o processo de perda de massa perto de 100°C, essa perda deve-se a perda de água, o qual é condizente com os dados de teor de umidade das amostras, conforme apresentado na Tabela 10. Entretanto, mesmo com a diferença de temperatura é possível concluir que as micropartículas possuem uma estabilidade térmica adequada para essa forma farmacêutica.

Figura 16: Curvas de TG do ADAP puro, da PCL e da mistura física (MF) PCL: ADAP (a) e das micropartículas poliméricas (F0, F10 e F20) (b).



Fonte: O autor

5.9

5.9 DIFUSIVIDADE TÉRMICA DAS MEMBRANAS SINTÉTICAS POR OPC

A seção 3.5.4 demonstra que é necessário conhecer a difusividade térmica da membrana. Para isso foram efetuadas medidas usando a técnica de célula fotoacústica aberta (OPC). Devido a espessura da membrana (300 μm), foi utilizado o modelo combinado de difusão térmica e flexão termoelástica (SOMER et al., 2013; SOMER et al., 2014). A equação para o sinal fotoacústico considerando tal modelo pode ser escrita na forma:

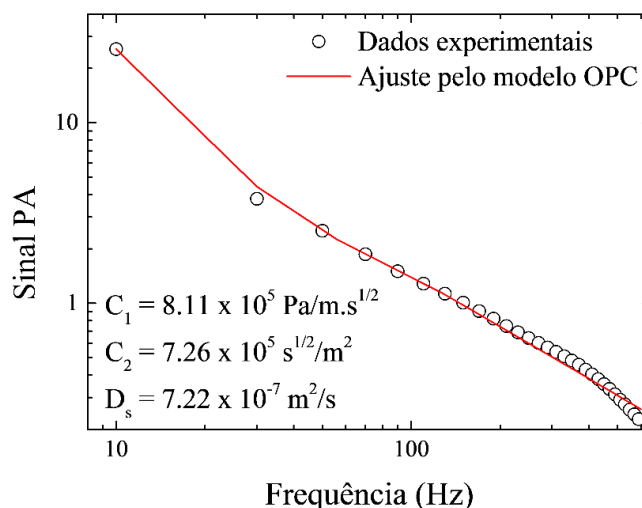
$$S = \frac{1}{f} \frac{C_1 D_s^{1/2}}{\sinh(l_s \sigma_s)} + \frac{1}{f^{3/2}} \frac{C_2 D_s^{3/2}}{\sinh(\sigma_s l_s)} \left[\cosh(\sigma_s l_s) - \frac{\sigma_s l_s}{2} \sinh(\sigma_s l_s) - 1 \right] \quad (9)$$

Em que: D_s = difusividade térmica da amostra, l_s é a espessura da amostra, C_1 e C_2 são os coeficientes que representam a contribuição da difusão e flexão termoelástica na geração do sinal fotoacústico e σ_s é o coeficiente de difusão complexo, definido por:

$$\sigma_s = (1+i) \sqrt{\frac{\pi f}{D_s}} \quad (10)$$

Os valores experimentais para a difusividade térmica D_s , C_1 e C_2 foram obtidos a partir do ajuste da Equação 9 utilizando o algoritmo Levenberg-Marquardt. Um exemplo de ajuste do sinal fotoacústico pelo modelo combinado para uma medida na membrana é apresentado na Figura 17. Este ajuste apresentou um R^2 de 0,996. A difusividade térmica obtida foi de $(7,22 \pm 0,04) \times 10^{-7} \text{ m}^2/\text{s}$. Este valor de difusividade se encontra próximo de materiais poliméricos sintéticos, visto que a estrutura da membrana é composta de diferentes polímeros e de diferentes camadas (HAQ, et al., 2018). O valor se encontra próximo de outros materiais sintéticos medidos pela técnica de OPC (DIAS, et al., 2007).

Figura 17: Ajuste do sinal fotoacústico medido para membrana sintética Strat M[®] considerando a espessura de 300 μm .



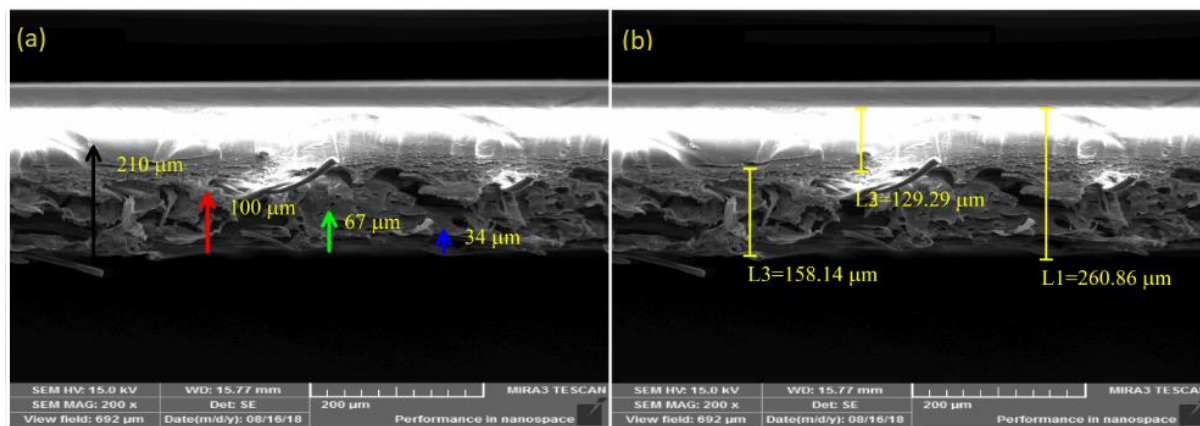
Fonte: O autor

5.10 ESPECTROSCOPIA FOTOACÚSTICA – PAS

5.10.1 Medidas de absorção das membranas Strat M[®]

As membranas Strat M[®] são compostas de 2 camadas de polietersulfona com uma superfície muito compacta, que fornece certa resistência a permeação de certos fármacos e abaixo dessas camadas existe uma camada de poliolefina, a qual possui poros maiores e, portanto, maior permeabilidade (HAQ et al., 2018). Essas camadas poliméricas criam uma estrutura porosa que é impregnada com misturas de lipídios sintéticos que fornecem gradiente de tamanho de poros e difusividade, podemos notar a diferença nos tamanhos de poros nas Figuras 18 (a) e (b).

Figura 18: (a) Ilustração do comprimento de difusão térmica em uma imagem MEV (incidência no lado interno) da membrana (b) Medições MEV de camadas de membrana para a mesma imagem na figura (a).



Fonte: O autor

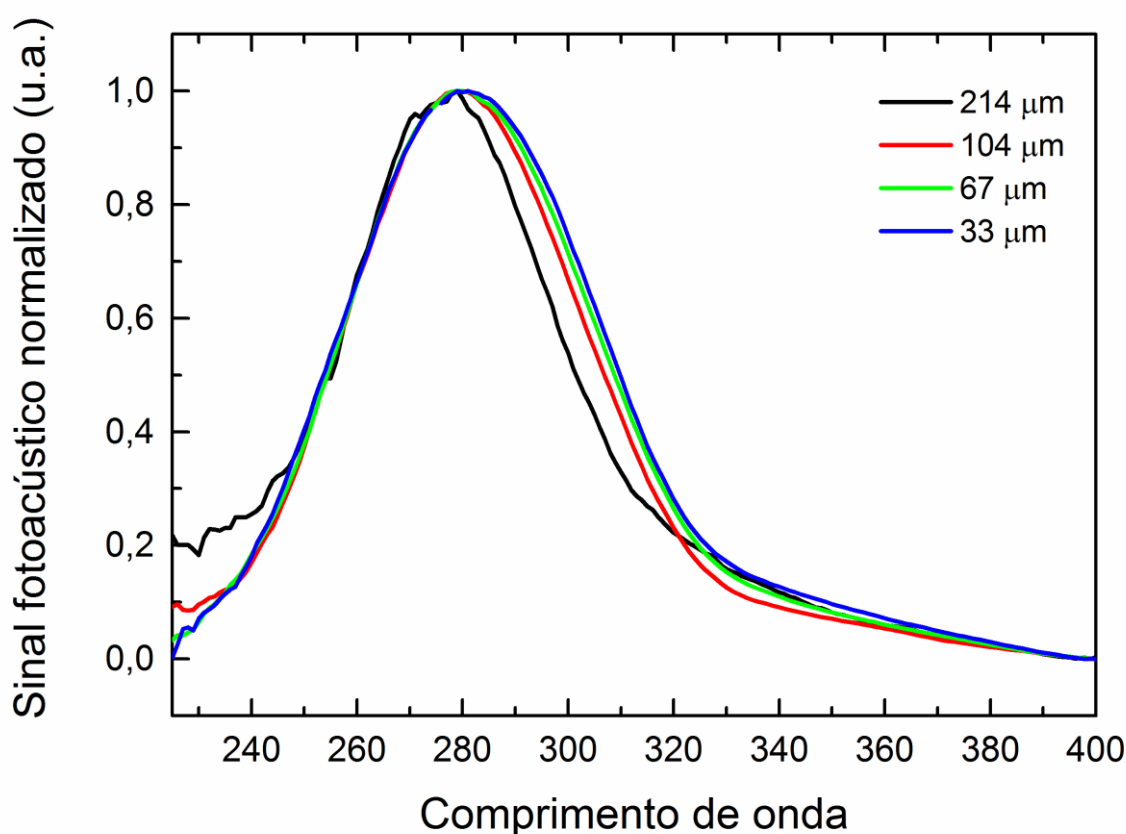
Para efetuar um perfil de profundidade nas membranas e também nas membranas com géis, a estratégia foi determinar o espectro de absorção óptica conforme a frequência de modulação. Para a escolha das frequências de modulação de incidência, inicialmente realizou-se a medida de difusividade térmica da membrana Strat M®. O valor de difusividade térmica média efetiva encontrado foi de $7,22 \times 10^{-7} \text{ m}^2/\text{s}$, de posse deste valor e com o uso de diferentes frequências de modulação foi possível determinar o perfil de profundidade a ser avaliado mediante cada frequência escolhida disponível no intervalo de modulação do equipamento de fotoacústica. Neste caso, para as frequências de modulação de 5, 23, 51 e 203 Hz foi possível determinar através do uso da Equação 1 os comprimentos de difusão de 214, 104, 67 e 33 μm , respectivamente, o que fornece a capacidade de avaliação de diferentes camadas da membrana Strat M®. Estes valores estão exemplificados na Figura 18 (a).

A Figura 19 mostra os espectros das membranas conforme a frequência de modulação pré determinada com incidência da luz do lado interno (conforme Figura 18 (a)). Os espectros foram normalizados de 0 a 1 para análise das variações em comprimento de onda. Observa-se um *red shift* de 278 para aproximadamente 300 μm a medida que a varredura de frequência permite a passagem da camada de polietersulfona (214 μm) para a camada de poliolefina (104 μm). Essa banda é associada com as transições $\pi \rightarrow \pi^*$ dos elétrons nos orbitais π nos anéis aromáticos,

e portanto, interações intracadeias poliméricas (ZHAO et al., 2011). Esse *red shift* pode ser associado a cadeias poliméricas menos “emaranhadas”, e, portanto, associada a camada de poliolefina.

Para uma melhor compreensão, as cores das linhas dos espectros são correspondentes as cores das setas representadas na Figura 18 (a) para cada comprimento de difusão térmica. Vale ressaltar que quanto menor o comprimento de difusão térmica a contribuição para a geração de sinal fotoacústico é mais próximo da superfície de amostra.

Figura 19: Espectros de absorção da membrana Strat M[®] em função da profundidade.



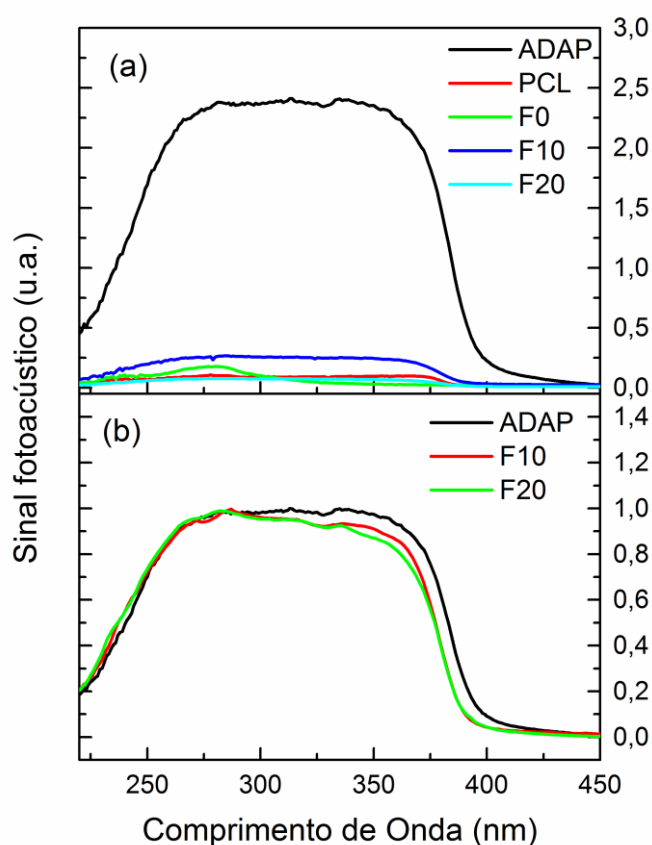
Fonte: O autor

5.10.2 Medidas de absorção das amostras em pó para permeação

Os espectros do fármaco e das micropartículas na forma de pó são apresentados na Figura 20 (a). Estes espectros foram normalizados somente pelo

espectro do carvão. Nota-se que para o fármaco (ADAP) o espectro obtido por PAS é bem semelhante ao obtido por UV-Vis. As micropartículas bem como o polímero possuem sinal fotoacústico bem menos intenso, o que também reforça o resultado obtido por UV-Vis (Figura 7). Segundo TOLBA; EL-GAMAL, 2016, o fármaco pode apresentar bandas de absorção em 230, 265, 312 e 340 nm, sendo que esta última pode sofrer deslocamento até 380 nm conforme o pH da solução em que o fármaco se encontra. A avaliação da ocorrência de deslocamento foi efetuado após a normalização dos espectros de 0 a 1 conforme a Figura 20 (b). Esta normalização se faz necessária devido à baixa intensidade apresentada pelas micropartículas. Observa-se que não ocorre o deslocamento da banda até 380 para as micropartículas contendo ADAP (TOLBA; EL-GAMAL, 2016).

Figura 20: Espectro de absorção óptica do fármaco e das micropartículas obtidos por PAS. (a) espectros normalizados pelo sinal do carvão e (b) espectros normalizados de 0 a 1.



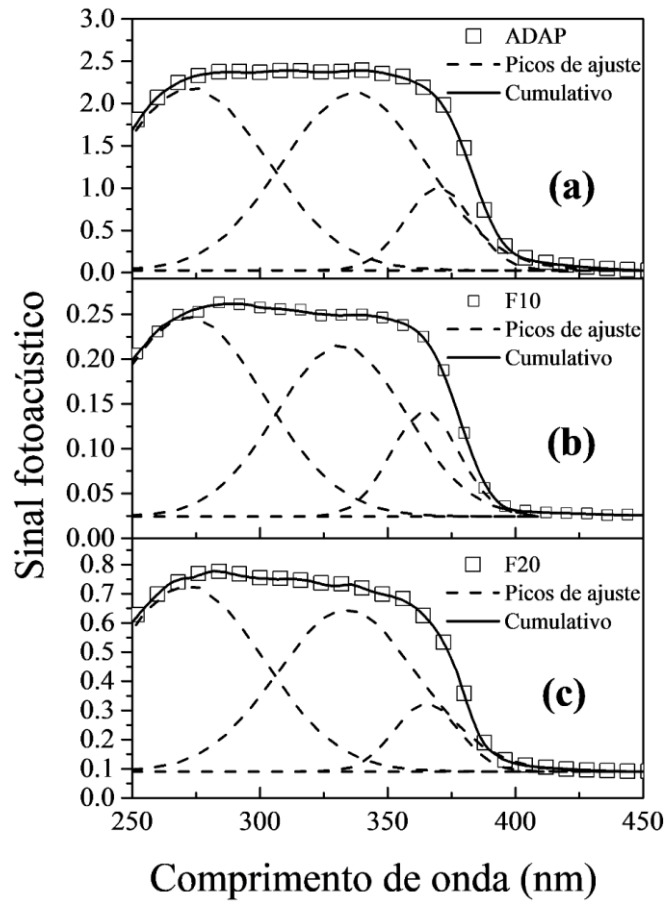
Fonte: O autor

5.10.3 Avaliação da permeação por PAS

Os resultados da subseção 5.10.1 mostram que a membrana tem diferentes espectros conforme a frequência de modulação aumenta. Portanto, para avaliar o perfil de permeação foi realizado um ajuste com funções gaussianas, já que na comparação da Figuras 19 e 20 observa-se que tanto a membrana quanto as formulações possuem bandas entre 270 e 320 nm.

O primeiro passo envolveu a aplicação de PAS para medir os espectros de absorção óptica de micropartículas de PCL carregadas com ADAP e a absorção óptica do fármaco ADAP. A Figura 21 (a) mostra os dados referentes ao ADAP, nos quais três curvas Gaussianas centradas em 272, 336 e 369 nm, foram ajustadas para obter o espectro total. Para as formulações F10 e F20 (Figuras 21 (b) e (c), respectivamente) realizou-se a equiparação com as mesmas curvas gaussianas com as mesmas posições e largura. Como a PCL não apresenta espectro de absorção (não apresentado), pode-se atribuir essas bandas ao ADAP. TOLBA, EL-GAMAL, 2016, encontraram resultados semelhantes para formulações em que se utilizou o polímero PCL.

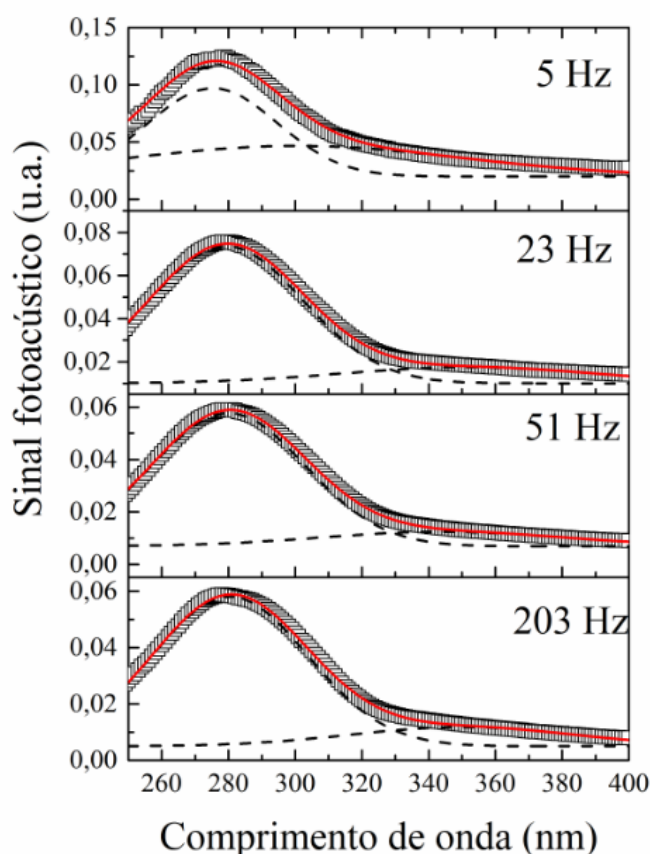
Figura 21: Espectro fotoacústico para o ADAP e para as formulações de micropartículas.



Fonte: O autor

Para detectar a formulação após a aplicação na membrana, foram utilizadas duas curvas Gaussianas centradas em 280 nm e a outra em 300 nm para a frequência de 5 Hz e 280 e 350 nm para as demais frequências, conforme Figura 22.

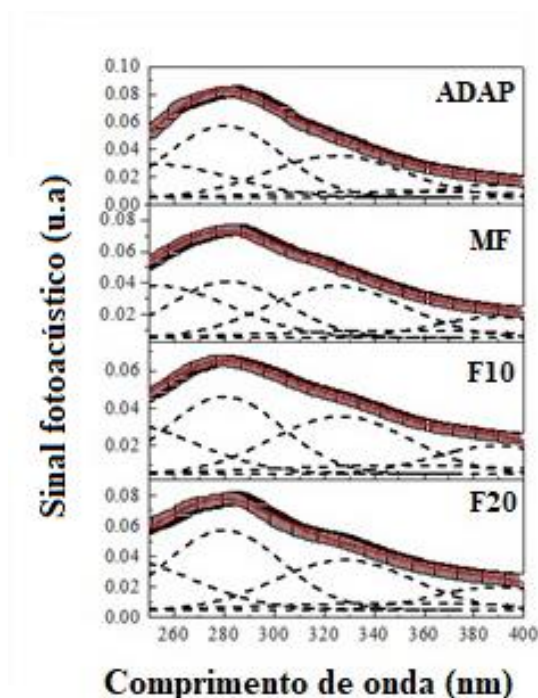
Figura 22: Espectros fotoacústicos para as membranas sintéticas - Strat M[®]



Fonte: O autor

O ajuste para as amostras de membrana com o ADAP foi difícil de realizar devido à proximidade das bandas de absorção da membrana e da própria formulação. O critério foi construir o espectro total simulando cada contribuição para a absorção usando o conhecimento das formulações (Figura 21). Como a PCL não apresenta sinal fotoacústico, considerou-se as mesmas Gaussianas obtidas para o ADAP e para a MF (mistura física). A Figura 23 mostra os resultados para a excitação no lado interno da membrana para uma modulação de frequência de 203 Hz (33 μ m de profundidade) após 15 min de aplicação de formulações. A permeação cutânea de cada formulação foi determinada pela soma das áreas das gaussianas referentes ao ADAP.

Figura 23: Espectros fotoacústicos para as membranas submetidas às formulações após 15 min de aplicação.



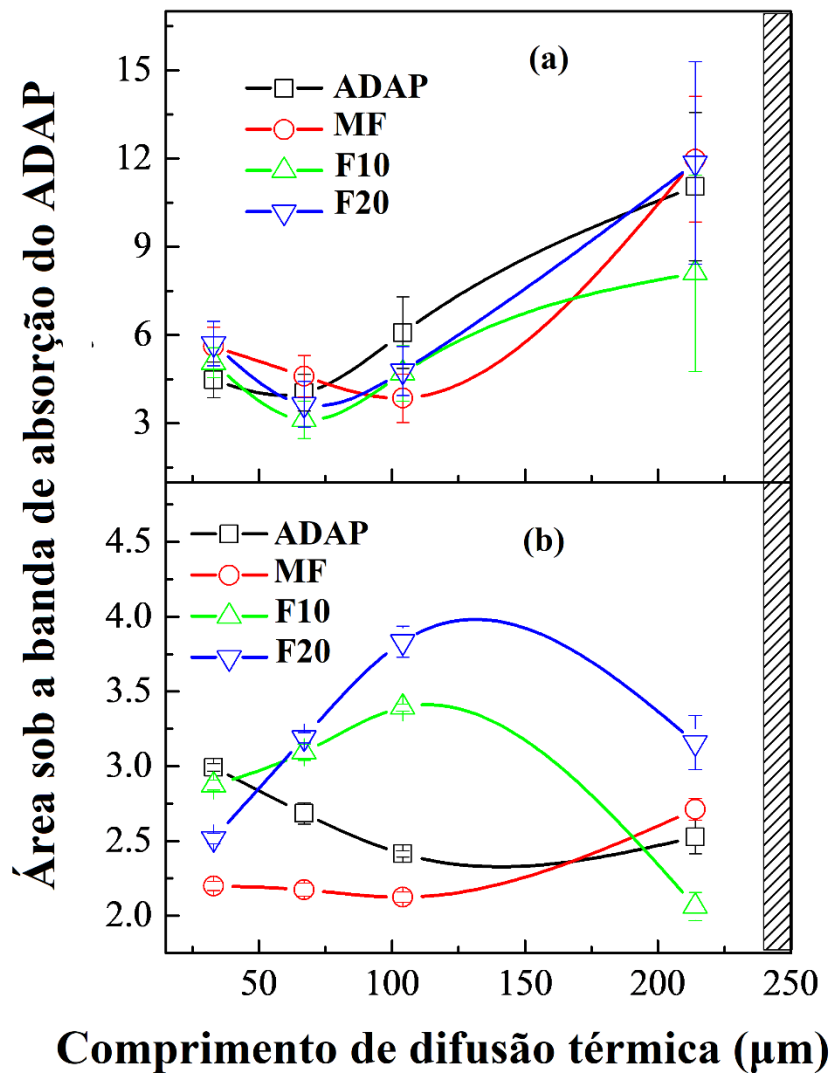
Fonte: O autor

Os resultados em função da profundidade de penetração são apresentados na Figura 24. Observa-se que após 15 min, a maior concentração de fármaco permanece em aproximadamente 213 μm para todas as formulações. No entanto, após 3 h, para a amostra ADAP ocorre um aumento na banda de absorção, indicando que o fármaco pode ser detectado através da membrana até 33 μm . Para a amostra MF, a absorção da banda de fármaco permanece constante de 100 a 33 μm , indicando que o fármaco se espalha através da membrana.

No entanto, para F10 e F20, pode-se notar um aumento de 213 para 100 μm e, em seguida, uma diminuição na intensidade de absorção do fármaco.

Para a formulação F10 observa-se um grande aumento da intensidade de absorção de 210 a 100 μm e é ligeiramente atenuada a 33 μm . Portanto, maior parte do fármaco permeia em 100 μm . Para a F20, o comportamento é semelhante, mas o aumento da intensidade de 210 a 100 μm é muito menor e a atenuação na superfície é mais intensa. Assim, pouco do fármaco na formulação F20 permeia até 100 μm se comparado com a formulação F10, o que indicaria um resultado melhor para a formulação F20.

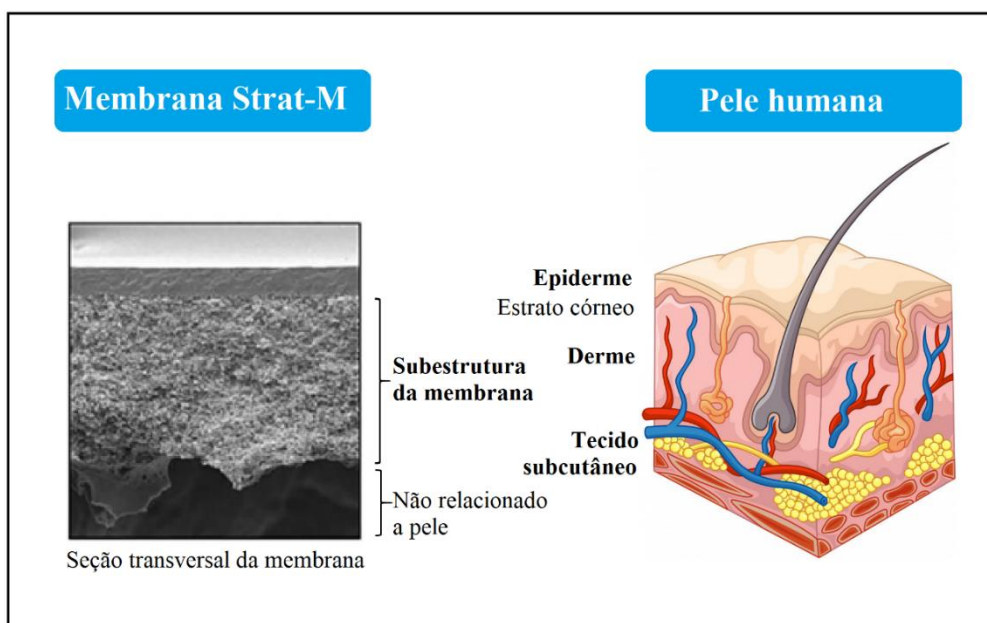
Figura 24: Evolução da penetração do ADAP na membrana em função da profundidade de penetração após 15 min (a) e 3 h (b) de aplicação. As marcas tracejadas aproximam-se da posição de aplicação das formulações.



Fonte: O autor

Considerando a comparação entre as camadas da membrana sintética e as camadas da pele humana efetuada por HAQ, et al., 2018, a superfície de poliéter sulfonado possui a “equivalência” ao estrato córneo na pele humana e que a camada de poliolefina, é “equivalente” à derme conforme Figura 25.

Figura 25: Estrutura da membrana Strat M[®] em comparação com a pele humana.



Fonte: Adaptado de HAQ, et al., 2018

Levando em consideração os resultados anteriores da membrana Strat M[®], na qual a superfície de poliéter sulfonado permanece na região de 213 μm de profundidade de penetração em 100 μm detecta-se e região de poliolefina que atinge a via folicular. Observou-se que, após 3h de aplicação das formulações, o ADAP puro permeia pelas camadas de poliéter sulfonado e de poliolefina, se concentrando em 33 μm de profundidade. O mesmo comportamento é obtido para a MF. Já para as formulações F10 e F20, após 3h de aplicação, estas se concentram em aproximadamente 100 μm . Considerando a comparação feita por HAQ, et al., 2018 na Figura 24 pode-se observar que a encapsulação polimérica diminui a permeação cutânea, concentrando o fármaco na região folicular, sendo assim pode-se evidenciar a liberação controlada do fármaco após a encapsulação polimérica.

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos mostram que as micropartículas poliméricas de poli (ϵ caprolactona) foram obtidas e caracterizadas. Os estudos de caracterização mostraram que as micropartículas apresentaram diâmetro médio de 8 μm , formato esférico e superfície lisa.

A análise por espectroscopia no infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) foi capaz de identificar as bandas características dos principais componentes da PCL e do ADAP, indicando que não houve ligação química entre eles.

A análise térmica revelou os picos de fusão do fármaco e do polímero e mostrou o desaparecimento do pico de fusão do ADAP nas micropartículas indicando encapsulamento do fármaco.

Pela técnica de OPC foi possível determinar a difusividade térmica efetiva da membrana sintética, com o valor de $7,22 \times 10^{-7} \text{ m}^2/\text{s}$ o qual se encontra dentro da faixa de valores obtidos para a difusividade térmica de polímeros de baixa densidade, a determinação deste parâmetro térmico possibilitou as análises de perfil de profundidade por PAS.

Com relação aos testes de permeação cutânea via PAS foi possível avaliar que a técnica utilizada foi capaz de identificar a presença de ADAP entre as camadas da membrana sintética utilizada, sendo possível validar o procedimento de PAS como uma importante ferramenta a ser utilizada em ensaios de penetração cutânea “*in vitro*” frente ao uso de membrana sintética para formulação de gel do medicamento utilizado.

Com relação ao uso de micropartículas poliméricas, foi possível avaliar que o uso desta tecnologia farmacêutica foi capaz de diminuir a penetração do medicamento utilizado frente a camadas que não seriam o alvo de ação do ADAP quando comparado a pele humana, garantindo que o medicamento fique um tempo maior em seu local de ação, aumentando sua efetividade terapêutica e a diminuição de possíveis reações indesejadas e/ou efeitos colaterais.

7 REFERÊNCIAS

ABDELRAZEK, E. M.; HEZMA, A. M.; EL-KHODARY, A.; ELZAYAT, A. M. Spectroscopic studies and thermal properties of PCL/PMMA biopolymer blend. **Egyptian Journal of Basic and Applied Science**, 2015

AHMAD, M. et al. Pharmaceutical microencapsulation technology for development of controlled release drug delivery systems. **International Scholarly and Scientific Research and Innovation**, v. 5, n. 3, p. 384-387, 2011.

AIACHE, J. M. Los aparatos de estudios de velocidad de dissolution of fármacos desde formas no orales. In: ARANCIBIA, A.; PEZOA, R. (Org.). **Biodisponibilidad de Medicamentos**: simpósio internacional I. Santiago: Editora Universitária, 1992. p. 125-149.

ALANCASTRE, J. B. et al. A study of the characteristics and in vitro permeation properties of CMC/chitosan microparticles as a skin delivery system for vitamin E. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 1, p. 69-76, mar. 2006.

ALMEIDA, M. A. et al. Enhanced gastric tolerability and improved anti-obesity effect of capsaicinoids-loaded PCL microparticles. **Materials Science and Engineering: C**, v. 40, p. 345-356, 2014.

AL-HAMMADI, A. et al. Topical, biological and clinical challenges in the management of patient with acne vulgaris. **Sultan Qaboos University Medical Journal**, v. 16, n. 2, p. 152-160, mai. 2016.

ANTONIO, J. R. et al. Nanotechnology in dermatology. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 89, n. 1, p. 126-136, 2014.

ASTRATH, F. B. G. **Determinação de propriedades térmicas de materiais odontológicos utilizando a técnica fotoacústica com célula aberta**. 2007, 68 f. Dissertação (Mestrado em Física) - Programa de Pós-Graduação em Física, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2007.

ASTRATH, A. C. N. **Espectroscopia fotoacústica : determinação das taxas de difusão de complexos nanoencapsulados na pele e de fotossensibilizadores na dentina**. 2011, 106 f. Dissertação (Mestrado em Física) – Programa de Pós-Graduação em Física, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2011.

ARRY, B. W.; SOUTHWELL, D.; WOODFORD, R. Optimization of bioavailability of topical steroids: penetration enhancers under occlusion. **The Journal of investigative dermatology**, v.82, n.1, p. 49-52, 1984.

AZIMI, B.; NOURPANAH, N.; RABIEE M.; ARBAB, B. Poly (ϵ -caprolactone) fiber: an overview. **Journal of Engineered Fibers and Fabrics**, v. 9, n. 3, p. 74–90, jan. 2014.

AZOUZ, L. H.; DAHMOUNE, F.; REZGUI, F.; G'SELL, C. Full factorial design optimization of anti-inflammatory drug release by PCL-PEG-PCL microspheres. **Materials Science and Engineering C**, v. 58, p. 412-419, 2016.

BHALEKAR, M.; UPADHAYA, P.; MADGULKAR, A. Formulation and evaluation of Adapalene-loaded nanoparticulates for epidermal localization. **Drug Delivery**, v. 5, n. 6, p. 585-595, 2015.

BHATIA, G.; ZHOU, Y.; BANGA, A. K. Adapalene Microemulsion for Transfollicular Drug Delivery. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 102, n. 8, p. 2622-2631, ago. 2013.

BIRNBAUM, D. T.; BRANNON-PEPPAS, L. Microparticle drug delivery systems. In: BROWN, D. M. (Org.). **Drug delivery systems in cancer therapy**. Totowa: Humana Press, 2003. p.117-135.

BISWAL, I. et al. In vitro antimicrobial susceptibility patterns of Propionibacterium acnes isolated from patients with acnes vulgaris. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 10, n. 10, p. 1140-1145, 2016.

BRASIL. **Ministério da Saúde**: agência nacional de vigilância sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada de nº 166, de 24 de julho de 2017. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC_166_2017_COMP.pdf/d5fb92b3-6c6b-4130-8670-4e3263763401 . Acesso em 08 de ago. 2017.

BRENNER, F. M. et al. Acne: um tratamento para cada paciente. **Revista de Ciências Médicas**, v. 3, n. 15, p. 257-266, 2006.

BRONAUGH, R. L.; STEWART, R. F. Methods for in vitro percutaneous absorption studies III: hydrophobic compounds. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Washington, v. 73, p. 1255-1258, 1985.

BROWN, S.M.; BAESSO, M.L.; SHEN J. Thermal-diffusivity of skin measured by 2 photothermal techniques, **Analytica Chimica Acta** 282 (3): 711-719 OCT 29 1993

BULTS, G.; HORWITZ, B. A.; MALKIN, S.; CAHEN, D. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)**, 679, 452 (1982).

CAMARGO, G. A. **Desenvolvimento e caracterização físico-química de micropartículas poliméricas contendo Adapaleno**. 2017, 68 f. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Farmácia). Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2017.

CILURZO, F. et al. An insight into the skin penetration enhancement mechanism of N-methylpyrrolidone. **Molecular pharmaceutics**, v. 11, n. 3, p. 1014-1021, 2014.

CIRIELLO, V.; BOTTARELLI M.; DI FEDERICO V.; TARTAKOVSKY D. M. Temperature fields induced by geothermal devices. **Energy**, v. 93, n. 2, p. 1896-1903, 2015.

COLLIER, C. N. et al. The prevalence of acne in adults 20 years and older. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 58, n. 1, p. 56–59, 2008.

COSTA, A.; ALCHORNE, M. M. A.; GOLDSCHMIDT, M. C. B. Fatores etiopatogênicos da acne vulgar. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 5, n. 83, p. 451-459, 2008.

DIAS, D. T. **Estudo da reticulação do polietileno/silano enxertado e copolimerizado usando métodos fototérmicas**. 2001, 123 f. Dissertação (Mestrado em Física) - Departamento de Física, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2001.

DIAS, D. T. et al. Thermal characterization in vitro of human nail: photoacoustic study of the aging process. **Photochemistry and Photobiology**, v. 83, n. 5, p. 1144-1148, 2007.

DING, C. et al. Recent Advances in Stimuli-Responsive Release Function Drug Delivery Systems for Tumor Treatment. **Molecules**, v. 21, n. 12, p. 1715, dez. 2016.

FITZ-GIBBON, S. et al. Propionibacterium acnes strain populations in the human skin microbiome associated with acne. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 133, n. 9, p. 2152-2160, 2013.

FRIEDLANDER, S. F. et al. Acne epidemiology and pathophysiology. **Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery: SCMS**, v. 29, n. 2 Suppl 1), p. 2–4, 2010.

FOX, L. et al. Treatment modalities for acne. **Molecules**, v. 23, n. 1063, ago. 2016.

GARAY, I.; POCHEVILLE, A.; MADARIAGA, L. Polymeric microparticles prepared by supercritical antisolvent precipitation. **Powder Technology** v. 197, p. 211-217, 2010.

GASPARRI, F.; MUZIO, M. Monitoring of apoptosis of HL60 cells by Fourier transform infrared spectroscopy. **Biochemical Journal**, v. 369, n. Pt2, p. 239–248, 2003.

GHARSALLAOUI, A.; ROUDAUT, G.; CHAMBIN, O.; VOILLEY, A.; SAUREL, R. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. **Food Research International** v. 40, p. 1107-1121, 2007.

GHODSI, S. Z.; ORAWA, H.; ZOUBOULIS, C. C. Prevalence, severity, and severity risk factors of acne in high school pupils: a community-based study. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 129, n. 9, p. 2136–2141, 2009.

GOLLNICK H. et al. Management of acne: a report from a Global Alliance to Improve Outcomes in Acne. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 49, n. 1Suppl, p. S1–37, 2003.

GORDILLO-DELGADO, F. et al. Discrimination of organic coffee via Fourier transform infrared–photoacoustic spectroscopy. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 92, n. 11, p. 2316–2319, 2012.

GUO, C. et al. Acid-Responsive polymeric nanocarriers for topical adapalene delivery. **Pharmaceutical Research**, v. 31, n. 11, p. 3051-3059, mai. 2014.

HAQ, M. et al. Membrane properties for permeability testing: skin versus synthetic membranes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 539, n.1-2, p. 58-64, 2018.

HASGALL, P. A. et al. **Overview - database of tissue properties**. Disponível em: <www.itis.ethz.ch/database> Acesso em: 07 de jul. 2018.

HESLINGA, M. J.; MASTRIA, E. M.; ENIOLA-ADEFESO, O. Fabrication of biodegradable spheroidal microparticles for drug delivery applications. **Journal of Controlled Release**, v. 138, p. 235-242, 2009.

IRBY, C. E.; YENTZER, B. A.; FELDMAN, S. R. A review of adapalene in the treatment of acne vulgaris. **Journal of Adolescent Health**, v. 43, n. 5, p. 421-424, 2008.

JACOB, C. I.; DOVER, J. S.; KAMINER, M. S. Acne scarring: a classification system and review of treatment options. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v.45, n. 1, p. 109–117, 2001.

JAFFARY, F. et al. Comparison the effectiveness of pyruvic acid 50% and salicylic acid 30% in the treatment of acne. **Journal of Research in Medical Sciences**, v. 21, n. 1, mar. 2016.

JAIN, R. A. The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide)(PLGA) devices. **Biomaterials**, v. 21, n. 23, p. 2475–2490, 2000.

JEREMY, A. H. et al. Inflammatory events are involved in acne lesion initiation. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 121, n. 1, p. 20-17, 2003.

HOSKINS, J. N.; GRAYSON, S. M. Synthesis and degradation behavior of cyclic poly(ϵ caprolactone). **Macromolecules**, v. 42, n. 17, p. 6406–6413, 2009.

JUSTUS, B. et. al. Benzoyl Peroxide-Loaded PCL Microparticles: Physicochemical Characterization on In Vitro Antibacterial and Permeation Studies. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 39, n. 9, p. 1710-1717, 2015.

KARADZOVSKA, D.; RIVIERE, J. E. Assessing vehicle effects on skin absorption using artificial membrane assays. **European Journal of Pharmaceutical sciences**, v. 50, n. 5, p. 569-576, 2013.

KASSUGA, L. E. et al. Fox-Fordyce disease: response to adapalene 0.1%. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.87, n. 2, p. 329-331, 2012.

KUMAR, L. et al. Polymeric microparticles-based formulation for the eradication of cutaneous candidiasis: development and characterization. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 19, n. 3, p. 318-325, abr. 2013.

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

KUROKAWA, I. et al. New developments in our understanding of acne pathogenesis and treatment. **Experimental Dermatology**, v. 18, n. 10, p. 821–832, 2009.

LABOUTA, H. I.; EL-KHORDAGUI, L. K. Polymethacrylate microparticles gel for topical drug delivery. **Pharmaceutical Research**, v. 27, n. 10, p. 2106-2118, jul. 2010.

LAUTERBACH, A.; MUELLER-GOYMANN, C. C. Development, formulation, and characterization of an adapalene-loaded solid lipid microparticle dispersion for follicular penetration. **International Journal of Pharmaceutical**, v. 466, n. 1-2, p. 122-132, mai. 2014.

NUGLISCH, L. E. R. et al. Photoacoustic spectroscopy to evaluate the penetration of two antifungal agents through the human nail. **Journal de Physique IV**, v. 125, p. 631-633, 2005.

LEYDEN, J.; STEIN-GOLD, L.; WEISS, J. Why topical retinoids are mainstay of therapy for acne. **Dermatol Ther (Heidelb)**, v. 7, p. 293-304, 2017.

LHEURE, C. et al. TLR-2 Recognizes Propionibacterium acnes CAMP Factor 1 from Highly Inflammatory Strains. **PLoS ONE**, v. 11, n. 11, p. 0167237, 2016. Disponível em: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0167237#abstract0>> Acesso em: 08 de jul. 2018.

LI, M.; ROUAUD, O.; PONCELET, D. Microencapsulation by solvent evaporation: State of the art for process engineering approaches. **International Journal of Pharmaceutics** v. 363, n. 1-2, p. 26-39, 2008.

LIRA, A. A. M. **Desenvolvimento, caracterização e avaliação de sistemas microestruturados para veiculação de ácido retinóico na pele**. 2007, 163 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

LUCKY A.W. A review of infantile and pediatric acne. *Dermatology* 1998; 196: 95–97. 9 Meixner D, Schneider S, Krause M, Sterry W. Acne inversa. *J Dtsch Dermatol Ges* 2008; 6: 189–196.

MAGIN, P.; POND, D.; SMITH, W.; WATSON, A. A systematic review of the evidence for ‘myths and misconceptions’ in acne management: diet, face-washing and sunlight. **Family Practice**, v. 22, n. 1, p. 62–70, 2005.

MAINARDES, M. M. **Desenvolvimento de nanopartículas de PLA e PLA-PEG para administração intranasal de zidovudina**. 2007, 133 p. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2007.

MALIKMAMMADOV, E.; TANIR, T. E.; KIZILTAY, A.; HASIRCI, V.; HASIRCI, N. PCL and PCL-Based Materials in Biomedical Applications. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 29, n. 7-9, p. 863-893, 2017.

Manual de normalização bibliográfica para trabalhos científicos. 3. ed. rev. Atual. Ponta Grossa: UEPG, 2014.

MENDES, J. B. et al. PHBV/PCL microparticles for controlled release of resveratrol: physicochemical characterization, antioxidant potential, and effect on hemolysis of human erythrocytes. **The Scientific World Journal**, v. 2012, p. 1-13, 2012.

MICHAELIAN, K. H. Instrumental Methods. In: MICHAELIAN, K. H. (Org.). **Photoacoustic IR Spectroscopy: instrumentation, applications and data analysis**. 2. ed. Verlag: Wiley Online Library, 2010. p. 25-70.

MONTAGNER, S.; COSTA, A. Diretrizes modernas no tratamento da acne vulgar: da abordagem inicial à manutenção dos benefícios clínicos. **Surgical & Cosmetic Dermatology**, v. 2, n. 3, p. 205-213, jul./set. 2010.

MONTENEGRO, L. et al. Effect of oil phase lipophilicity on in vitro drug release from o/w microemulsions with low surfactant content. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 32, n. 5, p. 539-548, 2006.

MÜLLER-GOYMANN, C. C.; LAUTERBACH A., F. J. Stability and In Vitro Skin Compatibility of an Adapalene-Loaded Solid Lipid Microparticle Dispersion. **Journal of In Silico & In Vitro Pharmacology**, v. 1, n. 3, p. 1-4, 2015.

NELSON, K. et al. Anti-Acne Activity of Italian Medicinal Plants Used for Skin Infection. **Frontiers in Pharmacology**, v. 7, n. 425, nov. 2016.

NINO, M.; CALABRO, G.; SANTOIANI, P. Topical delivery of active principles: the field of dermatological research. **Dermatology Online Journal**, v. 16, n. 1, p. 4, 2010.

OBEIDAT, W. M. Recent patents review in microencapsulation of pharmaceuticals using the emulsion solvent removal methods. **Recent Patents on Drug Delivery & Formulation**, v. 3, p. 178-192, 2009.

OLENKA, L.; **Espectroscopia fotoacústica: estudo das propriedades ópticas e térmicas da pele "in vivo"**, monografia apresentada UEM, 1996.

OLIVEIRA, C. et. al. A new cornucopia in topical drug delivery: microspunge technology. **Asian Journal of Pharmaceutical Science & Technology**, v. 4, n. 1, p. 48-60, 2014.

PASQUINI, C. Near infrared spectroscopy: fundamentals, practical aspects and analytical applications. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 14, n. 2, p. 198-219, 2003.

PEDROCHI, F. **Aplicação de técnicas fototérmicas no estudo de biomateriais**. 2008. (Doutorado em Física). Pós-Graduação em Física da Universidade Estadual de Maringá, Física da Universidade Estadual de Maringá, Maringá.

PEREIRA, A. C. et al. **Review of Scientific Instruments** 65 (1512), 1994.

PHILLIPS, T. J. An update on the safety and efficacy of topical retinoids. **Cutis**, v. 75, n. 2 Suppl, p. 22-23, 2005.

PIRES, A. L. R.; BIERHALZ, A. C. K.; MORAES, A. M. Biomateriais: tipos, aplicações e mercado. **Química Nova**, v. 38, n. 7, p. 957-971, 2015.

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

POLI, F.; DRENO, B.; VERSCHOORE, M. An epidemiological study of acne in female adults: results of a survey conducted in France. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 15, n. 6, p. 541–545, 2001.

PONCHET-OSMAN, H. et al. Fixed-combination gels of adapalene and benzoyl peroxide provide optimal percutaneous absorption compared to monad formulations of these compounds: results from two in vitro studies. **Dermatology and therapy NLM**, v. 7, p. 123-131, 2017.

PROW, T. W. et al. Nanoparticles and microparticles for skin drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, n. 6, p. 470-491, mai. 2011.

RAMEZANLI, T.; ZHANG, Z.; MICHNIAK-KOHN, B. B. Development and characterization of polymeric nanoparticle-based formulation of adapalene for topical acne therapy. **Nanomedicine**, v. 13, n. 1, p. 143-152, 2017.

RANCAN, F.; BLUME-PEYTAVI, U.; VOGT, A. Utilization of biodegradable polymeric materials as delivery agents in dermatology. **Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology**, v. 7, p. 23-34, 2014.

RESTANI, R. B.; CORREIA, V. G.; BONIFÁCIO, V. D. B.; AGUIAR-RICARDO, A. Development of functional mesoporous microparticles for controlled drug delivery. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 55, p. 333-339, 2010.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RIEKES, M. K. et al. Evaluation of oral carvedilol microparticles prepared by simple emulsion technique using poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and polycaprolactone as polymers. **Materials Science and Engineering: C**, v. 31, n. 5, p. 962-968, jul. 2011.

ROLLAND, A; WAGNER, N; CHATELUS, A SHROOT, B; SCHAEFER, H; Site-specific drug delivery to pilosebaceous structures using polymeric microspheres. **Pharm Res.** 1993;10(12):1738–44

ROSAS VAZQUEZ, E. et al. Chloracne in the 1990s. **International Journal of Dermatology**, v.35, n. 9, p. 643–645, 1996.

ROSENCWAIG, A; GERSHO, A. Theory of Effect with solids. **Journal of Applied Physics**, v. 47, n. 1, p. 64-69, 1976.

ROSENFELD, R. L. What every physician should know about polycystic ovary syndrome. **Dermatology Therapy**, v. 21, n. 5, p. 354–61, 2008.

ROUSSET, G., LEPOUTRE, F., BERTRAND, L., J. Appl. Phys., 54, 2383 (1983).

SALOM, C., NAVA, D., PROLONGO, M. G., MASEGOSA, R. M. Poli(ϵ -caprolactona) + unsaturated isophthalic polyester blends: thermal properties and morphology. **European Polymer Journal**, 42, p.1798 (2006).

SARTORELLI, P. et al. Percutaneous penetration studies for risk assessment. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, Amsterdam, v.8, n. 2, p. 133-152, 2000.

SCHAFER, T. et al. Epidemiology of acne in the general population: the risk of smoking. **British Journal of Dermatology**, v. 145, n. 1, p. 100–104, 2001.

SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S. Caracterização e estabilidade físicoquímica de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003.

SEHN, E. Espectroscopia Fotoacústica para determinar a taxa de propagação de substâncias na pele humana in vivo. 2004, 59 f. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Física) – Departamento de Físico, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2004.

SEHN, E. K. C. et al. Photoacoustic spectroscopy to evaluate the potentiality of bee-propolis as UV protector: In vivo test in humans. **Journal de Physique IV**, v. 125, p. 681-683, 2005.

SEHN, E. et al. Photoacoustic spectroscopy to evaluate the penetration of sunscreens into human skin in vivo: a statistic treatment. **Review of scientific Instruments**, v. 74, n. 1, p. 758, Jan. 2003.

SEHN, E. **Utilização da Espectroscopia Fotoacústica na determinação da propagação das formulações de uso tópico utilizadas para a caracterização de lesões ulceradas da pele.** 2006, 108 f. Dissertação (Mestrado em Física) - Programa de Pós-Graduação em Física, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2006.

SEHN, E. et al. Dynamics of reepithelialisation and penetration rate of a bee propolis formulation during cutaneous wounds healing. **Analytica Chimica Acta**, v. 635, n. 1, p. 115-120, 2009.

SEVERINO, P. et al. Polímeros sintéticos biodegradáveis: matérias-primas e métodos de produção de micropartículas para uso em drug delivery e liberação controlada. **Polímeros**, v. 21, n. 4, p. 286-292, 2011.

SHAH, V. P.; ELKINS, J. S.; WILLIAMS, R. L. Evaluation of the test system used for in vitro release of drugs from topical dermatological drug products. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 4, n. 3, p. 377-385, 1994.

SHALITA, A. R. Acne: clinical presentations. **Clinics in Dermatology**, v. 22, n. 5, p. 385-386. 2004.

SHI, X. et al. Adapalene inhibits the activity of cyclin-dependent kinase 2 in colorectal carcinoma. **Molecular Medicine Reports**, v. 12, p. 6501-6508, 2015.

SILVA, A. M. F.; COSTA, F. P.; MOREIRA, M. Acne vulgar: diagnóstico e manejo pelo médico de família e comunidade. **Revista Brasileira de Medicina de Família e Comunidade**, Rio de Janeiro, v. 9, n. 30, p. 54-63, jan./mar. 2014.

SIMONART, T.; DRAMAIX, M. Treatment of acne with topical antibiotics: lessons from clinical studies. **British Journal of Dermatology**, v. 153, n. 2, p. 395-403, 2005.

SIMONART, T.; DRAMAIX, M.; DE MAERTELAER, V. Efficacy of tetracyclines in the treatment of acne vulgaris: a review. **British Journal of Dermatology**, 158, n. 2, p. 208-216, 2008.

SITTART, J. A. S. et al. Multicenter study for efficacy and safety evaluation of a fixed-dose combination gel with adapalene 0,1% and benzoyl peroxide 2,5% (Epiduo®) for the treatment of acne vulgaris in Brazilian population. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 90, p. 1-15, 2015.

SOMER, A. et al. The thermoelastic bending and thermal diffusion processes influence on photoacoustic signal generation using open photoacoustic cell technique. **Journal of Applied Physics**, v. 114, n. 6, p. 063503, 2013.

SOMER, A. et al. Effects of thermal oxidation on the effective thermal diffusivity of titanium alloys. **Journal of Physics. D, Applied Physics (Print)**, v. 47, p. 385306, 2014.

SONG, L.; WANG, L. V. Photoacoustic tomography and its applications in drug delivery and photothermal therapy. In: LI, C.; TIAN M. (Org.). **Drug delivery applications of noninvasive imaging: validation from biodistribution to sites of action**, New Jersey: Wiley. 2013. p. 45-69.

SONG, Z. et al. Performance improvement of polysulfone ultrafiltration membrane using PANiEB as both pore forming agent and hydrophilic modifier. **Journal of Membrane Science**, v. 385-386, p. 251-262, 2011.

SOPPIMATH, K. S. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **Journal of Controlled Release**, v. 70, n. 1-2, p. 1-20, 2001.

STATHAKIS, V.; KILKENNY, M.; MARKS, R. Descriptive epidemiology of acne vulgaris in the community. **Australasian Journal of Dermatology**, v. 38, n. 3, n. 115–123, 1997.

THIBOUTOT, D.; ARSONNAUD, S.; SOTO, P. Efficacy and tolerability of adapalene 0.3% gel compared to tazarotene 0.1% gel in the treatment of acne vulgaris. **Journal of Drugs in Dermatology**, v. 7, n. 6 Suppl, p. s3-10, 2008.

THOMPSON, C. J. et al. Evaluation of ibuprofen-loaded microspheres prepared from novel copolyesters. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 329, n 1-2, p. 53-61, 2007.

TOLBA, M. M.; EL-GAMAL, R. M. Determination of adapalene in gel formulation by conventional and derivative synchronous fluorimetric approaches. Application to stability studies and in vitro diffusion test. **Chemistry Central Journal**, v. 10, n. 33, p. 1-10, 2016.

TOLBA, M. M.; EL-GAMAL, R. M. Determination of adapalene in gel formulation by conventional and derivative synchronous fluorimetric approaches. Application to stability studies and in vitro diffusion test. **Chemistry Central Journal**, v. 10, n.33, p. 1-10,2016.

TRAN, V.; BENOÎTA, J. P.; VENIER-JULIENNEA, M. C. Why and how to prepare biodegradable, monodispersed, polymeric microparticles in the field of pharmacy? **International Journal of Pharmaceutics**, v. 407, n. 1-2, p. 1-11, 2011.

TRUITE, C. V. et al. Percutaneous penetration, melanin activation and toxicity evaluation of a phytotherapeutic formulation for vitiligo therapeutic. **Photochemistry and Photobiology**, v. 83, n. 6, p. 1529–1536, 2007.

VALEYRIE-ALLANORE, L. et al. Drug-induced skin, nail and hair disorders. **Drug Safety**, v. 30, n. 11, p. 1011–1030, 2007.

VAN ZUUREN, E. J. et al. Systematic review of rosacea treatments. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 56, n. 1, p.107–115, 2007.

VYAS, A.; SONKER, A. K.; GIDWANI, B. Carrier-Based drug delivery system for treatment of acne. **The Scientific World Journal**, v. 2014, p. 1-14, 2014.

WOODRUFF, M. A.; HUTMACHER, D. W. The return of a forgotten polymer - Polycaprolactone in the 21st century. **Progress in Polymer Science**, v. 35, n. 10, p. 1217–1256, 2010.

YEH, L.; BONATI, L. M.; SILVERBERG, N. B. Topical retinoids for acne. **Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery**, v. 35, n. 2, p. 50-56, 2016.

YENTZER, B. A.; MCCLAIN, R. W.; FELDMAN, S. R. Do topical retinoids cause acne to “flare”? **Journal of Drugs in Dermatology**, v. 8, n. 1, p. 799–801, 2009.

ZAENGLEIN, A. L. et al. Guidelines of care for the management of acne vulgaris. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 74, n. 5, p. 945-973, mai. 2016.