

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

LUÍS ANTÔNIO DANTAS SILVA

**PENETRAÇÃO CUTÂNEA PASSIVA E IONTOFORÉTICA DE  
PROPIONATO DE CLOBETASOL INCORPORADO EM  
CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS**

Goiânia  
2013

LUÍS ANTÔNIO DANTAS SILVA

**PENETRAÇÃO CUTÂNEA PASSIVA E IONTOFORÉTICA DE  
PROPIONATO DE CLOBETASOL INCORPORADO EM  
CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Goiás, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.  
Área de Concentração: Fármacos e Medicamentos

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Neves Marreto  
Co-orientadora: Profa. Dra. Stephania Fleury Taveira

Goiânia  
2013

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação na (CIP)  
GPT/BC/UFG**

S586p Silva, Luís Antônio Dantas.  
Penetração passiva e iontoforética de propionato de clobetasol incorporado em carreadores lipídicos nanoestruturados [manuscrito] / Luís Antônio Dantas Silva. - 2013.  
xv, 80 f.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Neves Marreto; Co-orientadora: Stephânea Fleury Taveira.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Faculdade de Farmácia, 2013.

Bibliografia.

Inclui lista de figuras, abreviaturas, siglas e tabelas.

Apêndices.

1. Propionato de clobetasol – Uso 2. Pele – Tratamento – Doenças 3. Corticosteroide I Título.

CDU: 661.8'071.3:616.5

## AGRADECIMENTOS

“...Há tempo de plantar, e tempo de colher o que se plantou...”(Ecl. 3:2). Novos caminhos foram desbravados e frutos estão sendo colhidos. Sei que sozinho não conseguiria ter chegado até aqui! Por isso, sou grato a Deus, por ter me sustentado, fortalecido e dado sabedoria em todo esse tempo. Aos meus familiares, que apesar da distância estão sempre presentes e nunca mediram esforços para eu chegar até aqui. A Minelly, pelo amor, companheirismo, carinho e paciência. Ao Prof. Dr. Ricardo Marreto, pela oportunidade e confiança, e que além de orientador é um grande amigo e conselheiro. A Profa. Dra. Stephania Taveira, pela dedicação, ensinamentos e incentivos. A Profa. Dra. Ana Lúcia pela indicação, confiança e amizade. A Lorena Maione por me ensinar a dar os primeiros passos no laboratório. A Fernanda (Fefê) pelas ajudas constantes. Aos amigos do FarmaTec (Léo, Érica, Marco, Stela, Ana Paula, Fabrícia, Rodrigo, Carla, Edvande, Larissa, Marcelo, Lívia, Percília, Fabiana e Ligia) pelas trocas de ideias e ajudas com os equipamentos, além dos momentos de descontração. A Amélia (Mel) pelas boas risadas. Aos amigos da IBSU/JUBASU e PIBC pelas orações que me sustentam, companhia e almoços nos finais de semana.

“O homem que tem muitos amigos pode congratular-se, mas há amigos mais chegados que irmãos” (Pv. 18:24). Sou forasteiro em terras goianas, contudo, aqui fui bem acolhido e trilhei caminhos que jamais imaginei, mas de tudo o que aconteceu, o que eu sou mais grato a Deus é com a FAMÍLIA que Ele me deu (André, Danillo, João, Letícia, Maiulle, Marilisa, Raphael, Relton).

## RESUMO

O propionato de clobetasol é um dos mais potentes corticosteroides tópicos disponíveis atualmente e tem uso consagrado no tratamento de diferentes patologias cutâneas. Contudo, a sua absorção sistêmica pode causar graves efeitos adversos. O uso de nanocarreadores lipídicos e a aplicação de corrente iontoforética apresentam potencial para promover liberação controlada do propionato de clobetasol e aumentar a sua retenção no estrato córneo, tornando assim sua administração mais segura e efetiva. No presente trabalho, um método cromatográfico foi desenvolvido e validado para quantificação do propionato de clobetasol nos nanocarreadores e na pele de porco, utilizada como modelo de membrana nos estudos de permeação *in vitro*. Carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) foram obtidos pelo método da diluição de microemulsão e CLN revestidos com quitosana (CLN-Q) foram obtidos pelo gotejamento dos CLN em solução de quitosana. Os nanocarreadores desenvolvidos foram caracterizados quanto ao diâmetro médio, índice de polidispersividade, potencial zeta, carga de fármaco, recuperação e eficiência de encapsulação. O perfil de liberação e de permeação *in vitro* do clobetasol livre e nanoencapsulado foi avaliado utilizando células de Franz. Os CLN obtidos apresentaram tamanho de 125 nm e distribuição de tamanho uniforme, com Pdl de 0,25. O aumento no tamanho médio dos CLN-Q, para 257 nm, e a inversão no valor de potencial zeta sugerem que houve revestimento dos CLN pela quitosana, por meio de interação de cargas. Os CLN e CLN-Q apresentaram valores de recuperação maiores que 80% e de eficiência de encapsulação superiores a 90%. O perfil de liberação do clobetasol a partir das formulações desenvolvidas mostrou uma liberação controlada, com cerca de 35% em 24 horas de estudo. A nanoencapsulação do clobetasol nos CLN-Q e CLN resultou em retenção aumentada do fármaco no estrato córneo de 9,2 e 7,8 vezes, respectivamente, comparado ao fármaco livre. A retenção do clobetasol no estrato córneo foi de 4 e 2 vezes maior quando corrente elétrica foi aplicada na formulação CLNQ, comparado ao fármaco livre e encapsulado nos CLN, respectivamente. O acúmulo do fármaco no estrato córneo, promovido pelos carreadores lipídicos, mostrou que esses sistemas são efetivos para entrega tópica deste fármaco com potencial para minimizar sua absorção percutânea, e dessa forma, diminuir os seus efeitos adversos.

Palavras-chave: Propionato de clobetasol. Retenção cutânea. Nanopartículas lipídicas. Quitosana. Permeação cutânea passiva. Iontoforese.

## ABSTRACT

Clobetasol propionate is one of the most potent topical corticosteroids usually available and has been established the use in treatment of various skin pathology. However its systemic absorption may cause serious side effects. The use of lipids nanocarriers and application of iontophoretic current shown potential to further controlled release of clobetasol propionate and increase their retention in the stratum corneum, thus making its management more effective and safe. In this study an analytical method was developed and validated for quantification of clobetasol propionate in nanocarriers and pig skin, used as model membranes *in vitro* permeation studies. Nanostructured lipid carriers (NLC) were obtained by dilution of microemulsion and chitosan-coated NLC (NLC-Ch) by the dripping of NLC in chitosan solution. The developed nanocarriers were characterized to mean diameter, polydispersity index, zeta potential, drug loading, recovery and encapsulation efficiency. The *in vitro* release and permeation profile of clobetasol free and nanoencapsulated was evaluated using Franz cells. The nanocarriers obtained of 125 nm and uniform size distribution, with PDI 0,25. The increase in size of NLC-Ch and the inverting the value of zeta potential, suggest that there was a coating of the CLN by chitosan, through interaction of charges. The NLC and NLC-Ch showed recovery values greater than 80% and encapsulation efficiency than 90%. The release profile of clobetasol from the developed formulations showed a controlled release with 35% in 24 hours of study. The nanoencapsulation of clobetasol in the NLC-Ch and NLC resulted in retention increased in the stratum corneum of 9.2 and 7.8 fold, respectively, compared to free drug. The retention of the clobetasol in the stratum corneum was 4 and 2 times higher when electric current was applied to the formulation CLNQ, compared to the free drug and encapsulated in NLC, respectively. The accumulation of the drug in the stratum corneum, promoted by lipid carriers, shows that these systems are effective for potential topical delivery to minimize the permeation of the drug into the bloodstream and reduces the side effects.

Keywords: Clobetasol propionate. Cutaneous retention. Lipids nanoparticles. Chitosan. Passive cutaneous permeation. Iontophoresis.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1-</b> Esquema ilustrativo da estrutura da pele.....	13
<b>Figura 2 -</b> Vias de permeação de fármacos através do estrato córneo.....	14
<b>Figura 3.</b> Esquema ilustrativo da organização e acomodação do fármaco em nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) e carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN).....	17
<b>Figura 4.</b> Esquema ilustrativo das diferentes formas de organização da matriz lipídica nos CLN.....	18
<b>Figura 5.</b> Mecanismos prováveis de interação das nanopartículas com a pele.....	20
<b>Figura 6.</b> Estrutura molecular da quitina e da quitosana.....	22
<b>Figura 7.</b> Esquema dos mecanismos de transporte iontoforético.....	24
<b>Figura 8.</b> Estrutura química do propionato de clobetasol.....	26
<b>Figura 9.</b> Esquema representativo do procedimento de preparo dos carreadores lipídicos nanoestruturados.....	34
<b>Figura 10.</b> Esquema representativo do procedimento de preparo dos carreadores lipídicos nanoestruturados revestidos com quitosana.....	35
<b>Figura 11.</b> Esquema representativo da célula de difusão vertical tipo “Franz” modificada e ocluída com coleta manual.....	40
<b>Figura 12.</b> Esquema representativo da célula de difusão vertical tipo “Franz” modificada (glikfeld,1988).....	41
<b>Figura 13.</b> Esquema representativo da técnica do <i>tape stripping</i> .....	42
<b>Figura 14.</b> Eletrodos preparados e sistema montado para estudo de permeação iontoforética.....	43
<b>Figura 15.</b> Cromatograma do propionato de clobetasol.....	45
<b>Figura 16.</b> Curva analítica obtida pela análise em CLAE de diferentes diluições do propionato de clobetasol em acetonitrila.....	46
<b>Figura 17.</b> Cromatogramas dos produtos de extração da pele e componentes dos CLN.....	48
<b>Figura 18.</b> Valores de potencial zeta (mV) das dispersões dos CLN e CLN-Q obtidas.....	53
<b>Figura 19.</b> Eficiência de encapsulação e carga de fármaco dos CLN recém-preparados em função da quantidade de clobetasol adicionada ao sistema.....	55
<b>Figura 20.</b> Concentração do propionato de clobetasol solubilizado nos tensoativos polissorbato, lauril sulfato de sódio e taurodeoxicolato de sódio, após 4 horas de agitação magnética à temperatura de 25 °C.....	57
<b>Figura 21.</b> Cromatograma do lauril sulfato de sódio.....	58

<b>Figura 22.</b> Curva de calibração referente ao método analítico para quantificação de propionato de clobetasol, em soluções aquosas de lauril sulfato de sódio a 0,5%, em cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE), nos estudos de liberação e permeação.....	59
<b>Figura 23.</b> Perfil de difusão do propionato de clobetasol a partir da solução LSS 0,5% e de liberação in vitro a partir dos CLN e CLN-Q, utilizando membrana de diálise entre os compartimentos doador e receptor das células verticais do tipo Franz modificadas (n = 6).....	62
<b>Figura 24.</b> Quantidade do propionato de clobetasol retido no estrato córneo de pele de orelha de porco dermatomizada.....	65
<b>Figura 25.</b> Quantidade do propionato de clobetasol acumulada na epiderme viável mais derme (PR) de pele de orelha de porco dermatomizada.....	67
<b>Figura 26.</b> Quantidade do propionato de clobetasol retido no estrato córneo e acumulado na pele remanescente de pele de orelha de porco dermatomizada após três horas de permeação iontoforética.....	69



## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CG%	Carga de fármaco
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLN	Carreadores lipídicos nanoestruturados
CLN-Q	Carreadores lipídicos nanoestruturados revestidos com quitosana
CV%	Desvio padrão relativo
E%	Exatidão
EC	Estrato córneo
EE%	Eficiência de encapsulação
FL	Fármaco livre
FT	Fármaco total
LD	Limite de detecção
LSS	Lauril sulfato de sódio
LQ	Limite de quantificação
mA/cm <sup>2</sup>	miliampere por centímetro quadrado
NLS	Nanopartículas lipídicas sólidas
Pdl	Índice de polidispersividade
PR	Pele remanescente
Rec%	Recuperação

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	11
2 REVISÃO DE LITERATURA .....	13
2.1. PENETRAÇÃO CUTÂNEA DE FÁRMACOS .....	13
2.2 NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS E CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS .....	15
2.3 QUITOSANA .....	21
2.4 MÉTODOS FÍSICOS DE PERMEAÇÃO: IONTOFORESE .....	23
2.5 PROPIONATO DE CLOBETASOL .....	26
3 OBJETIVOS .....	28
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	28
4 MATERIAL E MÉTODOS .....	29
4.1 MATERIAL .....	29
4.1.1 Substâncias e Reagentes .....	29
4.1.2 Equipamentos e Utensílios Diversos .....	29
4.2 MÉTODOS .....	31
4.2.1 Desenvolvimento e Validação da Metodologia Analítica <b>Erro! Indicador não definido.</b>	
4.2.1.1 Quantificação do propionato de clobetasol por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
4.2.1.2 Validação da metodologia analítica .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
4.2.1.2.1 Linearidade .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
4.2.1.2.2 Precisão e Exatidão .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
4.2.1.2.3 Limite de Quantificação (LQ) e Limite de Detecção (LD) .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
4.2.1.2.4 Seletividade – Interferentes da matriz biológica e dos componentes das nanopartículas .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
4.2.1.2.5 Recuperação .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
4.2.2 Preparo e Caracterização dos Carreadores Lipídicos Nanoestruturados (CLN) e Carreadores Lipídicos Nanoestruturados Revestidos com Quitosana (CLN-Q) <b>Erro! Indicador não definido.</b>	
4.2.2.1 Preparo dos Carreadores Lipídicos Nanoestruturados (CLN) .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
4.2.2.2 Preparo dos Carreadores Lipídicos Nanoestruturados (CLN) contendo o propionato de clobetasol .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
4.2.2.2.1 Preparo dos carreadores lipídicos nanoestruturados revestidos com quitosana (CLN-Q) .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
4.2.2.3 Caracterização dos CLN e CLN-Q quanto ao diâmetro médio e distribuição do tamanho .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
4.2.2.4 Caracterização dos CLN e CLN-Q quanto ao potencial zeta .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>

4.2.2.5 Recuperação do fármaco .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
4.2.2.6 Eficiência da encapsulação .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
4.2.2.7 Capacidade de carga e carga de fármaco ...	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
4.2.3 Estudo de Liberação In Vitro .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
4.2.3.1 Avaliação da solubilidade do propionato de clobetasol nas soluções de tensoativos .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
4.2.3.2 Determinação das “sink conditions” .....	38
4.2.3.3 Avaliação da difusão do fármaco livre (FL) e da liberação do fármaco encapsulado nos CLN e CLN-Q.....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
4.2.4 Estudo de Permeação In Vitro.....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
4.2.4.1 Estudo de permeação cutânea passiva .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
4.2.4.1.1 Preparo da pele para determinação da quantidade do clobetasol.....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
4.2.4.1.2 “Tape stripping”, processamento da pele e quantificação do clobetasol .	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
4.2.4.2 Estudo de permeação cutânea iontoforética.....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
4.2.5 Análise Estatística .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
<b>5.1 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA....</b>	<b>ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.</b>
5.1.1 Quantificação do Propionato de Clobetasol por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
5.1.2 Validação da Metodologia Analítica .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
5.1.2.1 Linearidade .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
5.1.2.2 Precisão e Exatidão .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
5.1.2.3 Limite de Quantificação (LQ) e Limite de Detecção (LD)	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
5.1.2.4 Seletividade – Interferentes da matriz biológica e dos componentes dos carreadores lipídicos nanoestruturados .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
5.1.2.5 Recuperação.....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
<b>5.2 PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DOS CLN E CLN-Q</b>	<b>ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.</b>
<b>5.3 ESTUDO DE LIBERAÇÃO IN VITRO .....</b>	<b>ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.</b>
5.3.1 Determinação da Solubilidade do Propionato de Clobetasol em Soluções dos Tensoativos .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
5.3.3 Condição Sink .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
5.3.4 Avaliação da Difusão do Fármaco Livre (FL) e da Liberação do Fármaco Encapsulado nos CLN e CLN-Q.....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
<b>5.5 ESTUDO DE PERMEAÇÃO IN VITRO .....</b>	<b>ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.</b>
5.5.1 Estudo de Permeação Cutânea Passiva .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
5.5.2 Estudo de Permeação Cutânea Iontoforética.....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
<b>6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>32</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>33</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A administração cutânea de fármacos visando tratamento local ou sistêmico é bastante promissora, entretanto, desenvolver sistemas efetivos ainda é uma tarefa desafiadora, principalmente quando a intenção é promover a penetração e a retenção do fármaco nas camadas viáveis da pele, pois a pele é uma barreira natural à entrada de qualquer substância estranha ao organismo (FOLDVARI, 2000; SILVA et al., 2010). Dessa forma, existe busca constante por estratégias para vencer tal barreira sem danificá-la, bem como para promover entrega do fármaco em camadas específicas da pele (NAIK; KALIA; GUY, 2000; ALEXANDER et al., 2012).

Os corticosteroides têm sido amplamente utilizados no tratamento de diferentes tipos de dermatoses. O propionato de clobetasol é um dos mais potentes corticosteroides tópicos disponíveis atualmente (WIEDERSBERG; LEOPOLD; GUY, 2008). Seu uso é consagrado no tratamento de diferentes patologias cutâneas, principalmente aquelas de caráter crônico e que não obtiveram resposta terapêutica eficaz com o uso de outros fármacos (AUSTAD et al., 1998; FONTANA et al., 2011). O propionato de clobetasol é apresentado somente em formas farmacêuticas de uso tópico, pois é considerado como sendo de altíssima potência e sua absorção sistêmica está relacionada a ocorrência de efeitos adversos acentuados, como supressão adrenal e a síndrome de Cushing (SPARIDANS et al., 2010; TEMPARK et al., 2010).

Para garantir a segurança e eficácia desses fármacos, diferentes estratégias podem ser usadas (MAIA; MEHNERT; SCHÄFER-KORTING, 2000; ŞENYIĞIT et al., 2009). Dentre estas, se encontra o desenvolvimento de sistemas nanoestruturados. Esses sistemas são capazes de melhorar a penetração dos fármacos através dos estratos da pele (BORGIA et al., 2005; SCHÄFER-KORTING; MEHNERT; KORTING, 2007; KÜCHLER et al., 2010) e, em alguns casos, levam à redução dos efeitos adversos sistêmicos, devido a redução da absorção percutânea dos fármacos incorporados (MAIA; MEHNERT; SCHÄFER-KORTING, 2000; ŞENYIĞIT et al., 2010; FONTANA et al., 2011).

É válido ressaltar que a modulação da penetração ou retenção cutânea de fármacos incorporados em nanopartículas pode ser realizada por modificações na composição destas. Formulações que apresentam cargas positivas interagem mais

intensamente com o estrato córneo, que apresenta cargas negativas em pH fisiológico, aumentando a interação do sistema com a pele (TAVEIRA; NOMIZO; LOPEZ, 2009; ŞENYIĞIT et al., 2010). Portanto, o preparo de partículas catiônicas pode ser uma estratégia promissora quando se deseja aumentar a retenção do fármaco na pele, favorecendo seu efeito local (PEIRA et al., 2008; ŞENYIĞIT et al., 2010).

Exemplo da aplicação da nanotecnologia para melhora do desempenho de corticoides administrados topicamente é o trabalho de Cevec e Blume (2004). Estes autores encapsularam dois diferentes glicocorticóides, dexametasona e hidrocortisona, em vesículas lipídicas deformáveis (Transferosons<sup>®</sup>). Foi observado que os carreadores agiram como um reservatório do fármaco na pele, o que levou a considerável redução da dose terapêutica, efeito prolongado e aumento da potência biológica para ambos os fármacos, quando comparado com formas farmacêuticas convencionais (creme ou loção).

Outra estratégia para potencializar a penetração e retenção de fármacos na pele é o uso de métodos físicos de penetração cutânea (AULTON, 2006). A iontoforese é um promotor físico de penetração que utiliza corrente elétrica de baixa intensidade, capaz de controlar a penetração de moléculas na pele (OH; GUY, 1995; NOLAN et al., 2003; ŞENYIĞIT et al., 2009). Essa técnica tem se mostrado eficaz em alguns modelos de doenças da pele (ABLA et al., 2005; KIGASAWA et al., 2010).

É possível controlar diferentes parâmetros nesta técnica (intensidade e tempo de aplicação da corrente elétrica, tipo de eletrodos e pH), o que possibilita controlar de forma mais precisa a penetração do fármaco, permitindo esquemas terapêuticos mais complexos (WANG et al., 2005; GRATIERI; GELFUSO; LOPEZ, 2008). A aplicação combinada de nanopartículas e iontoforese pode potencializar a penetração do fármaco através das camadas da pele (WANG et al., 2005; TOMODA et al., 2011).

De acordo com o exposto acima, a proposta do presente trabalho foi determinar o impacto da nanoencapsulação e da aplicação de corrente elétrica sobre a penetração e retenção do propionato de clobetasol nas diferentes camadas da pele. Carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) revestidos ou não com quitosana, foram preparados e avaliados. Em um segundo momento, a influência da iontoforese sobre a penetração e retenção cutânea do fármaco livre e nanoencapsulado foi estudada.

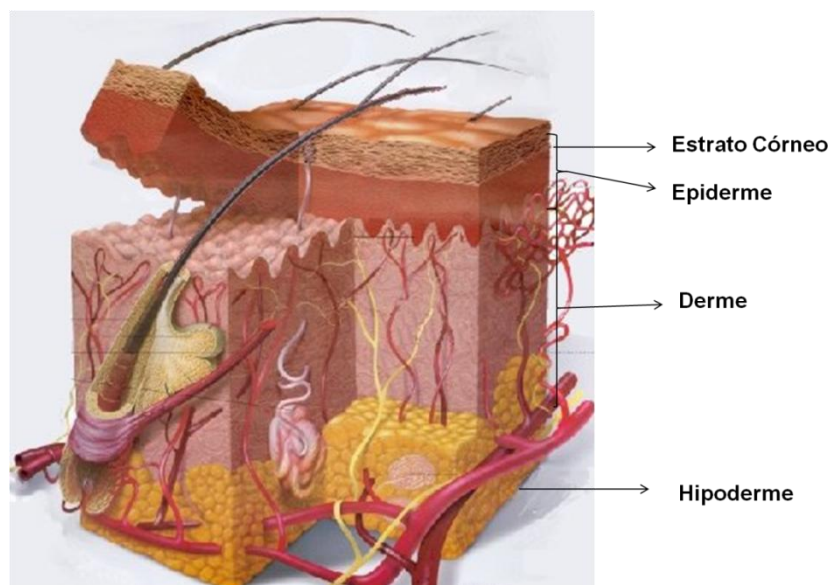
## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. PENETRAÇÃO CUTÂNEA DE FÁRMACOS

A pele é o maior órgão do corpo humano e tem importantes funções biológicas, tais como proteção do organismo contra impactos mecânicos externos, radiação ultravioleta e desidratação. Além disso, a pele consiste em uma eficiente barreira física contra a entrada de microrganismos e substâncias externas (partículas e moléculas) (FOLDVARI, 2000).

A pele humana é formada por três diferentes camadas e apêndices cutâneos, representados pelas glândulas sebáceas, sudoríparas e os folículos pilosos (FOLDVARI, 2000; MOSER et al., 2001). A Figura 1 mostra esquematicamente a estrutura da pele.

Figura 1- Esquema ilustrativo da estrutura da pele.



Fonte: LAMOREA. Transporte através da pele, 2006. Ilustração.

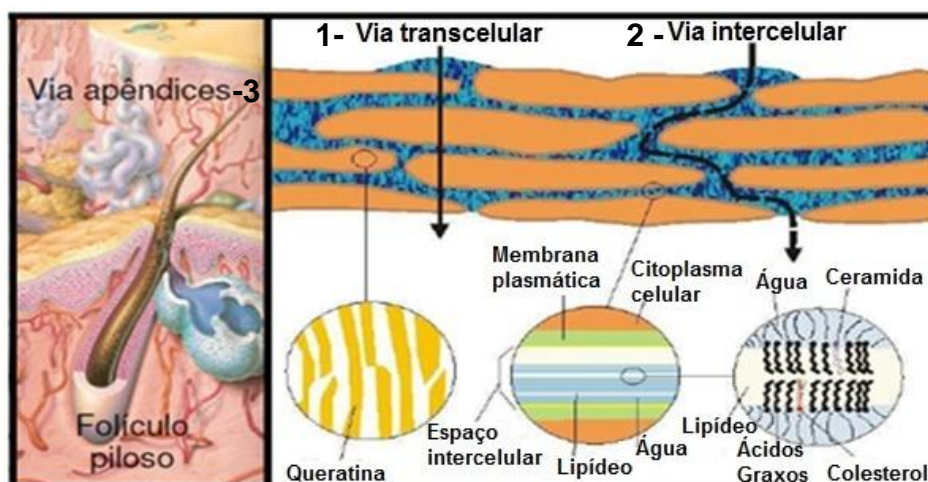
A epiderme é uma camada estratificada e avascular, formada principalmente por várias camadas de células em diferentes estágios de diferenciação. O estrato córneo é a camada mais superficial da pele, constituída basicamente por células mortas preenchidas de queratina (corneócitos) que se encontram embebidas em uma matriz lipídica. Esta matriz lipídica é constituída principalmente de ceramidas, colesterol e ácidos graxos livres organizados em bicamadas lamelares cristalinas.

Tal estrutura confere ao estrato córneo uma forte característica hidrofóbica, e é caracterizada como a principal barreira à penetração de substâncias pela pele (MOSER et al., 2001; BOUWSTRA; HONEYWELL-NGUYEN, 2002).

Essas características fazem da pele uma barreira física à entrada de moléculas no organismo. Vários fatores influenciam na eficiência da pele como barreira à penetração de substâncias exógenas. Tais fatores podem ser de ordem biológica, como o estado da pele, idade, diferenças raciais, fluxo sanguíneo, metabolismo entre outros (BUCK, 2004), bem como podem ser fatores físico-químicos, tais como hidratação, temperatura e pH da pele. Fatores relacionados às características dos permeantes, como forma e tamanho molecular, coeficientes de difusão e partição ou até mesmo a concentração aplicada também afetam a penetração dos mesmos na pele (AULTON, 2006).

O passo determinante da absorção cutânea é a permeação através do estrato córneo. Teoricamente, o fármaco pode atravessar o estrato córneo por três diferentes vias (Figura 2). Na via transcelular, o fármaco se difunde pelas membranas dos corneócitos e pela matriz lipídica intercelular. Na rota intercelular, o fármaco se difunde apenas pela matriz lipídica entre os corneócitos. Por fim, os fármacos podem permear a estrutura pelos apêndices cutâneos. É importante ressaltar que os apêndices cutâneos representam apenas 0,1% da superfície da pele (MOSER et al., 2001; BARRY, 2002; BOLZINGER et al., 2012).

Figura 2 - Vias de permeação de fármacos através do estrato córneo.



Fonte: Gratieri, Gelfuso e Lopez, 2008, p. 1492. 1 – Via transcelular, 2 – Via intercelular e 3 – Via apêndices.

De um modo geral, para uma substância penetrar na pele deve possuir características físico-químicas bastante específicas, tais como massa molecular menor que 500 Da, coeficiente de partição óleo/água maior que 10 e menor que 1000, entre outros. Por isso a grande maioria dos fármacos tem baixa capacidade de penetrar na pele. Fatores relacionados a formulação podem afetar sobremaneira a entrada do fármaco na pele, sendo que sem uma formulação adequada o fármaco dificilmente conseguirá penetrar nas camadas mais profundas da pele e atingir concentrações adequadas no sítio de ação (NAIK; KALIA; GUY, 2000).

Dessa forma, substâncias capazes de modificar temporariamente a permeabilidade da pele, alterando reversivelmente a sua função de barreira, podem apresentar um importante papel na terapêutica. Essas substâncias são conhecidas como promotores de penetração (MARTINS; VEIGA, 2002).

Nas últimas décadas vem ganhando destaque os sistemas de liberação, tais como os nanosistemas, que podem apresentar natureza polimérica ou lipídica, e têm se mostrado efetivos para aplicação de fármacos na pele. Também, métodos físicos de permeação estão sendo bastante explorados, pois alteram/rompem reversivelmente a estrutura de barreira da pele (ALEXANDER *et al.*, 2012), possibilitando assim a penetração de maior quantidade do fármaco no local de ação, de forma controlada. Os métodos físicos de permeação podem levar a respostas mais rápidas que as observadas para os sistemas passivos de permeação, resultando em resposta terapêutica mais eficiente em um menor intervalo de tempo (BAL *et al.*, 2010; ALEXANDER *et al.*, 2012). Além disso, os métodos físicos podem também ser empregados concomitantemente com outros sistemas de liberação (WANG *et al.*, 2005; TOMODA *et al.*, 2012).

## 2.2 NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS E CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS

As nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) são partículas de tamanho nanométrico, formadas a partir de lipídeos que se encontram sólidos à temperatura ambiente (MÜLLER; MÄDER; GOHLA, 2000; MEHNERT; MÄDER, 2012).

Estes sistemas lipídicos possuem as vantagens de serem compostos por substâncias que são muito bem toleradas pelo organismo, são biocompatíveis e biodegradáveis, com potencial para fornecer liberação direcionada e controlada do



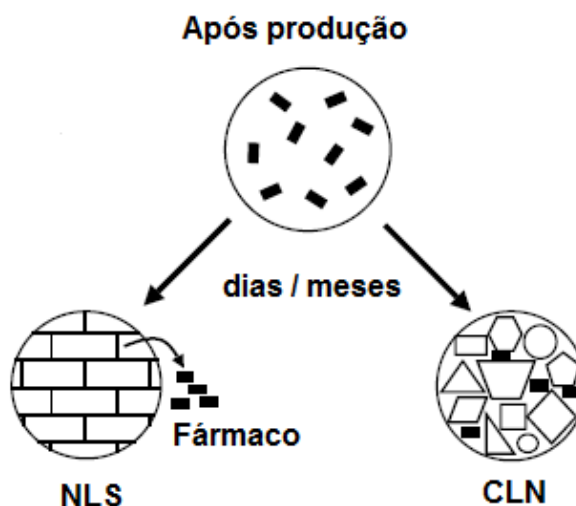
fármaco, e para aumentar a estabilidade do mesmo. Além disso, esses sistemas podem ser produzidos em escala industrial e podem ser submetidos à processos de esterilização por calor (MÜLLER; RADTKE; WISSING, 2002b; WISSING; KAYSER; MÜLLER, 2004).

No entanto, as desvantagens dos sistemas lipídicos sólidos residem em sua reduzida capacidade de incorporar o fármaco, e na ocorrência de expulsão do mesmo em consequência de alterações polimórficas sofridas pela matriz lipídica durante o período de armazenamento (MÜLLER; RADTKE; WISSING, 2002a). Por vezes, no preparo das nanopartículas, a taxa de recristalização dos lipídeos é elevada, levando a cristalização dos mesmos em um estado de maior energia. Com o tempo, esses lipídeos tendem a se reorganizarem em uma forma de menor energia, tornando a matriz lipídica mais organizada, o que leva à expulsão do fármaco que estava inserido entre as imperfeições, como ilustrado na Figura 4 (MÜLLER; RADTKE; WISSING, 2002a; MEHNERT; MÄDER, 2012).

Para contornar os problemas apresentados pelas NLS sugeriram os carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN), que são uma segunda geração de partículas lipídicas, sendo constituídos pela mistura de lipídeos sólidos e líquidos à temperatura ambiente ou pela mistura de lipídeos sólidos com cadeias de tamanhos diferentes (JENNING; THÜNEMANN; GOHLA, 2000; MÜLLER; RADTKE; WISSING, 2002a; OBEIDAT et al., 2010).

Na Figura 3 é possível observar que matrizes lipídicas compostas por uma mistura de lipídeos sólidos e líquidos à temperatura ambiente (CLN) são capazes de acomodar o fármaco com maior eficiência em função do tempo. (MÜLLER; RADTKE; WISSING, 2002a; HU et al., 2005).

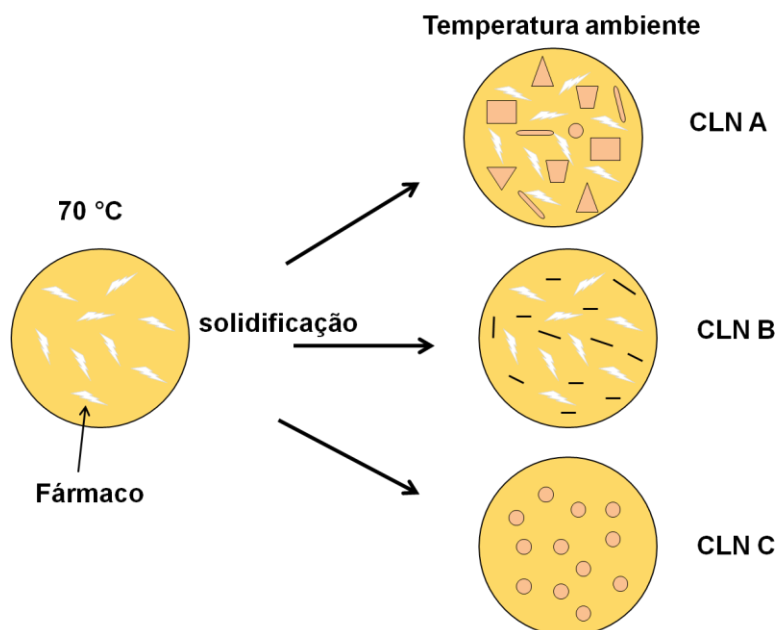
Figura 3 - Esquema ilustrativo da organização e acomodação do fármaco em nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) e carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN).



Fonte: Muller, Radtke, Wissing, 2002a, p. 123.

Nos CLN, a matriz pode assumir três diferentes formas de organização: formação de estrutura cristalina com maior grau de imperfeições (Figura 4A), formação de estrutura amorfa (Figura 4B), ou ainda pode ocorrer a formação de matriz tipo múltipla (fase sólida associada com nanocompartimento oleoso) (Figura 4C). (MÜLLER; RADTKE; WISSING, 2002a).

Figura 4 - Esquema ilustrativo das diferentes formas de organização da matriz lipídica nos CLN.



Legenda: Solidificação da matriz lipídica na forma de cristais imperfeitos (A), no estado amorfo (B) ou matriz múltipla com nanocompartimentos contendo óleos. Fonte: Adaptado de Muller, Radtke e Wissing, 2002a, p.123.

Fármacos com característica lipofílica são mais facilmente incorporados nas nanopartículas lipídicas, podendo estar dissolvidos ou dispersos na matriz lipídica (MÜLLER; MÄDER; GOHLA, 2000; MÜLLER; RADTKE; WISSING, 2002b). Contudo, fármacos com caráter hidrofílico também podem ser encapsulados em nanopartículas lipídicas, se distribuindo principalmente na interface lipídeo-água e, dessa forma, os mesmos são liberados de forma mais rápida (SOUZA et al., 2011).

Diferentes métodos podem ser usados no preparo das nanopartículas lipídicas, dentre eles estão os que utilizam os homogeneizadores de alta pressão (homogeneização a quente ou a frio), o método de emulsificação/evaporação, difusão do solvente, o método da diluição da microemulsão, entre outros (WISSING; KAYSER; MÜLLER, 2004; MEHNERT; MÄDER, 2012).

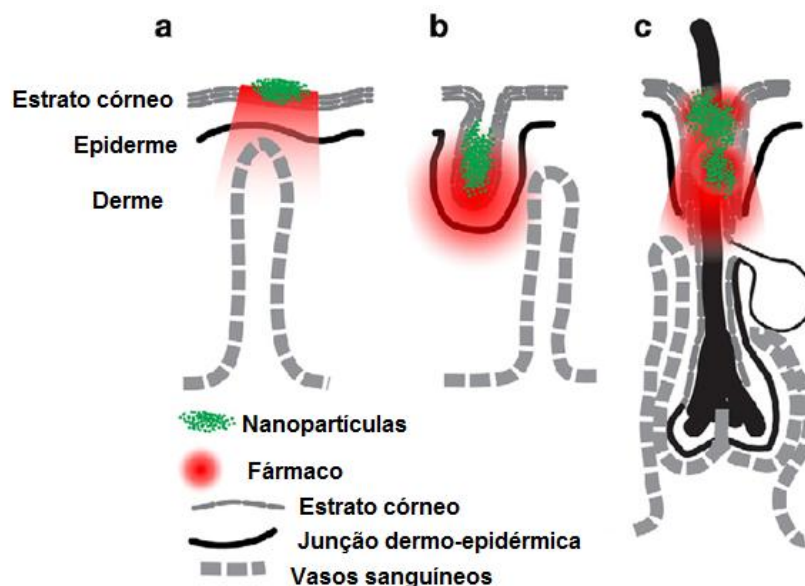
Uma microemulsão é um sistema formado pela mistura de dois líquidos imiscíveis, um dos quais está disperso em escala nanométrica, e estabilizados por uma mistura de tensoativos e co-tensoativos (FORMARIZ et al., 2005). Esse tipo de dispersão é homogênea, termodinamicamente estável e de aparência translúcida. Tem a propriedade de se formar espontaneamente quando os componentes são

misturados nas proporções adequadas, sendo que, neste sistema a proporção de tensoativos na formulação é maior do que a utilizada nas “emulsões grosseiras” (FORMARIZ et al., 2005; NEUBERT, 2011). A técnica da diluição da microemulsão, para preparo das nanopartículas lipídicas, foi desenvolvida e primeiramente descrita por Gasco em 1993. É um método simples e prático, e envolve o preparo de uma microemulsão seguida da sua dispersão em água gelada (cerca de 3 °C) sob agitação vigorosa, com conseqüente solidificação da matriz e formação das nanopartículas. A proporção entre a microemulsão quente e água gelada é, em geral, de 1:20 a 1:50 (MÜLLER; MÄDER; GOHLA, 2000; WISSING; KAYSER; MÜLLER, 2004; MEHNERT; MÄDER, 2012).

Os lipídeos utilizados no preparo das nanopartículas lipídicas devem apresentar baixo ponto de fusão. Contudo, não é recomendado a utilização de lipídeos com ponto de fusão próximo a temperatura corpórea, pois os mesmos devem permanecer sólidos durante sua administração. É importante considerar que a mistura de lipídeos geralmente leva a uma diminuição do ponto de fusão quando comparados com os lipídeos puros (PARDEIKE; HOMMOSS; MÜLLER, 2009) e que o comportamento de solidificação dos lipídeos é diferente quando as estruturas estão na escala nanométrica (MÜLLER; RADTKE; WISSING, 2002a). É importante que o fármaco adicionado ao sistema precipite antes da cristalização da matriz lipídica, para que o mesmo fique aprisionado no interior das partículas e não na interface sendo facilmente expulso para o meio aquoso (MÜLLER; MÄDER; GOHLA, 2000).

O emprego dos CLN na terapêutica dermatológica se baseia nos seus efeitos sobre a pele (Figura 5). A matriz lipídica das nanopartículas pode interagir com os constituintes lipídicos do estrato córneo, o que pode levar a retenção do material na camada mais superficial da pele com liberação gradual do fármaco nesse sítio, seguida de penetração do mesmo nas camadas mais internas. Esses carreadores podem ainda formar um filme na superfície da pele, levando a oclusão e hidratação do estrato córneo resultando em um “afrouxamento” de sua estrutura, o que facilita a penetração do fármaco. Um terceiro provável mecanismo promotor é atribuído ao fato de que esses nanocarreadores podem ocluir os apêndices cutâneos, ficando neles retidos e atuando na forma de depósito (BAROLI, 2010; PROW et al., 2011).

Figura 5 - Mecanismos prováveis de interação das nanopartículas com a pele.



Fonte: Prow, *et al.*, 2011, p 471. (a) Interação das nanopartículas com o estrato córneo, (b) ou acúmulo das nanopartículas nas glândulas e (c) folículos pilosos.

As cargas de superfície das nanopartículas podem oferecer estabilidade física ao sistema, impedindo a aglomeração das partículas que estão em constante movimento dentro da dispersão, por meio da repulsão eletrostática (FREITAS; MÜLLER, 1998). Adicionalmente, essas cargas de superfície têm sido exploradas com o intuito de maximizar a interação das partículas com a pele (PEIRA et al., 2008; RIDOLFI et al., 2012).

O ponto isoelétrico (PI) da pele situa-se entre 4 e 4,5, o que significa que em um pH acima desses valores, a pele apresenta carga negativa, pois os grupos carboxilatos dos aminoácidos presentes nas células encontram-se carregados negativamente (MERINO; KALIA; GUY, 1997). Dessa forma, nanopartículas com carga positiva podem interagir de forma mais intensa com a pele. A quitosana é um biopolímero catiônico que tem sido utilizado no recobrimento de nanocarreadores para aplicação tópica (PROW et al., 2011; P. SHAH; R. DESAI; SINGH, 2012; RIDOLFI et al., 2012).

### 2.3 QUITOSANA

A quitina, poli( $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-*N*-acetil-D-glucosamina), é um biopolímero sintetizado por uma variedade de organismos, e que ocorre na natureza como microfibrilas cristalinas ordenadas que formam os componentes estruturais no exoesqueleto de artrópodes ou nas paredes celulares de fungos e leveduras. É um polissacarídeo que tem recebido grande importância industrial (RAVI KUMAR, 2000; DUTTA; DUTTA; TRIPATHI, 2004; RINAUDO, 2006).

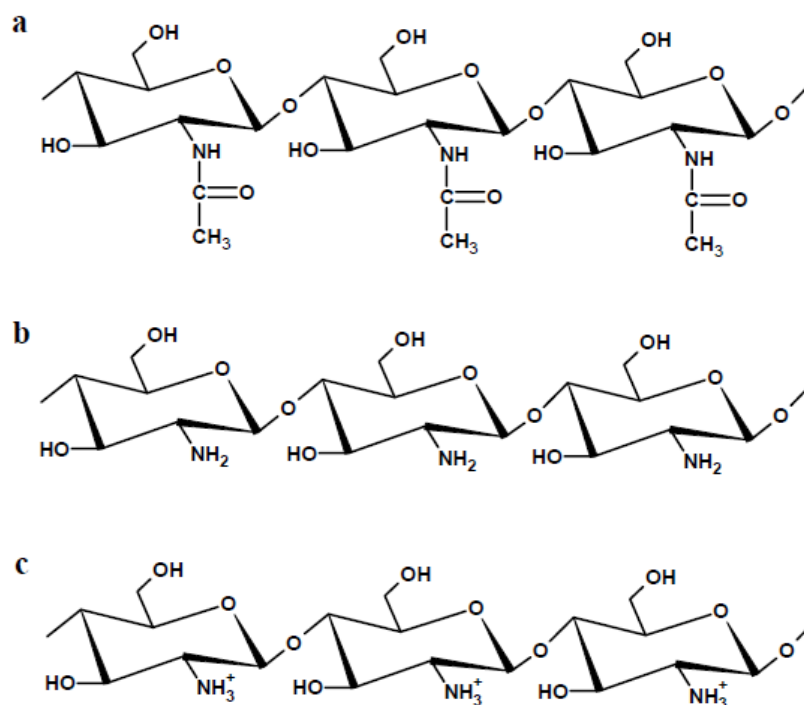
A quitina ocorre em duas diferentes formas,  $\alpha$  e  $\beta$ . A  $\alpha$ -quitina é a forma mais encontrada na natureza. Contudo, tanto a forma  $\alpha$  como a  $\beta$  são insolúveis na maioria dos solventes, limitando bastante o seu uso (Figura 6a) (RINAUDO, 2006; DASH et al., 2011).

O tratamento alcalino leva a uma reação de desacetilação da quitina (Figura 6b), tornando-a solúvel em soluções aquosas ácidas. Quando o grau de desacetilação da quitina é maior que 50% esta passa a ser chamada de quitosana. A dissolução da quitosana é possível devido a protonação do grupamento amino, responsável pela natureza polieletrólítica do polissacarídeo em meio ácido, como pode ser visto na Figura 6c (RAVI KUMAR, 2000; DUTTA; DUTTA; TRIPATHI, 2004).

A quitosana é insolúvel em água, alcoóis, acetonas, bases, sendo completamente solúvel em soluções aquosas ácidas, em pH abaixo de 6,0 (JANEGITZ et al., 2007).

A quitosana é um biopolímero que apresenta importantes propriedades biológicas, baixa toxicidade, biocompatibilidade e biodegradabilidade. Esse biopolímero apresenta ainda propriedades de bioadesão (JANEGITZ et al., 2007; KEAN; THANOU, 2010), devido às forças eletrostáticas atrativas entre os residuais de cargas negativas das membranas celulares e os grupos amino protonados da quitosana (AZEVEDO et al., 2007).

Figura 6 – Estrutura molecular da quitina e da quitosana.



Fonte: Mertins, 2008, p. 24. (a) Quitina 100% acetilada, (b) quitosana 100% desacetilada e (c) quitosana 100% desacetilada e ionizada.

Estas propriedades têm sido extensivamente exploradas na área farmacêutica e a quitosana tem sido utilizada no desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos para administração tópica (ŞENYIĞİT et al., 2010; RIDOLFI et al., 2012), ocular (LUO et al., 2011), gastrointestinal (EL-SHABOURI, 2002; HEJAZI; AMIJI, 2003) e pulmonar (VENTURA et al., 2008; AL-QADI et al., 2012). Sistemas contendo quitosana têm sido utilizados para entrega de proteínas/peptídeos e DNA/RNA (GAN; WANG, 2007; AMIDI et al., 2010; MAO; SUN; KISSEL, 2010), para a liberação de fármacos antitumorais (QI; XU, 2006; YING et al., 2011; XU et al., 2012), entre várias outras aplicações.

## 2.4 MÉTODOS FÍSICOS DE PERMEAÇÃO: IONTOFORESE

A iontoforese é uma técnica não invasiva e que utiliza de uma corrente elétrica constante de baixa intensidade, geralmente menor que  $0,5 \text{ mA/cm}^2$ , visando aumentar a penetração cutânea de fármacos (KALIA et al., 2004; GRATIERI; GELFUSO; LOPEZ, 2008).

O sistema iontoforético é bastante simples, sendo composto por uma bateria, que fornece a energia ao sistema, e dois eletrodos, um positivo (o ânodo) e outro negativo (o cátodo) (Figura 7).

A iontoforese se mostra como método interessante para aumentar a penetração cutânea de moléculas com propriedades físico-químicas diversas (SINGH, MAIBACH, 1996). Sua aplicação possibilita ainda o controle no transporte do fármaco, garantindo dosagem adequada com baixa variabilidade interindividual (KALIA et al., 2004). Os dispositivos iontoforéticos proporcionam liberação do fármaco de forma contínua ou pulsátil, sendo especialmente interessantes para penetração cutânea de hormônios ou fármacos para pacientes com dor crônica, pois possibilitam a aplicação de esquemas terapêuticos mais complexos e com resultados mais eficazes (BAGNIEFSKI, BURNETTE, 1990). Estes dispositivos permitem ainda interromper a aplicação da corrente elétrica à qualquer momento do tratamento, promovendo diminuição ou controle dos níveis plasmáticos do fármaco (SINGH; MAIBACH, 1996; KALIA et al., 2004; WANG et al., 2005). Em vista dessas vantagens é um sistema que apresenta uma boa aceitação pelo paciente.

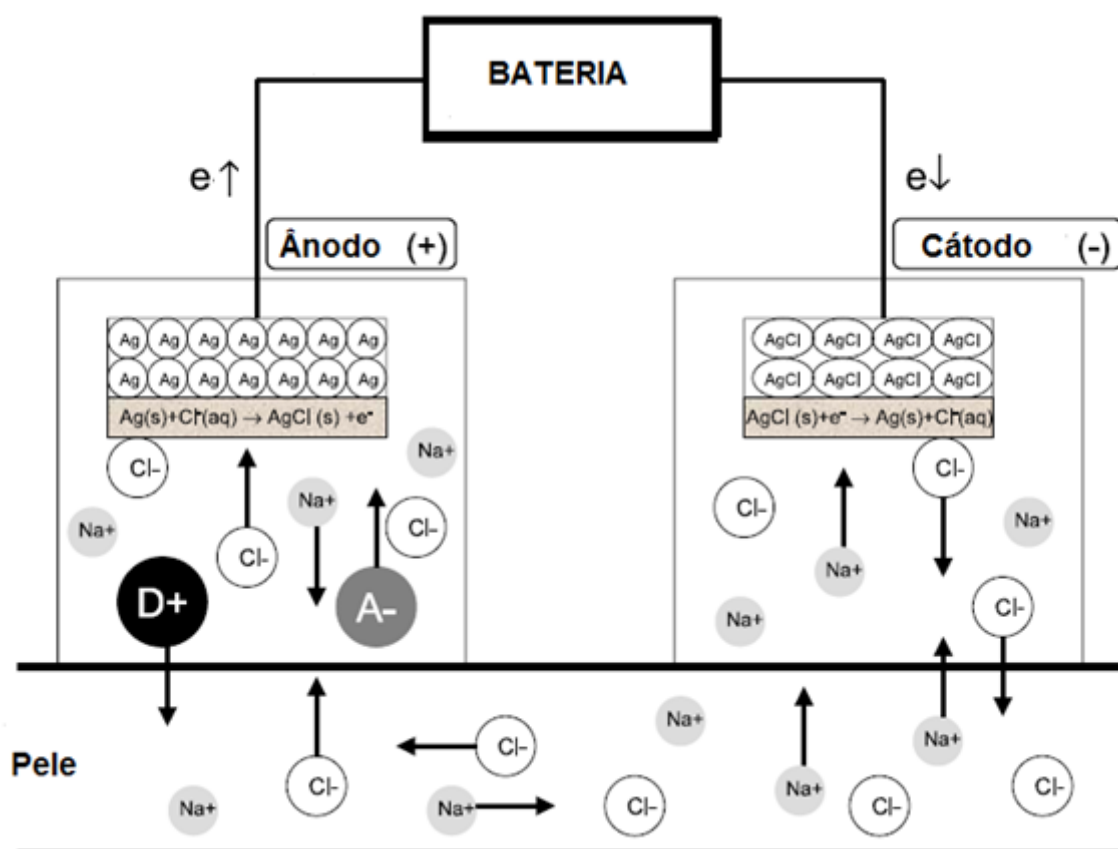
As desvantagens desses sistemas estão relacionadas ao alto custo envolvido no desenvolvimento, o que pode inviabilizar a sua comercialização, bem como na dificuldade de padronização da formulação que ficará em contato com os eletrodos (PANCHAGNULA et al., 2000).

As substâncias podem penetrar na pele por dois mecanismos principais: eletrorrepulsão e/ou eletrosmose. Substâncias carregadas em contato com eletrodos de mesma carga movimentam de acordo com o princípio geral da eletrostática, de que cargas iguais se repelem. Esse mecanismo iontoforético é denominado de eletrorrepulsão ou eletromigração (GUY et al., 2000; KALIA et al., 2004; GRATIERI; GELFUSO; LOPEZ, 2008).



O segundo mecanismo chamado de eletrosmose está relacionado ao fluxo de solvente que resulta da movimentação de cargas quando um potencial elétrico é aplicado na pele. Sobre a influência da corrente elétrica, ocorre um favorecimento do transporte de cátions, devido ao residual de cargas negativas apresentadas pela pele quando em pH acima de 4,5. Dessa forma ocorre um fluxo convectivo dos íons  $\text{Na}^+$ , que ao se movimentarem levam também certo volume de solvente, podendo também levar as moléculas do fármaco (Figura 7). O fluxo eletrosmótico ocorre, portanto, do ânodo em direção ao cátodo, e, se mostra de grande importância no transporte de macromoléculas e de moléculas polares e neutras através da pele (HIRVONEN; GUY, 1997; GUY et al., 2000; PIKAL, 2001).

Figura 7 - Esquema dos mecanismos de transporte iontoforético.



Fonte: Kalia, 2004, p. 621.  $\text{D}^+$  (substância ionizada – cátion) e  $\text{A}^-$  (contra-íon).

Diferentes características da formulação, da molécula ou da própria técnica podem influenciar a penetração iontoforética, tais como o tipo de forma farmacêutica, o pH da formulação, a concentração do fármaco na formulação, o tamanho da molécula, a presença de íons competidores e a intensidade da corrente aplicada (SINGH; MAIBACH, 1996; KALIA et al., 2004; GRATIERI; GELFUSO; LOPEZ, 2008).

A iontoforese é atualmente utilizada no tratamento de doenças como a hiperidrose, e em pacientes em com dores crônicas, mostrando-se eficaz na liberação de opióides, anestésicos tópicos, anti-inflamatórios, corticosteroides e antieméticos (KALIA et al., 2004). Também tem sido explorada para liberação de peptídeos e proteínas terapêuticas, bem como de hormônios, agentes quimioterápicos para tratamento dos cânceres da pele e agentes anti-psoríaticos (SCHAFFNIT; WICKLANDT; MOLL, 1998; DUBEY et al., 2007; ŞENYIĞIT et al., 2009; TAVEIRA; NOMIZO; LOPEZ, 2009).

Dispositivos iontoforéticos estão sendo desenvolvidos por diferentes companhias farmacêuticas, sendo que alguns desses já receberam aprovação para comercialização, estando alguns deles já disponíveis no mercado (LidoSite<sup>®</sup>, E-TRANS<sup>®</sup>, Gluowatch<sup>®</sup>), enquanto outros que estão sendo desenvolvidos por diferentes empresas farmacêuticas como Janssen Pharmaceutica, ALZA, lomed Inc. e Elan Corporation, se encontram em diferentes estágios ou fases clínicas de desenvolvimento (PANCHAGNULA et al., 2000).

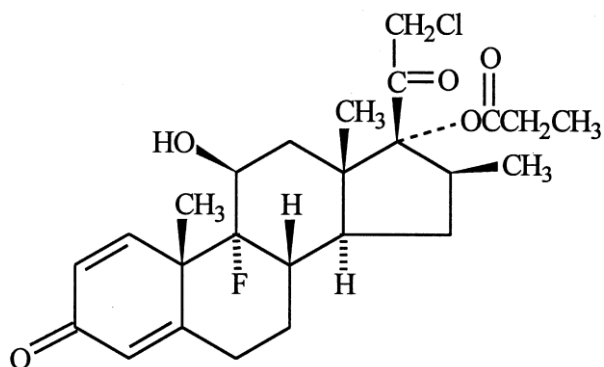
A iontoforese é uma técnica que tem se mostrado bastante versátil possibilitando uma aplicação combinada com outros potencializadores de penetração (PANCHAGNULA et al., 2000; WANG et al., 2005) físicos (JADOUL; BOUWSTRA; PRÉAT, 1999; WANG et al., 2005) ou químicos (NOLAN et al., 2003; LIU et al., 2012), e também em sinergismo com nanossistemas, tais como os lipossomas (KAJIMOTO et al., 2011) e nanopartículas híbridas (revestidas com polímeros) (TOMODA et al., 2011). Na literatura foi encontrado apenas um trabalho utilizando nanopartículas lipídicas sólidas em combinação com a iontoforese (LIU et al., 2008). Os autores relataram um aumento significativo na penetração da triancinolona, um glicocorticoide lipofílico, e atribuíram essa potencialização da penetração aos efeitos combinados do pequeno tamanho das nanopartículas com os efeitos da iontoforese.

Portanto, a combinação de carreadores lipídicos e iontoforese apresenta potencial para melhorar a aplicação tópica do propionato de clobetasol, aumentando a sua retenção nas camadas mais superficiais da epiderme.

## 2.5 PROPIONATO DE CLOBETASOL

Os corticosteroides têm sido amplamente utilizados no tratamento de diferentes condições dermatológicas (TEMPARK et al., 2010; NAM; KWON; LEE, 2011). Corticosteroides tópicos são classificados em quatro classes de acordo com sua potência: baixa, média, alta e potência muito alta (REEPMEYER; REVELLE; VIDAUSKY, 1998; COSTA; MACHADO; SELORES, 2005). O clobetasol é pertencente à classe dos corticosteroides de potência muito alta (COSTA; MACHADO; SELORES, 2005; SPARIDANS et al., 2010). É uma molécula pequena, derivada da prednisolona, com alta atividade glicocorticoide e baixa atividade mineralocorticoide. É uma molécula lipofílica, com um logP de 3,04, e, possui constantes de ionização distintas, apresentando pKa de 12,47 em ácido forte e pKa de - 3,4 em base forte. A sua estrutura química está apresentada na Figura 8.

Figura 8 - Estrutura química do propionato de clobetasol.



Fonte: Reepmeyer, Revelle, Vidasvsky, 1998, p. 239.

O propionato de clobetasol está disponível no mercado em diferentes apresentações, tais como creme, xampu e spray tópico (REEPMEYER; REVELLE; VIDAUSKY, 1998), e tem sido indicado para o tratamento de doenças inflamatórias da pele (SPARIDANS et al., 2010), como a psoríase, dermatite e seborréia (FELDMAN; YENTZER, 2009; NAM; KWON; LEE, 2011). Seu uso é especialmente

efetivo em distúrbios cutâneos de caráter crônico e que não responderam bem à outros esquemas terapêuticos.

Efeitos adversos locais e sistêmicos podem ocorrer, dependendo do tempo de duração do esquema terapêutico (TEMPARK et al., 2010; NAM; KWON; LEE, 2011). Dessa forma, o tratamento com o propionato de clobetasol não pode exceder duas semanas (AUSTAD et al., 1998), e o mesmo deve ser usado em pequenas áreas da pele. Além disso, esse fármaco não é recomendado para crianças (REEPMEYER; REVELLE; VIDAUSKY, 1998).

Quando usado em longo prazo, o clobetasol pode causar efeitos adversos como atrofia e infecção da pele e problemas mais graves como a síndrome de Cushing concomitante com a supressão do eixo adrenal-pituitário-hipotalâmico (REEPMEYER; REVELLE; VIDAUSKY, 1998; TEMPARK et al., 2010).

Com o intuito de tornar mais seguro e eficiente os tratamentos com o propionato de clobetasol, esse fármaco tem sido nanoencapsulado buscando otimizar o tratamento, pela diminuição da dose e de duração tratamento, e controle da absorção percutânea do fármaco. O clobetasol tem sido encapsulado em nanopartículas de lecitina/quitosana (ŞENYIĞİT et al., 2010), em nanocápsulas (FONTANA et al., 2011), em lipossomas (RAO, MURTHY, 2005) e em nanopartículas lipídicas (HU et al., 2002; HU et al., 2005; 2006). Nanopartículas lipídicas sólidas com matriz lipídica composta de monoestearina, contendo o clobetasol, foram preparadas pelo método de difusão do solvente, e apresentaram tamanho de 140 a 430 nm. Esses sistemas lipídicos nanoparticulados foram capazes de controlar a liberação do fármaco, e apresentaram um perfil de liberação inicial rápida, seguida de liberação prolongada, com 60% do clobetasol liberado em 96 horas de estudo (HU et al., 2002).

### 3 OBJETIVOS

O objetivo do presente trabalho foi desenvolver e caracterizar carreadores lipídicos nanoestruturados, revestidos ou não com quitosana, contendo o propionato de clobetasol para aplicação tópica e avaliar o efeito da aplicação de corrente iontoforética sobre a penetração e retenção do fármaco livre e nanoencapsulado em diferentes camadas da pele.

#### 3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN), pela técnica da diluição da microemulsão;
- Desenvolver carreadores lipídicos nanoestruturados revestidos com quitosana (CLN-Q);
- Caracterizar os CLN e os CLN-Q obtidos quanto ao diâmetro médio, índice de polidispersividade (Pdl), potencial zeta, eficiência de encapsulação, recuperação do fármaco e pH da dispersão;
- Desenvolver e validar uma metodologia analítica para quantificação do propionato de clobetasol;
- Avaliar a difusão/liberação *in vitro* do propionato de clobetasol na forma de fármaco livre (FL) e a partir dos CLN e CLN-Q;
- Avaliar a penetração cutânea *in vitro* do propionato de clobetasol a partir da solução de FL e dos CLN e CLN-Q, usando modelo de pele de orelha de porco;
- Avaliar o efeito da aplicação de corrente iontoforética sobre a penetração e retenção do propionato de clobetasol na pele;

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAL

#### 4.1.1 SUBSTÂNCIAS E REAGENTES

- Acetonitrila HPLC – JT Baker, EUA.
- Ácido acético glacial – Merck, Alemanha.
- Ácido esteárico puríssimo – Vetec, Brasil.
- Ácido oléico – Sigma Aldrich, EUA.
- Água ultra-pura Mili-Q – Millipore, EUA.
- Cloreto de prata (99% de pureza), Sigma Aldrich, EUA.
- Cloreto de sódio (P.A.) – Vetec, Brasil.
- Fosfatidilcolina de soja – Lipoid S100 (100% PC), Lipoid, Alemanha.
- Lauril sulfato de sódio (mín. 90%) – Vetec, Brasil.
- Metanol HPLC – JTBaker, EUA.
- Pele de orelha de porco – Frigorífico Sol Nascente, Goiânia, Brasil.
- Propionato de clobetasol (>98% de pureza) – Sigma Aldrich, EUA.
- Quitosana (baixo peso molecular 50-190 KDa, com  $\geq 75\%$  de deacetilação) – Sigma Aldrich, EUA.
- Taurodeoxicolato de Sódio – Sigma Aldrich, EUA.
- Trietanolamina – Synth, Brasil.

#### 4.1.2 EQUIPAMENTOS E UTENSÍLIOS DIVERSOS

- Agitador de tubos Vórtex VG3 – IKA, Alemanha.
- Balança analítica Adveturer<sup>®</sup> – Ohaus, México.
- Banho de Ultrassom USC-2899A – Unique, Brasil.
- Chapa aquecedora com agitação magnética C-MAGHS7 – IKA, Alemanha.
- Coluna ZORBAX Eclipse XDB-C18 coluna (250 x 4.6mm, 5 $\mu$ m) – Agilent, EUA.

- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE) – Bomba isocrática (ProStar 210), com amostrador automático (ProStar 400) e detector na região do ultravioleta (ProStar 325) – Varian, EUA.
- Dermatômetro TCM 300 – Nouvag, Suíça.
- Espectrofotômetro CARY UV-Visível – Varian, EUA.
- Fios de prata e de platina, Sigma Aldrich, EUA.
- Fita adesiva (Durex<sup>®</sup> Original 500) – 3M, Brasil.
- Fonte de energia (BHK-2000-20MG) - KEPCO<sup>®</sup> High Voltage Power Supply, USA.
- Freezer (-80°C) – Thermo Fisher Scientific, EUA.
- Membrana de diálise FisherBrand (peso molecular 12.000-14.000 Da) de celulose regenerada – Fisher Scientific, Reino Unido.
- Minicentrífuga (Minispin plus<sup>®</sup>) – Eppendorf, EUA .
- Mini-incubadora Ma 410 – Marconi, Brasil.
- pHmetro PG1800 – Gehaka, Brasil.
- Pipetadores automáticos (calibragem: 10-100µL, 100-1000µL e 0,5-10mL) – Brand, Alemanha.
- Sistema de permeação de coleta manual (modelo sistema microette plus<sup>®</sup> 58-001-801) - Hanson Research, EUA.
- Termômetro de infravermelho – Incoterm, Brasil.
- Ultra-Turrax<sup>®</sup> T25 Digital – IKA, Alemanha.
- ZetaSizer Nano-S – Malvern Instruments, Reino Unido.
- ZetaSizer Nano-ZS – Malvern Instruments, Reino Unido.

## 4.2 MÉTODOS

Desenvolvimento e Validação da metodologia analítica, em cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE, para quantificação do clobetasol nos carreadores lipídicos nanoestruturados e nos estudos de liberação e permeação *in vitro*

Preparo dos carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN), pela técnica de diluição da microemulsão, e dos carreadores lipídicos nanoestruturados revestidos com quitosana (CLN-Q), por gotejamento dos CLN em solução de quitosana

Caracterização dos CLN e CLN-Q quanto ao diâmetro médio, índice de polidispersão, potencial zeta, eficiência de encapsulação e capacidade de carga do fármaco

Estudo de liberação *in vitro* do fármaco em solução micelar e encapsulado nos CLN e CLN-Q, em células de Franz com membrana sintética

Estudo de permeação cutânea passiva, *in vitro*, do fármaco em solução micelar e encapsulado nos CLN e CLN-Q, em células de permeação descritas por Glikfeld e utilizando pele de orelha de porco como membrana biológica

Estudo de permeação cutânea iontoforética, *in vitro*, do fármaco em solução micelar e encapsulado nos CLN e CLN-Q, em células de permeação descritas por Glikfeld e utilizando pele de orelha de porco como membrana biológica

Avaliação das variáveis através de estudos estatísticos



## 6 CONCLUSÕES

A eficácia e segurança da aplicação tópica de corticosteroides, como o propionato de clobetasol (PC), dependem significativamente do desenvolvimento de sistemas e/ou métodos que assegurem baixa dosagem e menor tempo de tratamento, bem como proporcionem liberação controlada e direcionada do fármaco para sítios específicos. No presente trabalho, um método analítico para quantificação do propionato de clobetasol em carreadores lipídicos e na pele foi desenvolvido e validado, mostrando linearidade, sensibilidade e seletividade. Carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) contendo o clobetasol foram desenvolvidos e caracterizados. Os nanosistemas mostraram vantagens para aplicação tópica, tais como pequeno tamanho (diâmetro médio de 125 e 280 nm, para os CLN e CLN revestidos com quitosana – CLN-Q, respectivamente), estreita distribuição de tamanho (Pdl menor que 0,3) e valores de potencial zeta maiores que  $\pm 30$  mV. Os CLN e CLN-Q proporcionaram maior retenção do fármaco no estrato córneo, quando comparado com o clobetasol na forma micelar. Esses dados sugerem que os sistemas lipídicos podem formar reservatórios na pele, liberando pequenas quantidades do fármaco para ação nos receptores de glicocorticoides locais por tempo prolongado. Os carreadores ainda apresentaram boa eficiência de encapsulação e carga de fármaco satisfatória de aproximadamente 90% e 1,2%, respectivamente. A aplicação de corrente elétrica por três horas, levou a um aumento na retenção do fármaco no estrato córneo de aproximadamente 4 e 2 vezes, para os CLNQ, quando comparados, respectivamente, ao fármaco livre e encapsulado nos CLN. Os sistemas/método utilizados neste estudo apresentam benefícios potenciais para o tratamento de patologias cutâneas à base de clobetasol, mostrando-se promissores para minimizar tanto os efeitos adversos locais como os efeitos sistêmicos proporcionados pelo uso de corticosteroides muito potentes.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABLA, N.; NAIK, A.; GUY, R. H.; KALIA, Y. N. Contributions of electromigration and electroosmosis to peptide iontophoresis across intact and impaired skin. **Journal of Controlled Release**, v. 108, n. 2–3, p. 319-330, 2005.

AL-QADI, S.; GRENHA, A.; CARRIÓN-RECIO, D.; SEIJO, B.; REMUÑÁN-LÓPEZ, C. Microencapsulated chitosan nanoparticles for pulmonary protein delivery: In vivo evaluation of insulin-loaded formulations. **Journal of Controlled Release**, v. 157, n. 3, p. 383-390, 2012.

ALEXANDER, A.; DWIVEDI, S.; AJAZUDDIN; GIRI, T. K.; SARAF, S.; SARAF, S.; TRIPATHI, D. K. Approaches for breaking the barriers of drug permeation through transdermal drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 164, n. 1, p. 26-40, 2012.

AMIDI, M.; MASTROBATTISTA, E.; JISKOOT, W.; HENNINK, W. E. Chitosan-based delivery systems for protein therapeutics and antigens. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 62, n. 1, p. 59-82, 2010.

AULTON, M.E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. Artmed, 2 ed., 2006.

AUSTAD, J.; BJERKE, J. R.; GJERTSEN, B. T.; HELLAND, S.; LIVDEN, J. K.; MORKEN, T.; MORK, N. J. Clobetasol propionate followed by calcipotriol is superior to calcipotriol alone in topical treatment of psoriasis. **J Eur Acad Dermatol Venereol**, v. 11, n. 1, p. 19-24, 1998.

AZEVEDO, V. V. C.; CHAVES, S. A.; BEZERRA, D. C.; FOOK, M. V. L.; M.COSTA, A. C. F. **Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais**. Revista Eletrônica de Materiais e Processos. Campina Grande. 2.3: 27-34 p. 2007.

BAROLI, B. Penetration of nanoparticles and nanomaterials in the skin: fiction or reality? **J Pharm Sci**, v. 99, n. 1, p. 21-50, 2010.

BARRY, B. W. Drug delivery routes in skin: a novel approach. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, Supplement, n. 0, p. S31-S40, 2002.

BOLZINGER, M.-A.; BRIANÇON, S.; PELLETIER, J.; CHEVALIER, Y. Penetration of drugs through skin, a complex rate-controlling membrane. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 17, n. 3, p. 156-165, 2012.

BORGIA, S. L.; REGEHLY, M.; SIVARAMAKRISHNAN, R.; MEHNERT, W.; KORTING, H. C.; DANKER, K.; RÖDER, B.; KRAMER, K. D.; SCHÄFER-KORTING, M. Lipid nanoparticles for skin penetration enhancement—correlation to drug localization within the particle matrix as determined by fluorescence and piezoelectric spectroscopy. **Journal of Controlled Release**, v. 110, n. 1, p. 151-163, 2005.

BORRÁS-BLASCO, J.; LÓPEZ, A.; MORANT, M. J.; DÍEZ-SALES, O.; HERRÁEZ-DOMÍNGUEZ, M. Influence of sodium lauryl sulphate on the in vitro percutaneous absorption of compounds with different lipophilicity. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 5, n. 1, p. 15-22, 1997.

BOUWSTRA, J. A.; HONEYWELL-NGUYEN, P. L. Skin structure and mode of action of vesicles. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, Supplement, n. 0, p. S41-S55, 2002.

BUCK, P. Skin barrier function: effect of age, race and inflammatory disease. **International Journal of Aromatherapy**, v. 14, n. 2, p. 70-76, 2004.

CEVEC, G.; BLUME, G. Hydrocortisone and dexamethasone in very deformable drug carriers have increased biological potency, prolonged effect, and reduced therapeutic dosage. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1663, p. 61-73, 2004.

CHEN-YU, G.; CHUN-FEN, Y.; QI-LU, L.; QI, T.; YAN-WEI, X.; WEI-NA, L.; GUANG-XI, Z. Development of a Quercetin-loaded nanostructured lipid carrier formulation for topical delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 430, n. 1–2, p. 292-298, 2012.

COSTA, A. D.; MACHADO, S.; SELORES, M. Corticóides tópicos: Considerações sobre a sua aplicação na patologia cutânea. **Rev Port Clin Geral**, v. 21, p. 367-373, 2005.

DASH, M.; CHIELLINI, F.; OTTENBRITE, R. M.; CHIELLINI, E. Chitosan—A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. **Progress in Polymer Science**, v. 36, n. 8, p. 981-1014, 2011.

DE ROSA, F. S.; TEDESCO, A. C.; LOPEZ, R. F. V.; RIEMMA PIERRE, M. B.; LANGE, N.; MARCHETTI, J. M.; GOMES ROTTA, J. C.; LOPES BADRA BENTLEY, M. V. In vitro skin permeation and retention of 5-aminolevulinic acid ester derivatives for photodynamic therapy. **Journal of Controlled Release**, v. 89, n. 2, p. 261-269, 2003.

DUBEY, V.; MISHRA, D.; DUTTA, T.; NAHAR, M.; SARAF, D. K.; JAIN, N. K. Dermal and transdermal delivery of an anti-psoriatic agent via ethanolic liposomes. **Journal of Controlled Release**, v. 123, n. 2, p. 148-154, 2007.

DUTTA, P. K.; DUTTA, J.; TRIPATHI, V. S. Chitin and Chitosan: chemistry, properties and applications. **Journal of Scientific & Industrial Research**, v. 63, p. 20-31, 2004.

EL-SHABOURI, M. H. Positively charged nanoparticles for improving the oral bioavailability of cyclosporin-A. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 249, n. 1–2, p. 101-108, 2002.

FANG, J.-Y.; FANG, C.-L.; LIU, C.-H.; SU, Y.-H. Lipid nanoparticles as vehicles for topical psoralen delivery: Solid lipid nanoparticles (SLN) versus nanostructured lipid carriers (NLC). **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 70, n. 2, p. 633-640, 2008.

FELDMAN, S. R.; YENTZER, B. A. Topical clobetasol propionate in the treatment of psoriasis: a review of newer formulations. **Am J Clin Dermatol**, v. 10, n. 6, p. 397-406, 2009.

FOLDVARI, M. Non-invasive administration of drugs through the skin: challenges in delivery system design. **Pharmaceutical Science & Technology Today**, v. 3, n. 12, p. 417-425, 2000.

FONTANA, M. C.; REZER, J. F. P.; CORADINI, K.; LEAL, D. B. R.; BECK, R. C. R. Improved efficacy in the treatment of contact dermatitis in rats by a dermatological nanomedicine containing clobetasol propionate. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 79, n. 2, p. 241-249, 2011.

FORMARIZ, T. P.; URBAN, M. C. C.; JÚNIOR, A. A. D. S.; GREMIÃO, M. P. D.; OLIVEIRA, A. G. D. Microemulsões e fases líquidas cristalinas como sistemas de liberação de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 3, p. 301-313, 2005.

FREITAS, C.; MÜLLER, R. H. Effect of light and temperature on zeta potential and physical stability in solid lipid nanoparticle (SLN™) dispersions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 168, n. 2, p. 221-229, 1998.

GAN, Q.; WANG, T. Chitosan nanoparticle as protein delivery carrier—Systematic examination of fabrication conditions for efficient loading and release. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 59, n. 1, p. 24-34, 2007.

GRATIERI, T.; GELFUSO, G. M.; LOPEZ, R. F. V. Princípios Básicos e Aplicação da Iontoforese na Penetração Cutânea de Fármacos. **Química Nova**, v. 31, n. 6, p. 1490-1498, 2008.

GUY, R. H.; KALIA, Y. N.; DELGADO-CHARRO, M. B.; MERINO, V.; LÓPEZ, A.; MARRO, D. Iontophoresis: electrorepulsion and electroosmosis. **Journal of Controlled Release**, v. 64, n. 1–3, p. 129-132, 2000.

HARRISON, S. M.; BARRY, B. W.; DUGARD, P. H. Effects of freezing on human skin permeability. **Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 36, 1984.

HEJAZI, R.; AMIJI, M. Chitosan-based gastrointestinal delivery systems. **Journal of Controlled Release**, v. 89, n. 2, p. 151-165, 2003.

HIRVONEN, J.; GUY, R. H. Iontophoretic delivery across the skin: electroosmosis and its modulation by drug substances. **Pharm Res**, v. 14, n. 9, p. 1258-63, 1997.

HU, F.-Q.; JIANG, S.-P.; DU, Y.-Z.; YUAN, H.; YE, Y.-Q.; ZENG, S. Preparation and characterization of stearic acid nanostructured lipid carriers by solvent diffusion method in an aqueous system. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 45, n. 3–4, p. 167-173, 2005.

\_\_\_\_\_. Preparation and characteristics of monostearin nanostructured lipid carriers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 314, n. 1, p. 83-89, 2006.

HU, F. Q.; YUAN, H.; ZHANG, H. H.; FANG, M. Preparation of solid lipid nanoparticles with clobetasol propionate by a novel solvent diffusion method in aqueous system and physicochemical characterization. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 239, n. 1–2, p. 121-128, 2002.

JADOUL, A.; BOUWSTRA, J.; PRÉAT, V. Effects of iontophoresis and electroporation on the stratum corneum: Review of the biophysical studies. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 35, n. 1, p. 89-105, 1999.

JANEGITZ, B. C.; LOURENÇÃO, B. C.; LUPETTI, K. O.; FATIBELLO-FILHO, O. Desenvolvimento de um método empregando quitosana para remoção de íons metálicos de águas residuárias. **Química Nova**, v. 30, n. 4, p. 879-884, 2007.

JENNING, V.; THÜNEMANN, A. F.; GOHLA, S. H. Characterisation of a novel solid lipid nanoparticle carrier system based on binary mixtures of liquid and solid lipids. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 199, n. 2, p. 167-177, 2000.

JOSHI, M.; PATRAVALE, V. Nanostructured lipid carrier (NLC) based gel of celecoxib. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 346, n. 1–2, p. 124-132, 2008.

- KAJIMOTO, K.; YAMAMOTO, M.; WATANABE, M.; KIGASAWA, K.; KANAMURA, K.; HARASHIMA, H.; KOGURE, K. Noninvasive and persistent transfollicular drug delivery system using a combination of liposomes and iontophoresis. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 403, n. 1–2, p. 57-65, 2011.
- KALIA, Y. N.; NAIK, A.; GARRISON, J.; GUY, R. H. Iontophoretic drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n. 5, p. 619-658, 2004.
- KEAN, T.; THANOU, M. Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 62, n. 1, p. 3-11, 2010.
- KIGASAWA, K.; KAJIMOTO, K.; HAMA, S.; SAITO, A.; KANAMURA, K.; KOGURE, K. Noninvasive delivery of siRNA into the epidermis by iontophoresis using an atopic dermatitis-like model rat. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 383, n. 1–2, p. 157-160, 2010.
- KÜCHLER, S.; HERRMANN, W.; PANEK-MINKIN, G.; BLASCHKE, T.; ZOSCHKE, C.; KRAMER, K. D.; BITTL, R.; SCHÄFER-KORTING, M. SLN for topical application in skin diseases—Characterization of drug–carrier and carrier–target interactions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 390, n. 2, p. 225-233, 2010.
- KUNTSCHKE, J.; BUNJES, H.; FAHR, A.; PAPPINEN, S.; RÖNKKÖ, S.; SUHONEN, M.; URTTI, A. Interaction of lipid nanoparticles with human epidermis and an organotypic cell culture model. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 354, n. 1–2, p. 180-195, 2008.
- KURITA, K. Chemistry and application of chitin and chitosan. **Polymer Degradation and Stability**, v. 59, n. 1–3, p. 117-120, 1998.
- LADEMANN, J.; JACOBI, U.; SURBER, C.; WEIGMANN, H. J.; FLUHR, J. W. The tape stripping procedure – evaluation of some critical parameters. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 72, n. 2, p. 317-323, 2009.
- LIU, K.-C.; GREEN, C. R.; ALANY, R. G.; RUPENTHAL, I. D. Synergistic effect of chemical penetration enhancer and iontophoresis on transappendageal transport of oligodeoxynucleotides. **International Journal of Pharmaceutics**, 2012.
- LIU, W.; HU, M.; LIU, W.; XUE, C.; XU, H.; YANG, X. Investigation of the carbopol gel of solid lipid nanoparticles for the transdermal iontophoretic delivery of triamcinolone acetonide acetate. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 364, n. 1, p. 135-141, 2008.
- LUO, Q.; ZHAO, J.; ZHANG, X.; PAN, W. Nanostructured lipid carrier (NLC) coated with Chitosan Oligosaccharides and its potential use in ocular drug delivery system. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 403, n. 1–2, p. 185-191, 2011.
- MAIA, C. S.; MEHNERT, W.; SCHÄFER-KORTING, M. Solid lipid nanoparticles as drug carriers for topical glucocorticoids. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 196, n. 2, p. 165-167, 2000.
- MAO, S.; SUN, W.; KISSEL, T. Chitosan-based formulations for delivery of DNA and siRNA. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 62, n. 1, p. 12-27, 2010.
- MARTINS, M. R. F. M.; VEIGA, F. Promotores de permeação para a liberação transdérmica de fármacos: uma nova aplicação para as ciclodextrinas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n. 1, p. 33-54, 2002.

- MEHNERT, W.; MÄDER, K. Solid lipid nanoparticles: Production, characterization and applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, Supplement, n. 0, p. 83-101, 2012.
- MERINO, V.; KALIA, Y. N.; GUY, R. H. Transdermal therapy and diagnosis by iontophoresis. **Trends in Biotechnology**, v. 15, n. 8, p. 288-290, 1997.
- MOSER, K.; KRIWET, K.; NAIK, A.; KALIA, Y. N.; GUY, R. H. Passive skin penetration enhancement and its quantification in vitro. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 52, n. 2, p. 103-112, 2001.
- MÜLLER, R. H.; MÄDER, K.; GOHLA, S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery – a review of the state of the art. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 50, n. 1, p. 161-177, 2000.
- MÜLLER, R. H.; RADTKE, M.; WISSING, S. A. Nanostructured lipid matrices for improved microencapsulation of drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 242, n. 1–2, p. 121-128, 2002a.
- \_\_\_\_\_. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, Supplement, n. 0, p. S131-S155, 2002b.
- NAIK, A.; KALIA, Y. N.; GUY, R. H. Transdermal drug delivery: overcoming the skin's barrier function. **Pharmaceutical Science & Technology Today**, v. 3, n. 9, p. 318-326, 2000.
- NAM, Y. S.; KWON, I. K.; LEE, K. B. Monitoring of clobetasol propionate and betamethasone dipropionate as undeclared steroids in cosmetic products manufactured in Korea. **Forensic Sci Int**, v. 210, n. 1-3, p. 144-8, 2011.
- NEUBERT, R. H. H. Potentials of new nanocarriers for dermal and transdermal drug delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 77, n. 1, p. 1-2, 2011.
- NOLAN, L. M. A.; CORISH, J.; CORRIGAN, O. I.; FITZPATRICK, D. Iontophoretic and chemical enhancement of drug delivery: Part I: Across artificial membranes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 257, n. 1–2, p. 41-55, 2003.
- OBEIDAT, W. M.; SCHWABE, K.; MÜLLER, R. H.; KECK, C. M. Preservation of nanostructured lipid carriers (NLC). **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 76, n. 1, p. 56-67, 2010.
- OH, S. Y.; GUY, R. H. Effects of iontophoresis on the electrical properties of human skin in vivo. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 124, n. 1, p. 137-142, 1995.
- OLBRICH, C.; MÜLLER, R. H. Enzymatic degradation of SLN—effect of surfactant and surfactant mixtures. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 180, n. 1, p. 31-39, 1999.
- P. SHAH, P.; R. DESAI, P.; SINGH, M. Effect of oleic acid modified polymeric bilayered nanoparticles on percutaneous delivery of spantide II and ketoprofen. **Journal of Controlled Release**, v. 158, n. 2, p. 336-345, 2012.
- PANCHAGNULA, R.; PILLAI, O.; NAIR, V. B.; RAMARAO, P. Transdermal iontophoresis revisited. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 4, n. 4, p. 468-473, 2000.

PEIRA, E.; CARLOTTI, M. E.; TROTTA, C.; CAVALLI, R.; TROTTA, M. Positively charged microemulsions for topical application. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 346, n. 1–2, p. 119-123, 2008.

PIKAL, M. J. The role of electroosmotic flow in transdermal iontophoresis. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 9, n. 2–3, p. 201-237, 1992.

\_\_\_\_\_. The role of electroosmotic flow in transdermal iontophoresis. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 46, n. 1–3, p. 281-305, 2001.

PROW, T. W.; GRICE, J. E.; LIN, L. L.; FAYE, R.; BUTLER, M.; BECKER, W.; WURM, E. M. T.; YOONG, C.; ROBERTSON, T. A.; SOYER, H. P.; ROBERTS, M. S. Nanoparticles and microparticles for skin drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, n. 6, p. 470-491, 2011.

QI, L.; XU, Z. In vivo antitumor activity of chitosan nanoparticles. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 16, n. 16, p. 4243-4245, 2006.

RAVI KUMAR, M. N. V. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive and Functional Polymers**, v. 46, n. 1, p. 1-27, 2000.

REEPMEYER, J. C.; REVELLE, L. K.; VIDAUSKY, I. Detection of clobetasol propionate as an undeclared steroid in zinc pyrithione formulations by high-performance liquid chromatography with rapid-scanning ultraviolet spectroscopy and mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 828, n. 1–2, p. 239-246, 1998.

RIBAUD, C.; GARSON, J. C.; DOUCET, J.; LEVEQUE, J. L. Organization of stratum corneum lipids in relation to permeability: influence of sodium lauryl sulfate and preheating. **Pharm Res**, v. 11, n. 10, p. 1414-8, 1994.

RIDOLFI, D. M.; MARCATO, P. D.; JUSTO, G. Z.; CORDI, L.; MACHADO, D.; DURÁN, N. Chitosan-solid lipid nanoparticles as carriers for topical delivery of tretinoin. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 93, n. 0, p. 36-40, 2012.

RINAUDO, M. Chitin and chitosan: Properties and applications. **Progress in Polymer Science**, v. 31, n. 7, p. 603-632, 2006.

SCHÄFER-KORTING, M.; MEHNERT, W.; KORTING, H.-C. Lipid nanoparticles for improved topical application of drugs for skin diseases. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, n. 6, p. 427-443, 2007.

SCHAFFNIT, R.; WICKLANDT, P.; MOLL, F. Controlled iontophoretic release of glucocorticoids through epithelial cell monolayers. **Journal of Controlled Release**, v. 54, n. 1, p. 9-14, 1998.

ŞENYİĞİT, T.; PADULA, C.; ÖZER, Ö.; SANTI, P. Different approaches for improving skin accumulation of topical corticosteroids. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 380, n. 1–2, p. 155-160, 2009.

ŞENYİĞİT, T.; SONVICO, F.; BARBIERI, S.; ÖZER, Ö.; SANTI, P.; COLOMBO, P. Lecithin/chitosan nanoparticles of clobetasol-17-propionate capable of accumulation in pig skin. **Journal of Controlled Release**, v. 142, n. 3, p. 368-373, 2010.

SILVA, J. A.; APOLINÁRIO, A. C.; SOUZA, M. S. R.; DAMASCENO, B. P. G. L.; MEDEIROS, A. C. D. Administração cutânea de fármacos: desafios e estratégias para o desenvolvimento de formulações transdérmicas. **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences**, v. 31, n. 3, p. 125-131, 2010.

SINGH, P.; MAIBACH, H. I. Iontophoresis: an alternative to the use of carriers in cutaneous drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 18, n. 3, p. 379-394, 1996.

SONVICO, F.; CAGNANI, A.; ROSSI, A.; MOTTA, S.; DI BARI, M. T.; CAVATORTA, F.; ALONSO, M. J.; DERIU, A.; COLOMBO, P. Formation of self-organized nanoparticles by lecithin/chitosan ionic interaction. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 324, n. 1, p. 67-73, 2006.

SOUZA, L. G.; SILVA, E. J.; MARTINS, A. L. L.; MOTA, M. F.; BRAGA, R. C.; LIMA, E. M.; VALADARES, M. C.; TAVEIRA, S. F.; MARRETO, R. N. Development of topotecan loaded lipid nanoparticles for chemical stabilization and prolonged release. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 79, n. 1, p. 189-196, 2011.

SPARIDANS, R. W.; VAN VELSEN, S. G. A.; DE ROOS, M. P.; SCHELLENS, J. H. M.; BRUIJNZEEL-KOOMEN, C. A. F. M.; BEIJNEN, J. H. Liquid chromatography–tandem mass spectrometric assay for clobetasol propionate in human serum from patients with atopic dermatitis. **Journal of Chromatography B**, v. 878, n. 23, p. 2150-2154, 2010.

SWARBRICK, J.; LEE, G., BROM, J. Drug permeation through human skin: I. Effect of storage conditions of skin. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 78, p. 63-66, 1982.

TAVEIRA, S. F.; NOMIZO, A.; LOPEZ, R. F. V. Effect of the iontophoresis of a chitosan gel on doxorubicin skin penetration and cytotoxicity. **Journal of Controlled Release**, v. 134, n. 1, p. 35-40, 2009.

TEMPARK, T.; PHATARAKIJNIRUND, V.; CHATPROEDPRAI, S.; WATCHARASINDHU, S.; SUPORNSILCHAI, V.; WANANUKUL, S. Exogenous Cushing's syndrome due to topical corticosteroid application: case report and review literature. **Endocrine**, v. 38, n. 3, p. 328-34, 2010.

TOMODA, K.; TERASHIMA, H.; SUZUKI, K.; INAGI, T.; TERADA, H.; MAKINO, K. Enhanced transdermal delivery of indomethacin-loaded PLGA nanoparticles by iontophoresis. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 88, n. 2, p. 706-710, 2011.

VENTURA, C. A.; TOMMASINI, S.; CRUPI, E.; GIANNONE, I.; CARDILE, V.; MUSUMECI, T.; PUGLISI, G. Chitosan microspheres for intrapulmonary administration of moxifloxacin: Interaction with biomembrane models and in vitro permeation studies. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 68, n. 2, p. 235-244, 2008.

WANG, Y.; THAKUR, R.; FAN, Q.; MICHNIAK, B. Transdermal iontophoresis: combination strategies to improve transdermal iontophoretic drug delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 60, n. 2, p. 179-191, 2005.

WIEDERSBERG, S.; LEOPOLD, C. S.; GUY, R. H. Bioavailability and bioequivalence of topical glucocorticoids. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 68, n. 3, p. 453-466, 2008.

WISSING, S. A.; KAYSER, O.; MÜLLER, R. H. Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n. 9, p. 1257-1272, 2004.



XU, J.; MA, L.; LIU, Y.; XU, F.; NIE, J.; MA, G. Design and characterization of antitumor drug paclitaxel-loaded chitosan nanoparticles by W/O emulsions. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 50, n. 2, p. 438-443, 2012.

YING, X.-Y.; CUI, D.; YU, L.; DU, Y.-Z. Solid lipid nanoparticles modified with chitosan oligosaccharides for the controlled release of doxorubicin. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, n. 4, p. 1357-1364, 2011.

ZHANG, J.; SMITH, E. Percutaneous permeation of betamethasone 17- valerate incorporated in lipid nanoparticles. **Journal of Pharmaceutical Science**, v. 100, n. 3, p. 896-903, 2011.