



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA**

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DA PERMEAÇÃO E RETENÇÃO CUTÂNEA
DE SISTEMAS NANOEMULSIONADOS DO ÁCIDO LINOLÉICO CONJUGADO
(CLA)**

BIANCA STEFFEN ZEN

Florianópolis
2012



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA**

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DA PERMEAÇÃO E RETENÇÃO CUTÂNEA
DE SISTEMAS NANOEMULSIONADOS DO ÁCIDO LINOLÉICO CONJUGADO
(CLA)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Farmácia

Orientadora: Profa. Dra. Elenara Lemos Senna

BIANCA STEFFEN ZEN

Florianópolis

2012

“Desenvolvimento e avaliação da permeação e retenção cutânea de sistemas nanoemulsionados do ácido linoléico conjugado (CLA)”

POR

Bianca Steffen Zen

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pela Orientadora e membros da Banca Examinadora, composta pelos Doutores:

Banca examinadora:

Prof Dra Simone Gonçalves Cardoso (UFSC – Membro Titular)

Prof Dr. Pedro Barreto (UFSC – Membro Titular)

Dr. Humberto de Mello Brandão (Embrapa Gado de Leite – Juíz de Fora)

Prof^a. Dr^a. Elenara Lemos Senna (UFSC – Orientadora)

Prof. Dr. Eloir Paulo Schenkel
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da UFSC

Florianópolis, março de 2012.

Dedico à minha mãe Simone, ao meu pai Moacir,
pelo amor, incentivo, força e apoio em todos os
momentos. Amo muito vocês.

AGRADECIMENTOS

À Deus por iluminar o meu caminho.

Aos meus pais Simone e Moacir, pela força, incentivo, amor e apoio incondicional.

À minha irmã Emanuela, por sempre me apoiar nas minhas escolhas, me dar força e por acreditar em mim.

Ao Nicolas, pela força, amor, carinho, apoio e compreensão. Por me incentivar e me fazer acreditar que tudo é possível.

À Prof^a. Dr^a. Elenara Lemos Senna, pela oportunidade, orientação, confiança, tornando possível a realização deste trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Daisy Janice Aguiar Netz do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da UNIVALI, pelo apoio e incentivo.

Ao Humberto de Mello Brandão e à Embrapa Gado de Leite de Juiz de Fora – MG, pela parceria e por conceder o CLA para realização deste trabalho.

Aos meus colegas e amigos do laboratório de farmacotécnica e de controle de qualidade, pelo companheirismo e ajuda.

À Gecioni Loch-Neckel e Clarissa Amorim, pela amizade e apoio científico.

À Universidade Federal de Santa Catarina, pela estrutura.

À Capes, pelo apoio financeiro.

RESUMO

O ácido linoléico conjugado (CLA) é um componente presente em produtos lácteos oriundos de ruminantes, que possui efeitos benéficos para a saúde humana e na prevenção de doenças. Vários estudos têm destacado e comprovado os benefícios do CLA à saúde. Os efeitos antilipogênicos, antiinflamatório e anti-carcinogênico estão fortemente aliados ao CLA e fazem dele um nutriente de enorme interesse a ser utilizado em formulações de uso tópico capazes de permear o extrato córneo, tornando-se assim, uma interessante opção no tratamento de processos inflamatórios da pele, na prevenção dos danos causados pela exposição à radiação solar e no combate à celulite. No entanto, a pele é uma barreira muito eficaz contra a penetração de substâncias ativas, que quando veiculadas normalmente não conseguem alcançar concentrações apreciáveis nos tecidos-alvo. Nos últimos anos, nanocarreadores lipídicos surgiram como uma estratégia promissora para aumentar a penetração de compostos ativos através da pele. Nanoemulsões consistem em emulsões muito finas, em que o tamanho pequeno das gotículas lhe dá propriedades valiosas no domínio cosmético e dermatológico, incluindo a promoção da absorção. Assim, o objetivo deste trabalho foi desenvolver preparações tópicas cutâneas contendo ácido linoléico conjugado (CLA) nanoemulsionado, visando o aumento da penetração cutânea e o aproveitamento de seu potencial terapêutico na pele. As nanoemulsões de CLA foram preparadas pela técnica de emulsificação espontânea. Diferentes quantidades de CLA foram adicionadas às nanoemulsões (180, 240 e 300 µl) e dois tipos de surfactantes foram utilizados (Tween 80 e Solutol HS 15). O tamanho e o potencial zeta das gotículas foram afetados pela composição das formulações. Hidrogéis contendo as nanoemulsões de CLA foram desenvolvidos utilizando HPMC e quitosana. Estudos reológicos os caracterizaram com perfil não-Newtoniano com caráter pseudoplástico. Para avaliar a permeação *in vitro* do CLA, foram utilizadas células de difusão tipo Franz e pele de orelha suína como membrana. A permeação do CLA através da pele foi grandemente afetada pela composição das formulações. Quando unicamente o HPMC foi empregado para formação do hidrogel, o fluxo e o coeficiente de permeabilidade aumentaram com o aumento do teor de CLA das nanoemulsões. Da mesma maneira, o tipo de surfactante empregado na estabilização das nanoemulsões mostrou afetar a permeação do CLA, uma vez que as nanoemulsões estabilizadas com Tween 80 exibiram maiores valores de fluxo, para uma mesma concentração de CLA. Por outro lado, a adição da quitosana exerceu um efeito negativo na permeação, e nas formulações contendo as nanoemulsões estabilizadas com Solutol HS 15, pouca ou quase nenhuma permeação do CLA foi verificada. Para avaliar a retenção do CLA na pele, a técnica de *tape-stripping* foi adotada. Verificou-se que a quitosana utilizada para obtenção dos hidrogéis permaneceu nas camadas superiores da pele, contemplando os achados na determinação da quantidade de CLA permeada, podendo ser explicado por uma associação forte da quitosana com o CLA. Para a quantificação do CLA retido e permeado, um método de cromatografia líquida de alta eficiência foi desenvolvida e validada. O método provou ser específico, linear, preciso, exato e robusto. As análises termogravimétricas e de calorimetria exploratória diferencial indicaram interação do CLA com os componentes da pele. A análise histológica da pele confirmou os resultados obtidos nos estudos de permeação cutânea.

Palavras-chaves: Ácido linoléico conjugado, nanoemulsões, hidrogéis, permeação cutânea, retenção cutânea.

TITLE: Development and evaluation of skin permeation and retention of conjugated linoleic acid-based nanoemulsion systems

ABSTRACT

Conjugated linoleic acid (CLA) is a component present in dairy products derived from ruminants that has beneficial effects on human health and disease prevention. Anti-lipogenic, anti-inflammatory and anti-carcinogenic activity are strongly related to CLA, which makes it a nutrient of great interest to be used in topical formulations for the treatment of inflammatory skin conditions, damage prevention caused by exposure to radiation, and combat of the cellulite. However, the skin is a very effective barrier to penetration of active substances, preventing the attainment of appreciable concentrations in the target tissues. In the last years, lipid-based nanocarriers have arisen as a promising strategy to increase the penetration of active compounds through the skin. Nanoemulsions consists in very fine emulsions, in which the very small size of the droplets gives them valuable properties in the cosmetic dermatology field, including promotion of the absorption. In this context, the aim of this study was to develop topical preparations containing CLA-based nanoemulsions to increase the CLA penetration through the skin. CLA-based nanoemulsions were prepared by spontaneous emulsification technique. Different amounts of CLA were added to the formulations (180, 240 and 300 μ L) and two hydrophilic surfactants (Tween 80 and Solutol HS 15) were tested as stabilizers of the colloidal dispersions. Both mean droplet size and zeta potential were affected by the composition of the formulations. Hydrogels containing CLA-based nanoemulsions were prepared using HPMC 1% (w/v) or HPMC 1% (w/v) and chitosan 0.5% (w/V) as hydrogel-forming agent. All hydrogel formulations exhibited non-Newtonian flow and pseudoplastic behavior. *In vitro* skin permeation of CLA was assessed using Franz diffusion cell and pig ear as membrane model. To quantify the permeated and retained amount of CLA, an HPLC analytical method was developed and validated. The analytical method demonstrated to be specific, linear, precise, accurate, and robust. The permeation of CLA through the skin was greatly affected by the composition of the formulations. When only the HPMC was used to obtain the hydrogel, both flux and the permeability coefficient increased with the increase of CLA content of the nanoemulsion. Likewise, the type of surfactant used in the stabilization of nanoemulsions showed to affect the permeation of CLA; the nanoemulsions stabilized with Tween 80 exhibited higher flux values for the same CLA concentration. Moreover, the addition of chitosan had a negative effect on the permeation, and for the formulations stabilized with Solutol HS 15, little or no permeation of CLA was verified. To assess the retention of CLA in the skin, the tape-stripping technique was carried out. It was found that, when chitosan was added to the formulations, CLA was retained in the upper layers of skin. These results corroborated with the results found after determining CLA permeation and they may be explained by a strong association between CLA and chitosan. Thermogravimetric analysis and differential scanning calorimetry indicated the existence of interactions between CLA and the skin components. Skin histological studies also confirmed these findings.

Keywords: Conjugated linoleic acid, nanoemulsions, hydrogels, skin permeation, skin retention.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química de dois isômeros do ácido linoléico conjugado (CLA) e do ácido linoléico. As setas indicam a posição da dupla ligação.....	24
Figura 2. Via metabólica proposta para a biossíntese do C18:2 cis-9, trans11.....	25
Figura 3. Efeitos dos isômeros cis-9, trans-11 e trans-10, cis-12 de CLA sobre a saúde.....	31
Figura 4. Representação esquemática da pele humana.	33
Figura 5. Representação esquemática dos mecanismos de penetração de substâncias (vias intercelular e transcelular) através do estrato córneo.	35
Figura 6. Gráfico representativo de massa de difusante acumulada em função do tempo.	37
Figura 7. Esquema de célula de difusão tipo Franz.....	39
Figura 8. Representação esquemática da separação do EC e da EP+D pela técnica do <i>tape stripping</i>	39
Figura 9. Escala de granulometria das emulsões.....	42
Figura 10. Estrutura de uma gotícula dispersa em um sistema a/o e o/a, respectivamente.	43
Figura 11. Fotografia ilustrativa da pele de orelha de porco sendo preparada para estudo de permeação cutânea do ácido linoléico conjugado (CLA).	58
Figura 12. Fotomicrografias obtidas por MET dos sistemas nanoemulsionados de CLA. As micrografias (a), (b) e (c) correspondem às nanoemulsões preparadas com Tween 80 0,4% (m/V), com 180, 240 e 300 µL de CLA, respectivamente (T-180, T-240 e T-300). As micrografias (d), (e) e (f) correspondem às nanoemulsões preparadas com Solutol HS-15 1,0% (m/V), com 180, 240 e 300 µL de CLA, respectivamente (S-180, S-240 e S-300).....	69
Figura 13. Hidrogéis obtidos a partir dos sistemas nanoemulsionados de CLA. (A e B) hidrogéis de HPMC (HT-B, HT-180, HT-240 e HT-300) e de HPMC e quitosana (HQT-B, HQT-180, HQT-240 e HQT-300), contendo nanoemulsões de CLA estabilizadas com Tween 80 0,4% (m/V), respectivamente. (C e D) hidrogéis de HPMC (HS-B, HS-180, HS-240 e HS-300) e HPMC com quitosana (HQS-B, HQS-180, HQS-240 e HQS-300), contendo nanoemulsões de CLA estabilizadas com Solutol HS15 1,0% (m/V), respectivamente.	71
Figura 14. Fotomicrografias obtidas por MET dos hidrogéis contendo as nanoemulsões de CLA. O número 1 se refere aos hidrogéis contendo somente HPMC 1,0% (m/V). O número 2 se refere aos hidrogéis contendo HPMC 1,0% (m/V) e quitosana 0,5% (m/V). 1a, 1b, 1c se referem às formulações HT-180, HT-240 e HT-	

300, respectivamente. 1d, 1e, 1f se referem às formulações HS-180, HS-240 e HS-300, respectivamente. 2a, 2b, 2c se referem às formulações HQT-180, HQT-240 e HQT-300, respectivamente. 2d, 2e, 2f se referem às formulações HQS-180, HQS-240 e HQS-300, respectivamente.....	73
Figura 15. Avaliação da viscosidade dos hidrogéis em função do tempo de armazenamento e perfil de escoamento: (A) e (B) viscosidade em dos hidrogéis de HPMC 1,0% (m/V) e de HPMC 1,0% (m/V) com quitosana 0,5% (m/V), respectivamente. (C) e (D) perfil de escoamento dos hidrogéis de HPMC 1,0% (m/V) e de HPMC 1,0% (m/V) com quitosana 0,5% (m/V), respectivamente.	77
Figura 16. Cromatogramas obtidos após análise por CLAE das seguintes amostras:(A) e (B) soluções obtidas após procedimento de <i>tape-stripping</i> para remoção do estrato córneo (EC) e após extração da epiderme/derme (EP + D) com acetonitrila, respectivamente; (C) e (D), soluções obtidas após dissolução dos hidrogéis brancos HQT-B e HQS-B em acetonitrila, respectivamente; (E) e (F) soluções obtidas após dissolução dos hidrogéis brancos HQT-B e HQS-B em lauril sulfato de sódio 0,1%/tampão fosfato pH 7,4, respectivamente (G) Solução de lauril sulfato de sódio 0,1% em tampão fosfato pH 7,4; (H) e (I) solução de CLA 5,0 µg/mL em lauril sulfato de sódio 0,1/ tampão fosfato pH 7,4 e em acetonitrila, respectivamente. Coluna Luna C18 (150 mm ↔ 4,6 mm d.i., 5 µm); fase móvel: acetonitrila:água 95:05 (V/V); volume de injeção 50 µL; fluxo de 1,2 mL/min; detecção: 233 nm.....	81
Figura 17. Curva de calibração para o CLA em lauril sulfato de sódio 0,1%/ tampão fosfato pH 7,4 obtida através de cromatografia líquida de alta eficiência.	83
Figura 18. Curva de calibração para o CLA em acetonitrila obtida através de cromatografia líquida de alta eficiência.	84
Figura 19. Perfil de permeação do CLA através de pele de orelha suína. (A) Hidrogéis contendo HPMC 1% (m/V), (B) hidrogéis contendo HPMC 1% (m/V) e quitosana (0,5%).....	90
Figura 20. Quantidade retida de CLA no estrato córneo (EC) e na epiderme após <i>tape stripping</i> . (A) Hidrogéis de HPMC 1% (m/V), (B) hidrogéis e HPMC 1% (m/V) e quitosana 0,5% (m/V).	93
Figura 21. Curvas termogravimétricas do CLA e da pele.	96
Figura 22. Curvas de DSC obtidas para o CLA, pele com o CLA e pele.	97
Figura 23. Curvas de DSC obtidas a partir da pele e formulações. (a) pele; (b) HQS-B; (c) HQ-T-B; (d) HQS-300; (e) HQT-300; (f) HS-300; (g) HT-300.	98
Figura 24. Cortes histológicos da pele após coloração com eosina e hematoxilina. (A) HS-B; (B) HS-300, (C) HT-B; (D) HT-300; (E) HQS-B, (F) HQS-300; (G) HQT-B; (H) HQT-300 e (I) pele sem tratamento.	101

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Atividades biológicas do ácido linoléico conjugado.	26
Tabela 2. Composição final das formulações.	53
Tabela 3. Quantidades de solução padrão de CLA em acetonitrila adicionadas nas fitas adesivas contendo o EC e na pele sem o EC para estudo de recuperação do CLA.	62
Tabela 4. Parâmetros de robustez avaliados na validação do método por cromatografia líquida de alta eficiência.	63
Tabela 5. Características de tamanho e potencial zeta dos sistemas nanoemulsionados (média \pm DP; $n = 3$).	67
Tabela 6. Resultados obtidos na avaliação do comportamento reológico dos hidrogéis contendo as nanoemulsões de CLA, obtidos a 25 °C.	76
Tabela 7. Teor do CLA no meio acceptor no tempo 0 e após 10 horas de incubação a 37° C ($n = 3$).	80
Tabela 8. Valores das áreas dos picos do CLA obtidas em diferentes concentrações em lauril sulfato de sódio 0,1%/tampão fosfato pH 7,4.	82
Tabela 9. Valores das áreas dos picos do CLA obtidas em diferentes concentrações em acetonitrila.	83
Tabela 10. Valores experimentais obtidos na avaliação da repetibilidade do método.	85
Tabela 11. Valores experimentais obtidos na avaliação da precisão intermediária após extração do CLA a partir das fitas obtidas após remoção do extrato córneo (EC) e da pele (EP + D).	86
Tabela 12. Valores experimentais obtidos na avaliação da precisão intermediária no meio acceptor (permeado).	86
Tabela 13. Valores experimentais obtidos na avaliação da exatidão após extração do CLA a partir das fitas obtidas após remoção do extrato córneo (EC) e a partir da pele (EP + D).	87
Tabela 14. Valores experimentais obtidos na avaliação da exatidão para o CLA no meio acceptor.	87
Tabela 15. Variação do fluxo da fase móvel e comprimento de onda para avaliação da robustez do método de quantificação do CLA ($n=3$).	88
Tabela 16. Permeação dos hidrogéis de CLA em pele de orelha de suíno: fluxo, tempo de latência e quantidade permeada, após 10 horas de experimento <i>in vitro</i> ($n \geq 3$).	91
Tabela 17. Quantidade de CLA retida nas diferentes camadas de pele após ensaio de permeação cutânea.	94

Tabela 18. ANOVA dos valores de quantidade de CLA retido no estrato córneo (EC) e na epiderme e derme (EP +D).	95
Tabela 19. Valores de temperatura de máxima velocidade de perda de massa (T pico), temperatura inicial e final e percentuais de perda de massa obtidos após análise do CLA e da pele.	97
Tabela 20. Resultados obtidos por DSC após análise do CLA, pele e de amostras de pele obtidas após estudos de permeação.	98

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA – Análise da Variância
Apo-E – Apolipoproteína E
AGS – Ácidos graxos saturados
BMDC – Células dendríticas derivadas da medula óssea, do inglês bone marrow derived dendritic cells
CLA – Ácido linoléico conjugado
COX – Ciclo-oxigenase
d.m.s – Diferença Mínima Significativa
DSC – Calorimetria Exploratória Diferencial
EC – estrato córneo
EP+D – Epiderme e derme
FAS – Ácido graxo sintase
GLUT-4 – Transportador de glicose tipo 4
GL – Graus de Liberdade
ICH – International Conference on Harmonization
IL-2 – Interleucina-2
IL-6 – Interleucina-6
IL-8 – Interleucina-8
IL-12p70 – Interleucina-12, subunidade 70
IL-12p40 – Interleucina-12, subunidade 40
IL-10 – Interleucina-10
IkB α – Proteína α inibitória kappa B
LD – Limite de Detecção
LQ – Limite de Quantificação
LPL – Lipoproteína lipase
LPS – Lipopolissacarídeo
MET – Microscopia Eletrônica de Transmissão
MCF-7 – Células de câncer em receptor de estrogênio positivo
MDA-MB 231 – Células de câncer em receptor de estrogênio negativo
MMP-9 – metalo-proteinase 9
NE – Nanoemulsões
NADPH⁺ – Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato na forma reduzida
NF-kB – Fator de transcrição nuclear kappa B
PPAR γ – Receptor γ ativado por proliferador de peroxissomo
PPAR α – Receptor α ativado por proliferador de peroxissomo

PPARs – Receptores ativados por proliferador de peroxissomo

PGE2 – Prostaglandina E2

PBMC – Células mononucleares de sangue periférico, do inglês peripheral blood mononuclear cell

RNAm – Ácido ribonucléico mensageiro

SCD – Estearoil-CoA-desaturase ou Delta-9 desaturase

TGA – Análise Termogravimétrica

TVA – Ácido trans vacênico

TAGs – Triacilgliceróis

TNF- α – Fator de necrose tumoral α

Th1 – Linfócito T helper 1

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	16
OBJETIVOS	20
Objetivo geral	20
Objetivos específicos	20
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
1.1 Ácido linoléico conjugado (CLA).....	23
Fonte: Adaptado de REYNOLDS & ROCHE (2010).....	24
1.1.2 Produção	24
Fonte: Adaptado de BRAUMAN & GRIINARI (2001).....	25
1.1.3 Propriedades biológicas.....	25
1.2 Pele.....	32
1.2.2 Transporte de fármacos através da pele.....	34
1.2.3 Estudos de permeação cutânea.....	38
1.2.4 Estratégias para melhorar a passagem de fármacos através da pele	40
1.3 Nanoemulsões	42
1.3.1 Generalidades	42
1.3.2 Preparação e caracterização	43
1.3.3 Aplicação tópica cutânea das nanoemulsões.....	46
MATERIAIS E MÉTODOS	50
2.1 Materiais	51
2.1.1 Matérias-primas	51
2.1.2 Solventes, soluções e reagentes	51
2.1.3 Equipamentos	52
2.2 Métodos.....	53
2.2.1 Preparação e caracterização das nanoemulsões de ácido linoléico conjugado (CLA)	53
2.2.2 Preparação e caracterização de hidrogéis contendo as nanoemulsões de CLA	54
2.2.3 Estudos de permeação e retenção cutânea do CLA <i>in vitro</i>	56
2.2.4 Desenvolvimento e validação de um método analítico para determinação do CLA nos estudos de permeação e retenção cutânea.....	60
2.2.5 Análise termogravimétrica (TGA) e Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	63
2.2.6 Análise histológica da pele após estudos de permeação	64
RESULTADOS E DISCUSSÃO	65

3.1	Preparação e caracterização das nanoemulsões de ácido linoléico conjugado (CLA)	66
3.2.2	Avaliação da morfologia das nanoemulsões	68
3.3	Preparação e caracterização dos hidrogéis contendo as nanoemulsões de CLA .	70
3.3.1	Preparação dos hidrogéis	70
3.3.2	Avaliação da morfologia dos hidrogéis	71
3.3.3	Avaliação da viscosidade e perfil de escoamento dos hidrogéis contendo CLA nanoemulsionado	74
3.4	Estudos de permeação e retenção cutânea do CLA <i>in vitro</i>	79
3.4.1	Avaliação da solubilidade e estabilidade do CLA na solução aceptora	79
3.4.2	Desenvolvimento e validação de uma metodologia analítica para determinação do CLA nos estudos de permeação e retenção cutânea.....	80
3.4.3	Estudos de permeação cutânea.....	88
3.4.4	Estudos de retenção cutânea do CLA.....	92
3.5	Análise termogravimétrica (TGA) e Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) ...	96
3.6	Análise histológica da pele após estudos de permeação	99
	CONCLUSÕES	102
	REFERÊNCIAS	105

Os produtos naturais são utilizados pela humanidade desde tempos imemoriais. A natureza sempre despertou no homem um fascínio encantador, não só pelos recursos oferecidos para sua alimentação e manutenção, mas por ser sua principal fonte de inspiração e aprendizado. Os produtos de origem animal fazem parte de um grupo de enorme interesse dos produtos de origem natural destinados à terapêutica humana e contribuem intensivamente na pesquisa e desenvolvimento de fármacos (VIEGAS JR, BOLZANI, BARREIRO, 2006).

O ácido linoléico conjugado (CLA) é um ácido graxo poliinsaturado natural encontrado em produtos lácteos oriundos de ruminantes. É composto por um grupo de isômeros geométricos e posicionais do ácido linoléico que possui 18 carbonos em sua estrutura. O termo conjugado refere-se à existência de duplas ligações (insaturação) com uma ligação simples entre elas, em vez de uma ligação comum de metileno (saturação). Os isômeros de CLA são intermediários da biohidrogenação do ácido linoléico, processo realizado por bactérias presentes no rúmen (BELURY, 2002). Dentre os isômeros mais estudados, destacam-se o CLA cis-9 trans-11 e o CLA trans-10 cis-12, os quais apresentam inúmeros efeitos biológicos em diversas espécies, embora a magnitude da resposta varie segundo a espécie estudada (PARK & PARIZA, 2007). Além disso, alguns dos efeitos observados são isômero-dependentes, conforme demonstrado em estudos conduzidos com amostras purificadas (BAUMGARD et al., 2000).

Vários estudos têm destacado e comprovado os possíveis benefícios do CLA à saúde. Entre algumas atividades relatadas na literatura podemos citar seu efeito antilipogênico, antiinflamatório, anticarcinogênico, antiaterosclerótico, entre outros (ROCHE & REYNOLDS, 2010; STOREY et al., 2008; TOOMEY et al., 2006; WHIGHAM, WATRAS, SCHOELER, 2007). Por meio de uma meta-análise envolvendo estudos com humanos, Whighan e colaboradores (2007) concluíram que o CLA causa uma pequena, mas significativa perda de massa corporal gorda, fenômeno semelhante ao observado em suínos. Sabe-se atualmente que o efeito antilipogênico observado em estudos com CLA ocorre devido ao isômero trans-10, cis-12 (efeito isômero-dependente). Os efeitos antiinflamatórios do CLA não parecem ser isômeros-dependentes (PARK et al., 2007) e se caracterizam por uma redução na concentração dos produtos finais das cascatas da lipoxigenase e das cicloxigenases (BELURY, 2002).

Os efeitos fisiológicos descritos, aliados ao seu forte apelo comercial e às suas características físico-químicas, fazem do CLA um nutriente de enorme interesse a ser utilizado em formulações de uso tópico capazes de permear o extrato córneo, tornando-se assim, uma interessante opção no tratamento de processos inflamatórios

da pele, na prevenção dos danos causados pela exposição à radiação e no combate à celulite.

Embora o tratamento tópico apresente vantagens irrefutáveis, a adequada penetração cutânea de compostos ativos para produzir uma resposta terapêutica ainda é um grande desafio no desenvolvimento de medicamentos. A pele é muito efetiva como uma barreira à penetração, sendo que a epiderme exerce o maior controle, deixando penetrar apenas algumas substâncias em determinadas condições. A camada córnea, constituída por uma estrutura lipídica altamente ordenada, age como a principal barreira protetora, tanto para a excessiva perda de água, quanto contra aos danos provocados por agentes tóxicos e/ou microorganismos do ambiente. Desta maneira, substâncias ativas, quando veiculadas em formas farmacêuticas convencionais, não alcançam concentrações apreciáveis nas camadas mais profundas da pele, fazendo com que as quantidades permeadas alcancem unicamente níveis subterapêuticos, tornando necessário assim o emprego de estratégias que aumentem a penetração cutânea dos mesmos (SCHÄFER-HORTING, MEHNERT & KORTING, 2007).

Diferentes estratégias têm sido empregadas para contornar as limitações impostas pela baixa absorção percutânea de fármacos. Mais recentemente, o uso de sistemas nanoestruturados em produtos cosméticos e dermatológicos não somente tem conduzido ao aumento da penetração cutânea de fármacos, mas também permitido a vetorização em subestruturas da pele. Tais sistemas são caracterizados por apresentar tamanho variando entre 1 micrômetro (μm) até algumas centenas de nanômetros com uma grande área superficial, o que os torna adequados para importantes aplicações farmacêuticas e cosméticas. Além de permitir o direcionamento do fármaco ao local de ação, os carreadores coloidais apresentam algumas vantagens para aplicação tópica, como a promoção de concentrações elevadas do fármaco nos tecidos, e obtenção de perfis de liberação sustentados, os quais são importantes para a manutenção do agente ativo durante um período prolongado na pele (SCHÄFER-HORTING, MEHNERT & KORTING, 2007).

Entre os sistemas nanoestruturados com potencial aplicação tópica destacam-se as nanoemulsões. Nos últimos anos, o desenvolvimento de nanoemulsões como carreadores de fármacos e/ou moléculas bioativas de uso tópico tem sido extensamente descrito na literatura (ALVES, POHLMANN, GUETERRES, 2005; YILMAZ & BORCHERT, 2005; FASOLO et al., 2007). As nanoemulsões podem ser definidas como a dispersão de um núcleo oleoso de diâmetro nanométrico estabilizado por um sistema tensoativo adequado em uma fase aquosa externa. Moléculas de reduzida hidrossolubilidade encontram-se preferencialmente dispersas no núcleo

oleoso e/ou adsorvidas na interface da nanoestrutura. O principal interesse pelo uso destes sistemas reside na possibilidade de melhoria de suas propriedades físicas, como espalhabilidade e oclusividade, na modulação da permeação de ativos cosméticos através das diferentes camadas da pele, ou ainda no direcionamento do fármaco a um sítio específico (TROTТА, PATTARINO, IGNONI, 2002; VANDAMME, 2002; BOUCHEMAL et al., 2004).

Considerando o exposto acima, esse trabalho tem como objetivo desenvolver sistemas nanoemulsionados do CLA visando o aumento da penetração cutânea e o aproveitamento de seu potencial terapêutico na pele. Neste trabalho, o desenvolvimento de hidrogéis contendo nanoemulsões de CLA é descrito. Diferentes parâmetros de formulação foram testados e as características finais das nanoemulsões e de seus respectivos hidrogéis, bem como sua capacidade de penetração e retenção na pele, foram avaliadas e comparadas.

OBJETIVOS

Objetivo geral:

Desenvolver preparações tópicas cutâneas contendo ácido linoléico conjugado (CLA) nanoemulsionado, visando o aumento da penetração cutânea e o aproveitamento de seu potencial terapêutico na pele.

Objetivos específicos:

- Preparar nanoemulsões de CLA utilizando a técnica de emulsificação espontânea e caracterizar as formulações quanto ao tamanho, índice de polidispersão, potencial zeta e morfologia;
- Avaliar o efeito do tipo de surfactante e concentração de CLA sobre as características físico-químicas das nanoemulsões.
- Preparar hidrogéis contendo CLA nanoemulsionado a partir de diferentes agentes gelificantes e caracterizar as formulações quanto à morfologia e propriedades reológicas;
- Desenvolver e validar uma metodologia analítica por CLAE para a determinação do CLA nos estudos de permeação e retenção cutânea;
- Avaliar a permeação cutânea do CLA em modelo bicompartimental de célula de difusão tipo Franz usando pele de orelha de porco como membrana;
- Avaliar a retenção cutânea do CLA nas diferentes camadas da pele utilizando a técnica do *Tape-stripping*;
- Avaliar as interações do CLA com os componentes da pele por análise termogravimétrica (TGA) e calorimetria exploratória diferencial (DSC)
- Avaliar a penetração do CLA nas diferentes camadas da pele por meio de cortes histológicos

- Comparar o efeito dos parâmetros da formulação estudados - tipo de surfactante, concentração de CLA e tipo de agente gelificante - sobre a penetração do CLA através da pele.

1.1 Ácido linoléico conjugado (CLA)

1.1.1 Generalidades

Os componentes lipídicos, especialmente os ácidos graxos, estão presentes nas mais diversas formas de vida, desempenhando importantes funções na estrutura das membranas celulares e nos processos metabólicos (MARTIN et al., 2006). Os ácidos graxos que contêm duas ou mais insaturações (duplas ligações) são chamados poliinsaturados e são representados por símbolos numéricos, como C18:2 (9,12) que representa o ácido linoléico, sendo que o número justaposto ao símbolo C indica o número de átomos de carbono e o segundo número, a quantidade de duplas ligações. A posição da dupla ligação na cadeia hidrocarbonada é indicada entre parênteses, pela identificação do átomo de carbono mais próximo da carboxila implicada na respectiva insaturação. Os ácidos graxos também podem ser divididos em famílias ou séries, dependendo da localização da última dupla ligação em relação ao seu grupamento metílico terminal: família ômega-6 (ω 6) representada pelo ácido linoléico (CARVALHO et al., 2003).

O ácido linoléico conjugado (CLA) é um ácido graxo poliinsaturado de cadeia longa, também chamado de ácido octadenóico por conter 18 carbonos em sua estrutura (MARTIN et al.; 2006). Refere-se a uma mistura de isômeros posicionais e geométricos do ácido linoléico com duplas ligações conjugadas, isto é, separadas apenas por uma ligação simples carbono-carbono e não por um grupo metileno. Entre os isômeros mais estudados, destacam-se os isômeros cis-9, trans-11 e o trans-10, cis-12 (Figura 1).

As duas maiores fontes de CLA na alimentação dos seres humanos são produtos lácteos (grande parte na gordura do leite) e carne de ruminantes (bovinos, ovinos e caprinos). Pode-se também encontrá-lo na carne de cordeiro, na vitela e em menor grau na carne de suíno, frango, peru e em algumas fontes vegetais (JIANG et al., 1996; STEINHART, 1996; IP et al., 1999). Vinte e oito isômeros do CLA já foram identificados em produtos lácteos, leite e carne bovina. O isômero predominante é o cis-9, trans-11(CLA c9-t11) que constitui até 90 % de CLA total e está relacionado aos benefícios positivos do CLA à saúde humana. Já o isômero trans-10, cis-12 (CLA t10, cis12) é responsável por 1-10 % do CLA em fontes alimentares e está diretamente associado ao seu efeito antilipogênico (ROCHE & REYNOLDS, 2010). Além disso, alguns dos efeitos observados são isômero-dependentes, conforme demonstrado em estudos utilizando amostras purificadas (BAUMGARD et al., 2000). Entretanto, em todas as espécies estudadas, foi identificado algum efeito biológico associado à sua

administração, geralmente na forma de produtos sintéticos contendo metade de cada um dos isômeros mencionados anteriormente (BELURY, 2002; PARK & PARIZA, 2007).

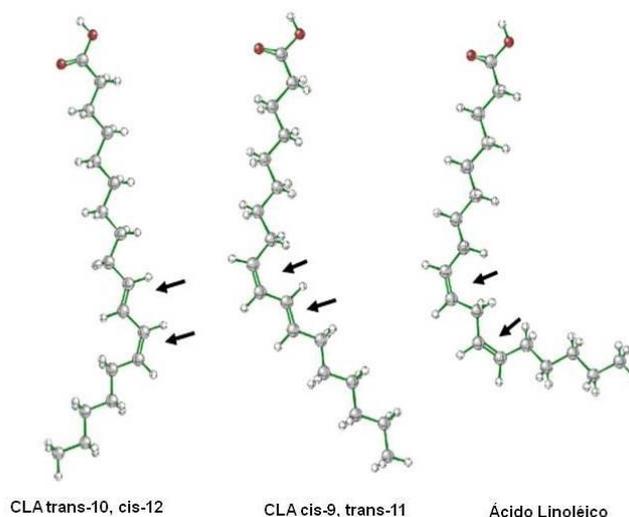


Figura 1. Estrutura química de dois isômeros do ácido linoléico conjugado (CLA) e do ácido linoléico. As setas indicam a posição da dupla ligação.

Fonte: Adaptado de REYNOLDS & ROCHE (2010).

1.1.2 Produção

Em animais ruminantes, o CLA é produzido normalmente por bactérias ruminais, como um intermediário do processo de biohidrogenação do ácido linoléico, sendo a *Butyrivibrio fibrisolvens* a mais conhecida. A cis-12, trans-11 linoleato isomerase, enzima que catalisa a transformação de ácido linoléico em ácido vacênico, precisa de radicais carboxilas (-CO₂H) livres para completar a reação. Várias espécies de bactérias possuem um complexo capaz de hidrolisar as ligações éster dos ácidos graxos (BAUMAN & GRIINARI, 2001). A isomerização inicial é seguida pela saturação da dupla cis-9 através da ação de uma redutase, resultando no ácido vacênico (C18:1 trans-11). Este é o isômero encontrado em maior quantidade na gordura do leite de ruminantes. A próxima etapa envolve uma redução subsequente até a formação do ácido esteárico (C18:0). Esta via metabólica é a mais conhecida e a mais expressiva (HARFOOT & HASLEWOOD, 1997). Normalmente, a biohidrogenação acontece de forma completa, porém, alguns produtos intermediários podem atravessar o rúmen e serem utilizados na síntese de lipídios nos tecidos mamários e adiposos. O CLA também pode ser formado endogenamente, através da desaturação do ácido graxo C18:1 trans-11 por uma enzima presente na glândula mamária e tecido adiposo

chamada Estearoil-CoA-desaturase ou Delta-9 desaturase (SCD). Como o C18:1 trans-11 (ácido vacênico) é produzido principalmente através da biohidrogenação ruminal, este processo é o grande responsável pelo fato de que as maiores fontes de CLA são produtos derivados de ruminantes (CORL et al., 2001). Quando o CLA cis-9, trans-11 é absorvido pelo intestino, move-se para a corrente sanguínea, é absorvido pela glândula mamária para ser incorporado na gordura do leite. De maneira análoga, o ácido vacênico chega à glândula mamária, e pela ação da enzima SCD (Figura 2) pode ser transformado em cis-9, trans-11 (GRIINARI et al., 1998).

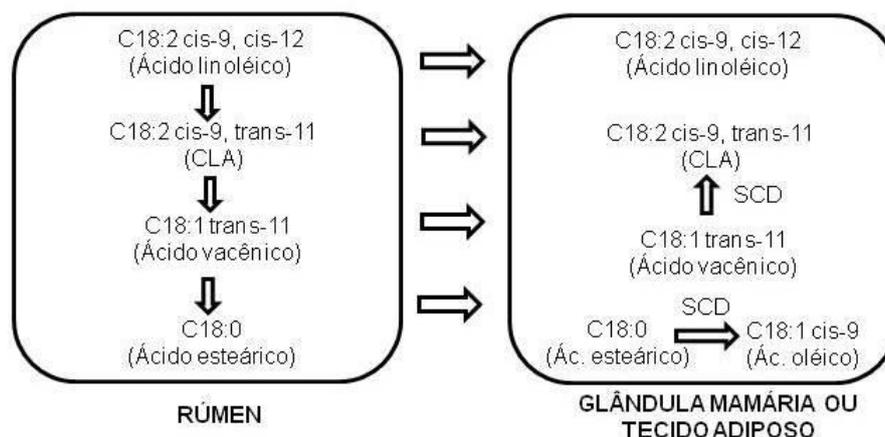


Figura 2. Via metabólica proposta para a biossíntese do C18:2 cis-9, trans-11.

Fonte: Adaptado de BRAUMAN & GRIINARI (2001).

Desta forma, o CLA é produzido como um produto intermediário da biohidrogenação bacteriana do ácido linoléico para ácido esteárico em animais ruminantes, podendo ser incorporado aos tecidos ou ainda ser futuramente biohidrogenado ao ácido trans vacênico (TVA). A alta abundância do CLA cis-9, trans-11 no leite e na carne, permite evidenciar que animais não ruminantes podem endogenamente produzir o mesmo isômero através da ingestão destes alimentos, sendo a enzima delta 9-desaturase responsável por esta conversão. A bioconversão do TVA a CLA cis-9, trans-11 foi confirmada em humanos (KUHNT et al., 2006), ratos e camundongos (SANTORA, PALMQUIST, ROEHRING, 2000).

1.1.3 Propriedades biológicas

Inúmeras pesquisas têm destacado as propriedades farmacológicas do ácido linoléico conjugado (CLA), mostrando seu envolvimento em diversos processos fisiológicos e bioquímicos, os quais resultam em várias atividades biológicas (Tabela 1).

Tabela 1. Atividades biológicas do ácido linoléico conjugado.

Atividade	Referência
Antilipogênica	OHNUKI et al., 2001; WHIGHAM, WATRAS, SCHOELER, 2007; PARK & PARIZA, 2007
Antiinflamatória	BELURY, 2002; RAMAKERS et al., 2005; REYNOLDS & ROCHE, 2010
Anticarcinogênica	KELLEY, HUBBARD, ERICKSON, 2007; STOREY et al., 2007; SOEL et al., 2007
Antiaterosclerótica	TOOMEY et al., 2006; MITCHELL & MCLEOD, 2008
Anti-hipertensiva	NAGAO et al., 2003; INOUE et al., 2004
Imunoreguladora	HAYEK et al., 1999; LOSCHER et al., 2005
Anti-glicêmica	LAROSA et al., 2006; POIRIER et al., 2006
Antioxidante	YU, 2001

Sabe-se atualmente que o efeito antilipogênico observado em estudos com CLA ocorre devido ao isômero trans-10, cis-12 (efeito isômero-dependente), cujo mecanismo de ação pode envolver: (i) a redução no número de adipócitos em função do aumento da taxa de apoptose de adipócitos e pré-adipócitos (EVANS et al., 2000); (ii) redução na deposição de gordura, decorrente da modulação da expressão gênica de enzimas associadas ao metabolismo energético e (iii) aumento da taxa de oxidação de triacilglicerol, induzida pelo aumento da concentração plasmática de catecolaminas, como a adrenalina e noradrenalina (OHNUKI et al., 2001). Estudos com animais em crescimento e em lactação mostraram redução da atividade das enzimas lipase lipoprotéica e acetil CoA-carboxilase, responsáveis pela captação de ácido graxo extra celular e síntese do novo ácido graxo, respectivamente (PETERSON, BAUMGARD, BAUMAN, 2002; CORL et al., 2008). O CLA trans-10, cis-12 possui elevada afinidade pelos receptores de proliferação dos peroxissomos (PPARs), um grupo de fatores de receptores nucleares que regulam a transcrição de genes relacionados ao metabolismo de lipídios. Controversamente, enzimas precursoras de NADPH+ como a glicose-6-fosfato desidrogenase e enzima málica eventualmente se mostram com atividade aumentada (JOSÉ, GAMA, LANNA, 2008).

Kang e Pariza (2011) demonstraram que o CLA trans-10, cis-12 reduz a leptina, um hormônio envolvido na regulação da deposição de gordura, em cultura de células

adiposas. Nagao e colaboradores (2003) demonstraram o mesmo, mas em camundongos. Neste estudo, o tratamento com o CLA trans-10, cis-12 em camundongos causou um ganho relativamente baixo em peso sem ganho de gordura de tecido adiposo. O mesmo isômero também inibiu a diferenciação de pré adipócitos em camundongos murinos (3T3-L1) e pré adipócitos humanos. Este evento foi associado ao decréscimo de acúmulo de triacilcligeróis (TAGs) na diferenciação de pré adipócitos, inibição do gene PPAR- γ (receptor γ ativado por proliferador de peroxissomo) e seus produtos incluindo a lipoproteína lipase (LPL), GLUT-4 (transportador de glicose tipo 4) e inibição da expressão de ácido graxo sintase (FAS). Por outro lado, o isômero cis-9, trans-11, aumentou a acúmulo de TAGs em adipócitos e também estimulou a GLUT-4 e a LPL. Isso sugere que o isômero trans-10, cis-12 pode ser responsável pela inibição da captação da glicose e oxidação nos adipócitos, levando a um decréscimo de acúmulo de TAGs. Esta ação também fundamenta o efeito do isômero trans-10, cis-12 na indução da resistência a insulina levando a diabetes lipoatrófica observada em animais e em humanos (RISERUS et al., 2002).

Em outro estudo, Riserus e colaboradores (2001) observaram uma redução no diâmetro abdominal em humanos obesos sem afetar o peso corporal total. A redução da massa total de gordura em indivíduos saudáveis, não obesos, do sexo masculino foi observada quando o CLA foi administrado em uma dose diária total de 1,8 g (dividida em 3 doses) por 12 semanas. Já em outro estudo em pacientes diabéticos tipo II, os quais estavam sem tratamento farmacológico, encontrou-se uma relação inversa entre os níveis plasmáticos de CLA, perda de peso e níveis séricos de leptina (BELURY, MAHON, BANNI, 2003).

Os efeitos antiinflamatórios do CLA não parecem ser isômeros-dependentes (PARK et al., 2007) e se caracterizam por uma redução na concentração dos produtos finais das cascatas da lipoxigenase e das cicloxigenases (BELURY, 2002). Uma das hipóteses que permite explicar o efeito antiinflamatório do CLA leva em consideração a incorporação deste ácido graxo aos fosfolípidos de membrana, a qual conduz à redução da incorporação do ácido linoléico na membrana, que por sua vez, é precursor do ácido araquidônico, necessário para a síntese dos eicosanóides. Paralelamente, após ação da fosfolipase A2, com subsequente exposição à delta-6 e delta-5 desaturases, ocorre a produção ácido araquidônico conjugado que pode exercer inibição competitiva das duas isoformas de COX. A redução da atividade enzimática e expressão gênica da COX, com marcante redução da produção de prostanóides, que também tem sido usado para explicar este efeito (BELURY, 2002; RAMAKERS et al., 2005; STACHOWSKA et al., 2007).

Para examinar os efeitos antiinflamatórios do CLA em resposta a proteína lipase LPS (lipossacarídeo que induz inflamação), Zhao e colaboradores (2005), injetaram LPS em porcos tratados com CLA por 14 a 21 dias. A produção de Fator de necrose tumoral (TNF- α), uma citocina envolvida em inflamações sistêmicas e que causa morte apoptótica da célula, proliferação celular, diferenciação e inflamação, e a expressão de RNAm em PBMC (células mononucleares de sangue periférico) foi significativamente reduzida em animais tratados com CLA. Em um estudo complementar, as mesmas células foram estimuladas *ex vivo* com tratamento seguido de LPS e CLA cis-9, trans-11 ou trans-10, cis-12. A secreção de TNF- α e expressão de RNAm foram reduzidas pelos dois isômeros. A redução dessas concentrações foram atribuídas pela atenuação da sinalização do Fator nuclear kappa B (NF-kB), um fator de transcrição que está envolvido na resposta celular a estímulos como citocinas e desempenha um papel fundamental na regulação da resposta imunitária à infecção.

O potencial antiinflamatório do CLA cis-9, trans-11 também foi demonstrado em modelos animais de doenças inflamatórias colônicas. Em estudo recente, a colite foi induzida em camundongos utilizando sulfato sódico dextrano 2,5%, seguido de suplementação dietética de CLA (BASSAGANYA-RIERA et al., 2004). Animais tratados foram protegidos da perda de peso, sangramento retal e danificação de tecido colônico pela colite induzida. Investigações posteriores demonstraram que o mecanismo responsável da proteção mediada por CLA na colite foi regulada positivamente por PPAR γ e PPAR δ e uma subsequente redução em NF-kB. O potencial antiinflamatório do CLA também foi demonstrado em um modelo de colite em suínos. Animais tratados com CLA tiveram uma redução na perda de peso e no sangramento retal (BASSAGANYA-RIERA & HOTENCILLAS, 2006).

O papel dos isômeros do CLA na alteração da gordura corpórea, em adição aos seus efeitos antiinflamatórios, faz do CLA um candidato primordial para o tratamento na resistência à insulina. Um grande número de estudos demonstra os efeitos antiinflamatórios do CLA em macrófagos, os quais são influenciados nas anormalidades metabólicas associadas com a obesidade (RAMAKERS et al., 2005; LI et al., 2006; YU, CORREL, HEUVEL, 2002).

Muitos estudos mostram que o efeito antidiabético positivo associado ao CLA são isômeros específicos, enquanto o isômero CLA cis-9, trans-11 possui efeito antiinflamatório e sensibilizante de insulina, o oposto é verdadeiro para o isômero trans-10, cis-12 (LAROSA et al., 2006). O CLA trans-10, cis-12 tem sido associado a perda de peso e a redução de gordura armazenada. No entanto, recentes evidências revelam que este isômero pode induzir esteatose hepática e resistência à insulina. Um estudo de Poirier e colaboradores (2006) investigou os efeitos do CLA trans-10, cis-12

em tecido adiposo branco. Apesar da redução de gordura corpórea e massa de tecido adiposo, camundongos tratados com CLA trans-10, cis-12 tiveram um aumento significativo nos níveis de TNF- α , IL-6 e expressão de RNAm em tecido adiposo, mas redução nos níveis de adiponectina, leptina e expressão de PPAR γ . A elevada infiltração de macrófagos também foi evidenciada em camundongos tratados com CLA trans-10, cis-12. Investigações posteriores revelaram que o aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias foi devido a efeitos diretos do CLA trans-10, cis-12 sobre os adipócitos. Este isômero ativou o NF-kB conduzindo ao aumento da produção de IL-6. A resposta inflamatória mediada por este isômero em tecido adiposo branco pode conduzir a indução de resistência à insulina.

CLA também mostrou ter efeitos benéficos em modelos animais para aterosclerose. Ambas misturas ou isômeros individuais de CLA parecem reduzir lesões ateroscleróticas e melhorar o perfil lipídico do plasma em ratos, hamsters e em camundongos. Toomey e colaboradores (2006) demonstraram que uma mistura de isômeros de CLA (80% de cis-9, trans-11 e 20 % de trans-10, cis-12) reduziu significativamente o pré-estabelecimento de lesões ateroscleróticas em camundongos machos deficientes de Apolipoproteína E (Apo-E), que é uma constituinte das lipoproteínas VLDL, HDL e quilomícrons, sendo importante no transporte e metabolismo de colesterol e triglicerídeos. A aterosclerose foi induzida pelo tratamento com 1% de colesterol em animais por 8 semanas. O tratamento foi seguido por 8 semanas com 1% de colesterol suplementado tanto com ácidos graxos saturados (AGS) ou mistura de CLA. Animais tratados com AGS tiveram uma grande área lesionada e um aumento na infiltração de macrófagos. Animais tratados com CLA tiveram uma significativa regressão da placa aterosclerótica em um decréscimo na infiltração de macrófagos em lesões, não apresentando mudanças nos níveis de colesterol plasmático ou de AGS. Esses resultados foram acompanhados pelo aumento das concentrações de PPAR γ e PPAR α nas lesões, tendo em vista que a ativação destes receptores nucleares suprime o desenvolvimento de aterosclerose.

Loscher e colaboradores (2005) examinaram o potencial imunoregulatório do CLA cis-9, trans-11 sobre células dendríticas derivadas da medula óssea (BMDC). As células foram incubadas com o CLA cis-9, trans-11 por 3 a 7 dias e estimuladas com lipopolissacarídeo (LPS) para induzir maturação. O isômero reduziu ambas as concentrações de proteínas e RNAm de IL-12p70 e IL-12p40 (interleucinas 12, compostas por subunidades de 70 kDa e 40 kDa respectivamente), enquanto aumentou concentrações de proteínas e RNAm de IL-10, uma interleucina pró-inflamatória, aumentando a expressão superficial do receptor de IL-10. Este estudo também estabeleceu que CLA cis-9, trans-11 diminui as concentrações do fator

nuclear kappa B (NF- κ B) e aumenta as concentrações citosólicas de NF- κ B e I κ B α , sugerindo que o CLA atrasa a translocação de LPS-induzida de NF- κ B, prevenindo a degradação de I κ B α , uma proteína seqüestrante de NF- κ B no citosol. Este efeito foi reverso na presença de um anticorpo neutralizador de IL-10. Por esta razão sugere-se que o CLA cis-9, trans-11 pode ter um potencial terapêutico no tratamento de doenças mediadas por Th1, resposta linfocitária que induz citotoxicidade e resposta inflamatória decorrente da produção de interleucinas como a IL-2, o interferon gama (IFN- γ) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α).

CLA já demonstrou ter efeitos antitumorais no câncer de mama, cólon e em uma linhagem de células tumorais prostáticas. O exato mecanismo para tal efeito ainda não é claro e requer mais pesquisas, mas essas ações podem incluir: sua capacidade de interferir com a proliferação de células tumorais, morte celular por apoptose aumentada, inibição da angiogênese ou aumento do stress oxidativo. Em um estudo que compara o efeito do CLA sobre células de câncer em receptor de estrogênio positivo (MCF-7) e negativo (MDA-MB 231), o CLA demonstrou inibir seletivamente a proliferação de células do receptor de estrogênio positivo. Células MCF-7 tratadas com CLA permaneceram em fase G0/G1. O CLA não teve efeito sobre o crescimento de células MDA-MB 231. Este estudo sugere que o CLA atua interferindo com o sistema de sinalização celular estrogênio mediado por mensageiros secundários. Outro possível mecanismo para a ação antitumoral do CLA é sua habilidade em inibir a angiogênese. Em um modelo de câncer de mama em ratos, ambos isômeros inibiram a angiogênese da gordura mamária e reduziram a concentração do fator de crescimento derivado do endotélio vascular. O isômero trans-10, cis-12 também inibiu a secreção de leptina e induziu a apoptose em adipócitos marrons e brancos, enquanto o isômero cis-9, trans-11 não apresentou efeitos nesses parâmetros. O CLA também mostrou efeito em reduzir a proliferação de células reduzindo a expressão de proteínas envolvidas na regulação do ciclo celular e síntese de DNA (MASSO-WELCH et al., 2004).

Em queratinócitos e fibroblastos humanos expostos a radiação ultravioleta, Storey e colaboradores (2007) observaram que a adição de CLA ao meio de cultura exerceu efeito protetor, basicamente pela modulação de IL-8, TNF e PGE2. Soel e co-autores (2007), avaliando potencial de metástase de células de tumor de cólon de humanos e de ratos, observaram que ambos os isômeros, cis-9, trans-11 e trans-10, cis-12, exerceram efeito mitigante na formação de metástases. Neste experimento, não foi bem esclarecido o mecanismo pelo qual o CLA trans-10 cis-12 exerceu efeito supressor do processo metastático; em contrapartida, o CLA cis-9 trans-11 reduziu

significativamente a atividade da MMP-9, uma metalo-proteinase associada ao processo de invasão e metástase celular.

Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstram uma série de mecanismos moleculares aos quais o CLA atua, incluindo alteração da síntese dos eicosanóides, redução da sinalização de proteínas NF- κ B, ativação de PPAR γ e alteração do nível de citocinas. Como pode ser visualizado na Figura 3, várias são as respostas em relação à saúde mediadas pelos isômeros do CLA. No entanto, mais pesquisas sobre os efeitos biológicos do CLA, incluindo segurança e eficácia em nível de tratamento de doenças humanas devem ser realizadas para que o CLA seja incluído na lista de componentes de alimentos funcionais.

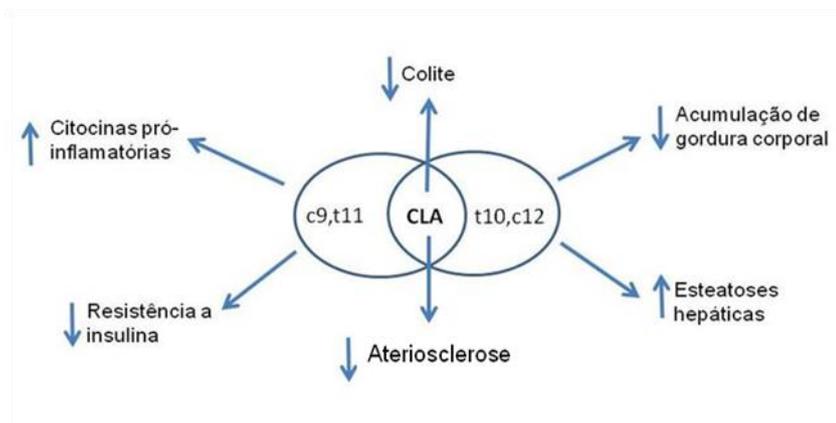


Figura 3. Efeitos dos isômeros cis-9, trans-11 e trans-10, cis-12 de CLA sobre a saúde.

Fonte: Adaptado de ROCHE & REYNOLDS (2010).

1.2 Pele

1.2.1 Anatomia e fisiologia

A pele é o maior órgão do corpo humano, e talvez o mais complexo, recobrendo uma área de aproximadamente 2 m² e que estabelece o limite entre nosso corpo e o ambiente externo, impedindo a perda de água e a entrada de materiais estranhos. Em termos do número de funções desempenhadas, a pele simplesmente se sobrepõe a qualquer outro órgão; a sua principal função é a proteção física, química, imunológica, e a defesa contra patógenos, radiação UV e radicais livres. Ela também é importante na termorregulação, funciona como um órgão sensorial (dor, tato, percepção de temperatura), e executa funções do sistema endócrino (síntese de vitamina D, conversão periférica de pró-hormônios e características sexuais secundárias, produção de feromônios) (HADGRAFT, 2001; MENON, 2002).

A pele é composta basicamente por duas camadas principais (Figura 4). A derme e a epiderme. A derme, com 1-2 mm de espessura, é a camada mais profunda, diretamente adjacente à epiderme e fornece o suporte mecânico para a pele. É constituída por elementos do tecido conjuntivo, composto por proteínas fibrosas (colágeno e elastina) e um gel interfibrilar de glicosaminoglicanas, sais, água, além de fibroblastos. Além disso, é extensivamente vascularizada e apresenta unidades polisebácias e glândulas sudoríparas (MENON, 2002; BOUWSTRA et al., 2003; EL MAGHRABY, BARRY, WILLIAMS, 2008). Por outro lado, a epiderme possui em torno de 100-150 µm de espessura. É subdividida em 4 camadas:

- camada basal: composta por células colunares contendo organelas celulares e filamentos de queratina.

- camada espinhosa: caracterizada pela abundância de desmossomos. Além de organelas típicas e de queratina, as células desta camada possuem os “corpos lamelares”, vesículas que contêm discos lipídicos compostos por fosfolípidios, colesterol e glicosilceramidas empacotados.

- camada granulosa: as células desta camada apresentam abundância de queratina e corpos lamelares, que são secretados para o meio extracelular na fase final de diferenciação destas células em corneócitos.

- estrato córneo: é a camada mais externa da epiderme e a principal responsável pela função barreira da pele (MENON, 2002; HARDING, 2004).

Cada camada da epiderme é definida pela posição, morfologia e estado de diferenciação dos queratinócitos. As células tornam-se queratinizadas a medida que migram para a superfície. A epiderme encontra-se em constante auto-renovação, o qual é um processo dinâmico em que a perda das células da superfície do estrato córneo (descamação) é compensada pelo crescimento das células na epiderme inferior. Este processo leva em torno de 24 dias (MENON, 2002). Considerando-se que a epiderme não apresenta vasos sanguíneos, os nutrientes devem se difundir da derme para a epiderme, para garantir a viabilidade da mesma. Cerca de 95% da epiderme é constituída por queratinócitos e, em menor proporção, por melanócitos, células de Langerhans e células de Merkel (MENON, 2002; EL MAGHRABY, BARRY, WILLIAMS, 2008).

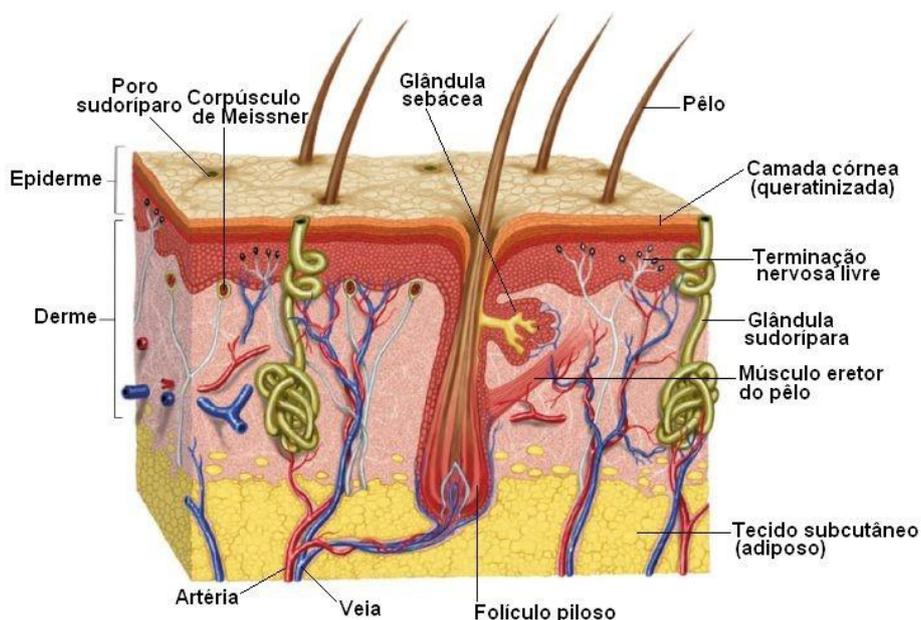


Figura 4. Representação esquemática da pele humana.

Fonte: Adaptada de PRAUZNITZ et al., (2004).

O estrato córneo (EC) é o menor e mais fino compartimento da pele. Possui cerca de 10 a 20 μm de espessura e consiste em diversas camadas de células mortas, corneócitos preenchidos de queratina os quais representam o estado final de diferenciação epidermal. Estas células são embebidas em uma matriz de lamelas lipídicas as quais descem do conteúdo secretado dos corpos lamelares, oferecendo ao estrato córneo uma organização comparada a uma “parede de tijolos” (MENON, 2002). Esta camada tem como função a hidratação cutânea, proteção do meio interno, proteção contra agentes externos, permeabilidade seletiva aos agentes externos, entre outros (GODIN et al., 2007).

Em relação a sua organização, cada corneócito do EC é envolto por um envelope protéico. Sua superfície interior é ligada aos filamentos de queratina que preenchem os corneócitos, enquanto que a superfície externa é covalentemente ligada à uma camada de ω -hidroxiceramidas denominada envelope lipídico. Dessa forma, a composição e a disposição das células e lipídios no EC criam um caminho tortuoso e fazem dele uma importante barreira que controla a saída de compostos e água do organismo, assim como a entrada de compostos acidental ou deliberadamente na pele (MADISON, 2003). Assim, regiões hidrofílicas e lipofílicas podem ser encontradas no interior desta matriz, constituindo meios de difusão de naturezas opostas, o que torna o estrato córneo o principal obstáculo à administração tópica de medicamentos (BOUWSTRA & HONEYWELL-NGUYEN, 2002).

Este efeito de barreira do estrato córneo é observado quando o mesmo é removido por *stripping* com fita adesiva, ocasionando um aumento expressivo na permeação de água e outros compostos (WICKETT & VISSCHER, 2006). Em relação aos fenômenos de transporte, as moléculas são transferidas do meio externo para o estrato córneo através de difusão passiva, sem gasto energético. Não há ocorrência de transporte ativo e nem de outra modalidade de transporte mediado por carreadores/proteínas transportadas nesta camada (AKOMEAH et al., 2004).

1.2.2 Transporte de fármacos através da pele

A penetração de fármacos através da pele, nas diferentes camadas, pode ser descrita pelas leis da difusão e a partição do fármaco na interface formada entre a formulação e a camada córnea (HADGRAFT & LANE, 2005). De acordo com Hadgraft (2001), a permeação de um fármaco pela pele ocorre, geralmente, por difusão passiva através de três vias: transcelular (passando através das células), intercelular (por entre as células) e a transpedicular (pelas vias anexas - através de glândulas e folículos) conforme ilustrado na Figura 5. De acordo com Barry (2001), a área dos apêndices disponível para o transporte de fármacos na via transpedicular é de apenas 0,1%, contribuindo de forma pouco significativa para o alcance do estado estacionário do fluxo de fármacos. O espaço intercelular é constituído de um complexo de lipídeos estruturados em camadas lipídicas lamelares, sendo os principais componentes os ácidos graxos de cadeia longa, ceramidas e colesterol (PLESSIS et al., 2002).

Nas últimas décadas tem havido grande discussão sobre qual via apresentaria ação predominante na penetração de substâncias na pele, mas evidências experimentais sugerem que a via predominante é a intercelular, ou seja, difundindo-se por entre as células da camada lipídica lamelar (HADGRAFT, 2004). Para moléculas

mais polares, a via intercelular é predominante, pois os componentes celulares são de natureza aquosa e neste caso a barreira limitante é a bicamada lipídica (BUCK, 2004). A via transcelular, através dos lipídios do estrato córneo (EC), constitui a principal via para moléculas pequenas e não carregadas, pois evidências sugerem que a extensão do caminho difusional é muito maior do que a espessura do estrato córneo (10-20 μm) e tem sido estimada, em torno de 500 μm . Além disso, os espaços intercelulares contêm lipídios estruturados, sendo que as moléculas necessitam atravessar uma grande variedade de domínios lipofílicos e hidrofílicos, antes de atingir a junção entre o estrato córneo e a epiderme viável (HADGRAFT, 2004).

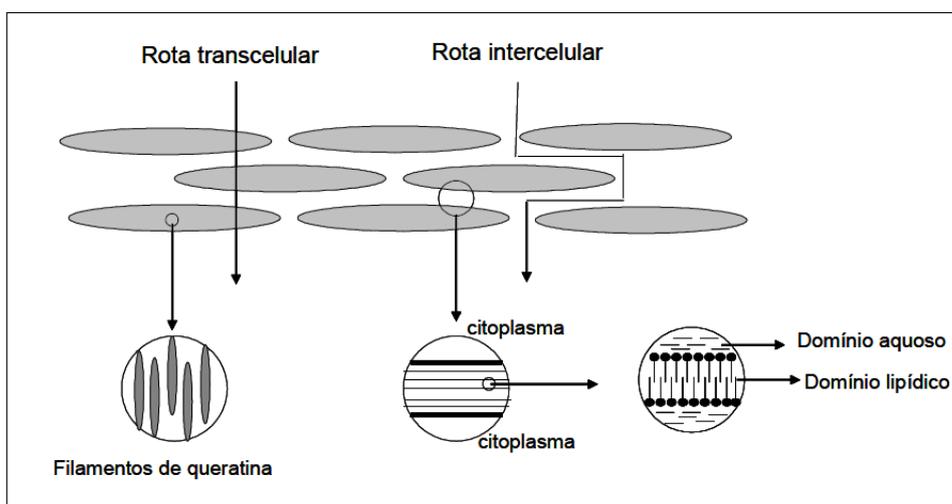


Figura 5. Representação esquemática dos mecanismos de penetração de substâncias (vias intercelular e transcelular) através do estrato córneo.

Fonte: Adaptado de MOSER et al., (2001).

Outros fatores são também responsáveis por afetar a penetração cutânea de fármacos e incluem o grau de hidratação e pH. O aumento da hidratação do estrato córneo diminui a resistência do mesmo, aumentando a permeação de fármacos, provavelmente por provocar um intumescimento das estruturas compactas da camada cornificada e a criação de canais aquosos que permitem a difusão dos mesmos. Como o pH afeta o grau de ionização das moléculas e, embora apenas moléculas não ionizadas passem prontamente através das membranas lipídicas, foi observado que moléculas ionizadas penetram no estrato córneo até um determinado nível. Uma vez que estas moléculas apresentam maior concentração do que as neutras quando em solução saturada ou próxima da saturação, elas acabam exercendo uma contribuição significativa para o fluxo total (AULTON, 2005).

Assim, para que um fármaco aplicado topicamente possa exercer um efeito terapêutico local ou sistêmico, é preciso que seja capaz de atravessar o estrato

córneo. A primeira lei de Fick fornece a equação mais básica da difusão, na qual relaciona o fluxo ao gradiente de concentração:

Equação 1

$$J = \frac{D_m \cdot C_{s,m}}{L} \times \frac{C_v}{C_{s,v}}$$

onde J é o fluxo por unidade de área no estado estacionário, D_m é o coeficiente de difusão, $C_{s,m}$ é a solubilidade do composto na membrana, L é o comprimento da rota de difusão na membrana, C_v é a concentração do composto no veículo e $C_{s,v}$ é a solubilidade do composto no veículo.

Baseado nesta lei, três diferentes estratégias podem ser utilizadas para aumentar a penetração de fármacos na pele: o aumento do coeficiente de difusão do composto (D_m), aumento da solubilidade do composto na membrana ($C_{s,m}$) e aumento da razão $C_v/C_{s,v}$. A última estratégia é a alternativa mais simples, e consiste na supersaturação do veículo com o fármaco, de modo a aumentar sua atividade termodinâmica. As duas primeiras estratégias baseiam-se num efeito do veículo sobre o EC, resultando na alteração da função barreira desta camada ou aumento da partilha do composto para a pele (MOSER et al., 2001).

A primeira Lei de Fick também pode levar em conta o coeficiente de partição do fármaco entre a pele e o veículo, sendo representada pela seguinte equação:

Equação 2

$$J = \frac{d m}{d t} = \frac{D \times k \times \Delta C}{L}$$

onde J é o fluxo por unidade de área no estado estacionário, m é a massa, t o tempo, D é o coeficiente de difusão na pele, k é o coeficiente de partição do fármaco entre a pele e veículo, ΔC é o gradiente de concentração do fármaco entre o veículo e a pele e L é o comprimento da rota difusional através da pele.

Se for medida a massa de difusante acumulada, m , que passa por unidade de área pela membrana em função do tempo, obem-se o gráfico apresentado na Figura 6. A tempos maiores o gráfico se aproxima de uma linha reta, e de sua inclinação obtém-se a constante de fluxo dm/dt , conforme observado na equação descrita acima. Se a linha do estado estacionário é extrapolada até o eixo do tempo, o intercepto assim obtido, para $m = 0$, é o tempo de latência (*lag time*) (L). O estado estacionário é alcançado quando o gráfico se torna linear.

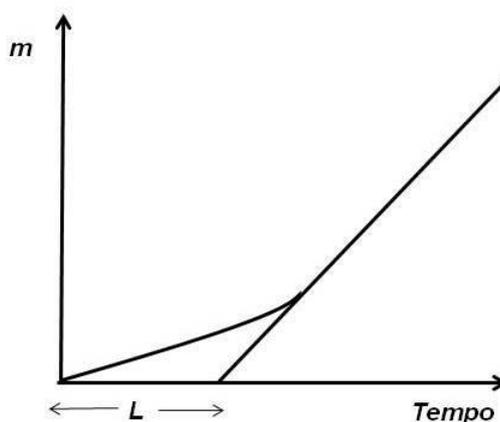


Figura 6. Gráfico representativo de massa de difusante acumulada em função do tempo.

Fonte: AULTON (2005).

Considerando que em circunstâncias normais a concentração de fármaco aplicada na superfície da pele é muito maior do que a permeada, a equação pode ser simplificada para a seguinte equação:

Equação 3

$$J = K_p \times C_0$$

onde K_p é o coeficiente de permeabilidade (= KD/h) (cm.h^{-1}) e C_0 é a concentração de fármaco aplicada na pele. Como se pode observar, muitas vezes é difícil separar K e D , e sua magnitude calculada dependerá de h . No entanto, h não pode ser estimado com precisão, pois depende da tortuosidade dos canais intercelulares que é imprecisa.

O coeficiente de permeabilidade pode ainda ser estimado pela equação empírica descrita por POTTS & GUY, 1992:

Equação 4

$$\text{Log} [k_p/(\text{cm}/\text{h}^{-1})] = - 2,7 + 0,71 \log k_{\text{oct}} - 0,0061 \text{ PM}$$

onde k_{oct} é o coeficiente de partição octanol-água e PM é o peso molecular.

O fluxo máximo de um composto ocorre quando C_0 é igual à solubilidade do fármaco. Uma análise simples destas equações mostra que as propriedades físico-químicas importantes para a penetração de fármacos através da pele são o coeficiente de partição, coeficiente de difusão e solubilidade. As grandes moléculas tendem a se difundir lentamente, daí o termo PM na equação 4. Moléculas com boa solubilidade em óleos e água apresentam boa permeabilidade. Estas moléculas tendem a ser compostos com baixo ponto de fusão. As equações 2 e 3 indicam que um alto coeficiente de partição fornece um alto fluxo, no entanto, grandes valores de K tendem

a produzir moléculas apresentando baixa solubilidade. Em geral, moléculas com um log K entre 1-3 têm um comportamento de partição ótimo para difusão (HADGRAFT, 2004).

1.2.3 Estudos de permeação cutânea

A verificação da permeação cutânea é uma das principais etapas no delineamento de novas formas farmacêuticas de liberação dérmica ou transdérmica, pois permitem compreender os fatores que determinam o bom desempenho *in vivo*. Certamente, os dados mais confiáveis de absorção através da pele são obtidos de estudos em humanos, entretanto, esses estudos geralmente não são possíveis durante a fase inicial de desenvolvimento de um novo medicamento ou de novos candidatos a fármacos. Visto que é praticamente impossível realizar estudos de permeação cutânea somente em modelos *in vivo*, numerosos modelos, *ex vivo* e *in vitro* têm sido freqüentemente empregados para avaliar os parâmetros cinéticos da permeação de fármacos através da pele (GODIN & TOUITOU, 2007).

O modelo de células de difusão tipo Franz (Figura 7), também chamado de modelo estático, representa uma opção de ampla aplicabilidade para estudos de penetração e permeação (FRANTZ, 1990). Neste modelo, o estrato córneo da pele encontra-se voltado para o compartimento doador, enquanto que o tecido conectivo da derme para o receptor (SINKO, 2008). Normalmente utiliza-se a pele de orelha suína para este estudo por esta ser semelhante à pele humana quanto à composição lipídica, permeabilidade e coeficiente de partição. Também podem ser utilizadas peles de rato e humana (PIEMI et al., 1999; ALVES, POHLMANN, GETERRES, 2005). A formulação é colocada no compartimento doador e permanece diretamente em contato com a pele (estrato córneo). A pele separa o compartimento doador do receptor. No compartimento receptor é colocado um fluido receptor que normalmente é uma solução na qual a substância teste é solúvel, a fim de garantir a condição *sink*. Esta solução é mantida sob agitação e aquecimento (37°C). As coletas são realizadas a partir do fluido receptor em tempos pré-determinados para a quantificação da amostra, que normalmente é feita por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). O meio do compartimento receptor é sempre repostado após a coleta.

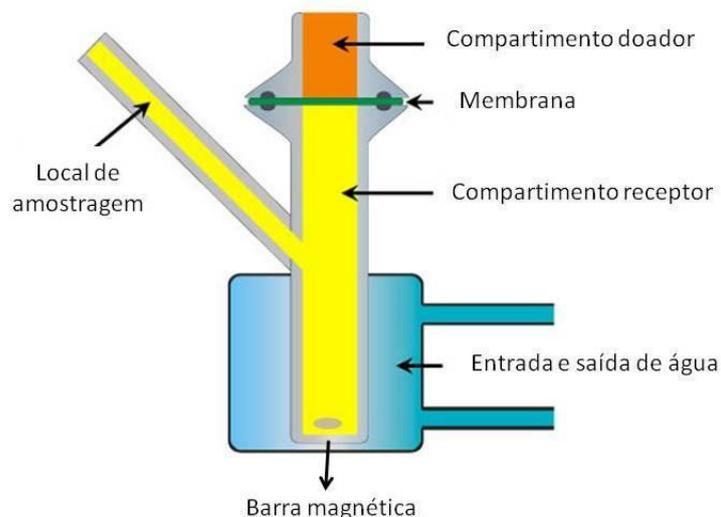


Figura 7. Esquema de célula de difusão tipo Franz.

Fonte: Adaptado de www.keystone-scientific.co.jp/.../franz/FAQ.html.

Técnicas complementares podem ser realizadas para a quantificação das substâncias ativas na pele como, por exemplo, o *tape-stripping* (Figura 8), em que se utiliza fitas adesivas para separar o estrato córneo da epiderme e avaliar a quantidade de substância presente na fita (referente a quantidade que permaneceu no estrato córneo) através de técnicas de doseamento (ALVES et al., 2007; PRIMO et al., 2006). A homogeneização de tecidos em solvente apropriado também é outra técnica utilizada para quantificação de ativos na derme e epiderme (FRANG et al., 2004; PRIMO et al., 2006).

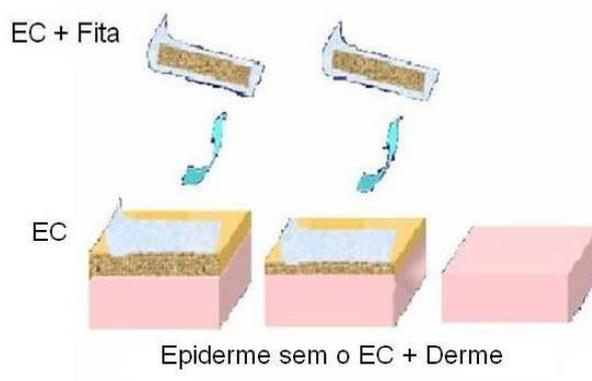


Figura 8. Representação esquemática da separação do EC e da EP+D pela técnica do *tape stripping*.

A técnica de *tape stripping* é amplamente usada e aceita para estudar a cinética e a penetração de fármacos na pele, permitindo determinar a localização e a distribuição de substâncias no estrato córneo. É caracterizada por ser uma técnica

minimamente invasiva, na qual o estrato córneo é removido seqüencialmente após aplicações repetidas de fitas adesivas, possibilitando determinar a quantidade de fármaco presente na primeira camada da pele. O *tape stripping*, especialmente nas últimas duas décadas, tornou-se umas das principais técnicas utilizadas tanto na pesquisa quanto em estudos de biodisponibilidade tópica e bioequivalência, proposta pelo FDA em 1998 para este fim (SHAH, 1994; ESCOBAR-CHÁVEZ et al., 2008).

Experimentos de *tape stripping* são relativamente fáceis e simples de serem executados, no entanto, alguns parâmetros podem influenciar a quantidade de fármaco e estrato córneo removidos pela fita adesiva. Estes parâmetros incluem fatores intrínsecos, como hidratação da pele, coesão entre as células, região anatômica e diferenças inter-individuais; e fatores extrínsecos, os quais abrangem a pressão na qual a fita é aplicada na pele, a duração da pressão e o processo de remoção da fita (ESCOBAR-CHÁVEZ et al.; 2008). Em geral, assume-se que é necessária a aplicação de 10 a 20 fitas adesivas para a completa remoção do estrato córneo e que as primeiras 10 fitas podem representar 90 % da concentração de fármaco presente nessa camada, de modo que as fitas subseqüentes contribuem em menos de 5 % (CARON et al., 1990; BENFELDT et al., 2007).

Sabe-se que fármacos de uso tópico se distribuem primeiramente pelo estrato córneo e a partir dele alcançam a epiderme e a derme. Por conseguinte, a concentração de fármaco presente no estrato córneo está diretamente relacionada com a concentração que se difunde para as demais camadas. Desta maneira, a biodisponibilidade na pele pode ser estimada pela quantidade de fármaco presente no estrato córneo utilizando a técnica de *tape stripping* (SHAH, 1994).

1.2.4 Estratégias para melhorar a passagem de fármacos através da pele

Embora o tratamento tópico apresente vantagens irrefutáveis, a adequada penetração cutânea de compostos ativos para produzir uma resposta terapêutica ainda é um grande desafio no desenvolvimento de medicamentos. A pele é muito efetiva como uma barreira à penetração, sendo que a epiderme exerce o maior controle, deixando penetrar apenas algumas substâncias em determinadas condições. A camada córnea, constituída por uma estrutura lipídica altamente ordenada, age como a principal barreira protetora, tanto para a excessiva perda de água, quanto para danos provocados por agentes tóxicos e microorganismos do ambiente. Neste sentido, substâncias ativas quando veiculadas em formas farmacêuticas convencionais, não alcançam concentrações apreciáveis nas camadas mais profundas da pele, fazendo com que as quantidades permeadas alcancem unicamente níveis subterapêuticos,

tornando necessário assim o emprego de estratégias que aumentem a penetração cutânea dos mesmos. (SCHÄFER-HORTING et al., 2007).

Diferentes estratégias têm sido empregadas para contornar as limitações impostas pela baixa absorção percutânea de fármacos. Os promotores de absorção, como por exemplo, etanol, Tween 80, taurocolato de sódio, têm demonstrado ser efetivos. Entretanto, muitos deles induzem ao aparecimento de dermatite irritativa, a qual está de fato associada ao aumento de até 80 vezes na penetração cutânea de substâncias ativas (LASHMAR, HADGRAFT, THOMAS, 1989). Além dos promotores químicos, técnicas envolvendo processos físicos têm sido testadas com sucesso e incluem: (i) iontoforese, na qual a penetração de compostos químicos com carga através da pele é induzida por meio da aplicação de um campo elétrico; (ii) fonoforese, que consiste na utilização do ultra-som de alta frequência, e (iii) eletroporação, a qual envolve a criação de poros aquosos na bicamada lipídica por meio da aplicação de pulsos elétricos curtos. A formação de pares iônicos e a perfuração da pele com o uso de microagulhas são outras estratégias descritas na literatura que são usadas com o intuito de aumentar a penetração de fármacos (BARRY, 2001; CHORILLI et al., 2007; BOUNOURE et al., 2008; MARRA et al., 2008; HAQ et al., 2009).

1.3 Nanoemulsões

1.3.1 Generalidades

Do ponto de vista farmacêutico, nanoemulsões (NE) podem ser definidas como sistemas cineticamente estáveis, apresentando gotículas de diâmetro inferior ao micrômetro, uniformemente dispersas em uma fase externa e estabilizada por um sistema tensoativo adequado, podendo ser do tipo óleo em água (o/a) ou água em óleo (a/o) (BENITA, 1998). São também conhecidas como miniemulsões ou emulsões submicrométricas com glóbulos de diâmetros na faixa de 100 a 500 nm (FERNANDEZ et al., 2004; NAKAJIMA, TOMOSSA, OKABE, 1993) ou 50 a 300 nm (TADROS, IZQUIERDO, ESQUENA, 2004). Segundo CAPÉK (2004) as nanoemulsões apresentam aparência translúcida quando o tamanho de glóbulo é inferior a 200 nm e aparência leitosa quando este se encontra entre 200 e 500 nm (Figura 9).

	Aparência	Denominação	Aspecto
2 - 20 μ m		Macro emulsão	Branca leitosa
0,1 - 0,3 μ m		Nanoemulsão	Branca azulada
< 0,1 μ m		Microemulsão	Translúcida
0,01 μ m		Soluções micelares	Transparentes
0,001 μ m		Soluções moleculares	Transparentes

Figura 9. Escala de granulometria das emulsões.

Fonte: ANSEL, POPOVICH, ALLEN, 2000.

As NE apresentam-se como líquidos de baixa viscosidade, sendo que as moléculas de reduzida solubilidade aquosa encontram-se preferencialmente solubilizadas no óleo e/ou adsorvidas na interface da nanoestrutura (SONNEVILLE-AUBRUN, SIMONNET, L'ALLORET, 2004). Apesar da grande importância para o desenvolvimento de formulações de uso tópico, a avaliação da viscosidade de nanoemulsões tem sido pouco descrita na literatura. A viscosidade é influenciada pela composição das nanoemulsões e por parâmetros como a concentração da fase

interna, o diâmetro de gotícula e a viscosidade do óleo formador do núcleo oleoso (JUMMA & MULLER, 1998; CHUNG et al., 2001). As NE usualmente comportam-se como fluidos newtonianos e, sua viscosidade é comparada à da água, até mesmo em elevadas concentrações de gotículas, muito provavelmente devido à coalescência reversível das mesmas (DAMASCENO, 2005; LANGEVIN, 1988).

1.3.2 Preparação e caracterização

As propriedades das nanoemulsões dependem não só das condições termodinâmicas, ou seja, da composição, temperatura e pressão, mas também do método de preparação e, particularmente, da ordem de adição dos componentes (WANG et al., 2009). As NE são passíveis de serem formadas numa ampla gama de composição entre óleo/água/tensoativo, dependendo das propriedades dos componentes envolvidos (KREILGAARD, 2002). A região de sua existência é tipicamente apresentada em um diagrama de fase pseudo-ternário, como razão entre óleo, água e uma mistura fixa de tensoativo/co-tensoativo (OLIVEIRA et al., 2004). As NE apresentam uma grande diversidade estrutural em função da sua composição, deste modo, um modelo estrutural proposto por Schulman e Roberts (1982) mostra-se adequado para estes sistemas, em que apresenta uma camada monomolecular de moléculas anfifílicas (tensoativo e cotensoativo) sobre uma interface, podendo a emulsão ser do tipo a/o ou o/a, conforme ilustrado na Figura 10.

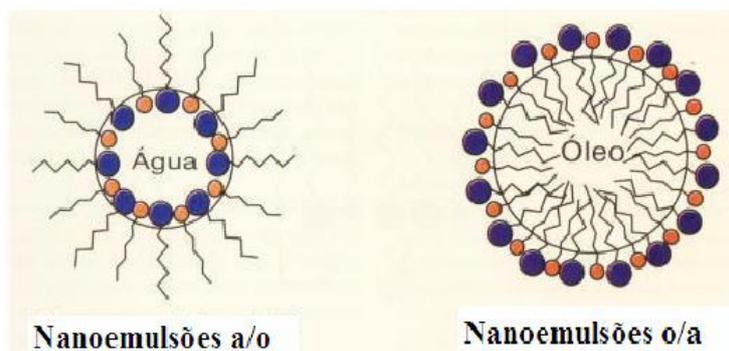


Figura 10. Estrutura de uma gotícula dispersa em um sistema a/o e o/a, respectivamente.

Fonte: Adaptado por SCHULMAN & ROBERTS, 1982.

Na caracterização das nanoemulsões, propriedades físico-químicas como diâmetro de gotícula, potencial zeta, viscosidade, pH e tensão superficial são avaliadas, pois estas propriedades podem influenciar a extensão da absorção, sendo que estas características são, por sua vez, diretamente afetadas pelo óleo formador do

núcleo oleoso e pelo tensoativo utilizado na formulação, bem como pela técnica de preparação. O potencial zeta é um parâmetro fundamental para a avaliação da carga de superfície das partículas nas nanoemulsões, e que fornece informações sobre a estabilidade do sistema. A determinação do potencial zeta é realizada, normalmente, através de técnicas eletroforéticas específicas, e reflete a composição da interface, além de estar relacionada com a concentração de fármaco na interface óleo/água (TAGNE, KAKUMANU, NICOLSI, 2008). O pH parece afetar consideravelmente a carga da superfície de nanoemulsões e conseqüentemente a estabilidade destes sistemas, afetando também o tamanho das gotículas (YILMAZ & BORCHERT, 2005). O pH final das nanoemulsões deve levar em consideração diversos aspectos, incluindo, a estabilidade da forma farmacêutica, a estabilidade do fármaco no veículo, e a via de administração. Para a aplicação cutânea, é indicado que o pH das formulações seja de neutro a levemente ácido (ALVES et al., 2007).

Na preparação das nanoemulsões, os óleos e os tensoativos são os principais componentes da formulação. Surfactantes são necessários na preparação de nanoemulsões, a fim de obter um pequeno e estável tamanho de gotículas. O tipo e concentração do surfactante afetam as propriedades físico-químicas, como tamanho e índice de polidispersão. Lecitinas de ovo e de soja são tensoativos de origem natural amplamente utilizados para compor a interface óleo/água desses sistemas, por serem atóxicos, biocompatíveis e agentes estabilizantes das formulações. As lecitinas são misturas complexas de fosfolipídios extraídos da gema de ovo ou da soja, cujo componente majoritário é a fosfatidilcolina. Lecitinas exibem um alto valor de potencial zeta negativo, capazes de prevenir a coalescência das gotículas, considerados assim agentes estabilizadores das nanoemulsões. Além de serem biocompatíveis e não tóxicas, também possuem propriedades hidratantes para a pele e, ainda, podem constituir um sistema adequado de liberação de fármacos (SCHMID & KORTING, 1993). Óleos de origem vegetal e/ou semi-sintéticas, constituídos principalmente de triglicerídeos, têm sido correntemente utilizados para compor a fase interna das nanoemulsões. O tipo de fase oleosa utilizada é a parte principal na preparação de nanoemulsões e também parece interferir principalmente no tamanho de gota e índice de polidispersão devido a diferença em sua viscosidade, características hidrofóbicas e tensão interfacial (ALMEIDA et al., 2009).

De acordo com a literatura, as nanoemulsões podem ser preparadas por métodos que envolvem alta energia de emulsificação ou por métodos que utilizam baixa energia (PEY et al., 2006). A obtenção de nanoemulsões através do uso de homogeneizadores de alta pressão e microfluidizadores tem sido muito descrita na literatura (TADROS, IZQUIERDO, ESQUENA, 2004; SOLÉ et al., 2006). De maneira

geral, a preparação de nanoemulsões por meio desses procedimentos pode ser dividida em duas fases distintas. Em uma primeira etapa, as fases, oleosa e aquosa, são aquecidas separadamente e emulsionadas através do uso de homogeneizadores de alta rotação (como Ultraturrax® e Politron®). A emulsão obtida na primeira etapa apresenta um tamanho de gotícula submicrométrico (entre 500 e 1000 nm), influenciado pelo equipamento utilizado e pelas condições operacionais. Após o resfriamento, segunda etapa, o diâmetro de gotícula é progressivamente reduzido até valores compreendidos entre 100 e 300 nm através de homogeneizadores de alta pressão (BIVAS-BENITA et al., 2004) ou outros equipamentos, como o microfluidizador e o ultra-som (TEIXEIRA et al., 2003). No entanto, mesmo que este método forme nanoemulsões com propriedades desejadas com escala laboratorial, não é próprio para fármacos termolábeis, como retinóides e macromoléculas, incluindo proteínas, enzimas e ácidos nucleicos. Além disso, este método requer o uso de instrumentos sofisticados e extensa fonte de energia, o que aumenta consideravelmente o custo do processo de nanoemulsificação. Por estes motivos, pesquisadores começaram a focar nos métodos de emulsificação de baixa energia (HERNÁNDES & CANO, 1998).

Os métodos de emulsificação de baixa energia fazem uso de propriedades físico-químicas do sistema e utilizam a inversão espontânea na curvatura do tensoativo para a obtenção de glóbulos de tamanho reduzido (SAJJADI, 2006). Dentro desta classe estão incluídos métodos como a emulsificação espontânea (YU 1993; BOUCHEMAL et al., 2004; TABOSA DO EGITO et al., 1996; KELMANN et al., 2007). Este método baseia-se na adição de uma solução solvente-óleo na fase aquosa, resultando na emulsificação das nanogotículas da fase oleosa, devido a algum tipo de instabilidade interfacial, conhecida como efeito Marangoni, originada da rápida difusão do solvente através da interface diminuindo a tensão interfacial (BOUCHEMAL, et al., 2004; VITALE & KATZ, 2003; XU & LUO, 2007). A emulsificação espontânea é controlada por diferentes mecanismos que parecem ser afetados pela composição do sistema e suas características físico-químicas (BOUCHEMAL et al., 2004). O tamanho e a distribuição das gotículas são fortemente afetados pela natureza do solvente usado durante o processo de emulsificação espontânea. Com isso, um aumento progressivo na quantidade de solvente orgânico resulta na diminuição do diâmetro das gotículas, o que pode ser atribuído a maior velocidade de difusão da fase orgânica em água, relacionado com a menor concentração dos componentes da fase interna solubilizados na fase orgânica. A diminuição do diâmetro de gotícula, no entanto, só ocorre até certo ponto, após o qual provavelmente a difusão do solvente não seja mais influenciada pela concentração de soluto, somente afetada pelas propriedades de

difusão do solvente. Além desses, outros parâmetros, como a viscosidade do óleo, o equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL) do tensoativo e a miscibilidade do solvente com a água, são importantes na determinação da qualidade da nanoemulsão final obtida através deste procedimento. Por esses motivos, este método tem recebido atenção e se tornou interessante para estudos de formulação, pois apresenta vantagens tais como a fácil realização em escala laboratorial, dispensa equipamentos sofisticados, não utiliza altas temperaturas, e geralmente leva à formação de pequeno tamanho de gotícula na formulação. Através dessa técnica, é possível preparar nanoemulsões com propriedades similares às aquelas obtidas por métodos físicos (ALMEIDA, TEIXEIRA, KOESTER, 2008).

1.3.3 Aplicação tópica cutânea das nanoemulsões

Nanoemulsões têm sido amplamente descritas como um veículo para liberação de fármacos pouco hidrossolúveis na pele, para vários fins, como por exemplo, tendo efeito na superfície (protetores solares, cosméticos e antiinflamatórios), efeito cutâneo (corticosteróides) e efeito sistêmico (antiinflamatórios não esteroidais) (JUNYAPRASERT et al., 2009). Tais sistemas podem representar uma estratégia para a redução da toxicidade sistêmica, reduzindo efeitos colaterais de diversos fármacos potentes e, ao mesmo tempo, restringindo os efeitos desejados para tecidos específicos (YILMAZ & BORCHERT, 2006). Ademais, podem aumentar a taxa de permeação na pele e melhorar a ação tópica devido à sua associação com a superfície da pele e ao pequeno tamanho de partícula, prolongando assim o tempo de permanência devido à sua grande área superficial e à baixa tensão superficial das gotículas do óleo (SILVA et al., 2007; SILVA et al., 2009; FASOLO et al., 2007).

Muitos estudos sugerem que as NE possuem o potencial de aumentar a penetração cutânea de fármacos hidrofílicos e lipofílicos, quando comparadas aos veículos convencionais (CHEN & CHANG, 2004; SINTOV & SHAPIRO, 2004; WU & RAMACHANDRAN, 2001; DELGADO-CHARRO et al., 1997; DREHER, WALDE, WEHRLI, 1997; KRIWET & MULLERGOYMANN, 1995; TROTA & GASCO, 1994). Vários mecanismos têm sido descritos para explicar o aumento da penetração cutânea após a administração tópica de nanoemulsões. Basicamente, este aumento se deve a dois mecanismos distintos: aos altos gradientes tensoativos promovidos pelo seu alto poder solubilizante de fármacos, sem aumentar a afinidade do veículo pelo fármaco, e ao potencial promotor de penetração cutânea dos seus constituintes individuais (KREILGAARD, 2002). As nanoemulsões também podem interagir com o estrato córneo desestruturando a bicamada lipídica do mesmo. Dessa forma, os lipídeos

passam de uma forma cristalina ordenada para uma forma líquida desordenada, aumentando a permeabilidade cutânea e a penetração de substâncias, que normalmente não passariam através dessa barreira. O tamanho reduzido das partículas também permite o estreito contato com as junções superficiais dos corneócitos, favorecendo o acúmulo das partículas e sustentação da liberação do agente ativo (GEVE, 2004; SANNA et al., 2007). Além disso, o efeito oclusivo proporcionado pelo filme lipídico hidrata a camada córnea e favorece a absorção (WISSING & MULLER, 2003; ALVES et al., 2007).

As NE são superiores às soluções micelares em termos de potencial de solubilização de substâncias, e, por conseguinte, são usadas para aumentar a solubilização e a absorção de fármacos lipofílicos (FORMARIZ, 2004). Estas formulações parecem ser capazes de favorecer a penetração de substâncias de interesse por meio da fluidização natural da pele (BOUCHEMAL et al., 2004; SONNEVILLE-AUBRUN, SIMONNET, L'ALLORET, 2004). Outras vantagens apresentadas por estes sistemas, quando de uso tópico, são a modulação da barreira do estrato córneo, controlando a penetração cutânea; o aumento da interação do ativo com a pele, devido à grande área superficial e a baixa tensão superficial das gotículas de óleo, além do aumento da estabilidade química do ativo (ALVES et al., 2007; JUNYAPRASERT et al., 2009).

A aplicação tópica de nanoemulsões já demonstrou ser um excelente alvo de liberação de fármacos lipofílicos em músculos e articulações, em modelos animais. Um estudo pré-clínico utilizando edema de pata em modelo animal mostrou reduzir a inflamação utilizando antiinflamatórios não esteroidais encapsulados em cremes nanoemulsionados, quando comparados à formulações comerciais. Estudos farmacocinéticos utilizando cremes nanoemulsionados para uso tópico, contendo diclofenaco e cetoprofeno, foram conduzidos para avaliar a penetração do fármaco na pele e determinar o local do tecido (músculo e articulação) e o nível plasmático dos fármacos seguido da administração tópica. Comparado com a administração oral, os dois fármacos administrados em cremes nanoemulsionados demonstraram de 4 a 6% menor concentração plasmática, 60 a 80% maior concentração no tecido musculoso e 9% a mais de fármaco nas articulações (SHAH, BHALODIA, SHELAT, 2010).

As propriedades de penetração na pele de um sistema livre de solvente e sua baixa irritabilidade fazem das nanoemulsões um promissor candidato para a liberação transdérmica de fármacos lipofílicos. As nanoemulsões são facilmente utilizadas em produtos de cuidado com a pele, devido as suas ótimas características sensoriais (rápida penetração, mesclando texturas) e suas propriedades biofísicas

(especialmente por seu poder de hidratação na pele) (SONNEVILLE-AUBRUN, SIMONNET, L'ALLORET, 2004).

Duas principais fontes de instabilidade foram identificadas e extensivamente estudadas em nanoemulsões: efeito de Ostwald e floculação induzida após a adição de polímeros espessantes. O controle desses dois mecanismos permitiu a produção industrial de uma larga variedade de produtos cosméticos, desde fluídos aquosos, até géis obtidos pelo aumento da fase oleosa ou pela adição de polímeros (SONNEVILLE-AUBRUN, SIMONNET, L'ALLORET, 2004). Os doadores de viscosidade são utilizados largamente em nanoemulsões para uso tópico com o intuito de alcançar a consistência desejada para aplicação na pele. Deste modo, a utilização de polímeros formadores de géis e promotores de viscosidade possui grande aplicabilidade no desenvolvimento de nanoemulsões.

Geralmente, as substâncias formadoras de géis são polímeros que quando dispersos em meio aquoso assumem conformação doadora de viscosidade à preparação (MAIA CAMPOS, BONTEMPO, LEONARDI, 1999). Logo, pode-se definir o gel como uma preparação semi-sólida composta de partículas coloidais que não se sedimentam (ficam dispersas). Dentre as matérias-primas utilizadas para formação e estabilização de géis, destaca-se a hidroxipropilmetilcelulose (HPMC), um polímero com característica não iônica que a Farmacopéia Americana (USP) descreve como uma parte da celulose orto-metilada e da celulose orto – (2-hidroxipropilada), e é encontrado em diversas graduações que variam em viscosidade e em quantidade para substituição.

O tipo de polímero empregado na formulação do gel pode influenciar o comportamento reológico e, portanto, pode influenciar a estabilidade física do produto, assim como no seu comportamento sobre a pele (liberação do ativo pelo veículo e formação de filme na pele). As características reológicas são propriedades importantes a serem consideradas na fabricação, estocagem e aplicação de produtos de uso tópico. Cada categoria de produto deve apresentar, assim, um comportamento reológico adequado à aplicação respectiva, sendo conveniente conhecer as velocidades de deformação das operações a que vão estar sujeitas (LEONARDI & MAIA CAMPOS, 2001).

Mateti e colaboradores (2010) demonstraram o aumento da permeação do aciclovir sódico pelo estrato córneo utilizando géis de HPMC. Este polímero foi selecionado por atuar como um agente anti-nucleante a fim de prevenir a acumulação do fármaco no veículo e promover a permeação. Além disso, HPMC sendo hidrofílico em sua forma natural forma um filme sobre a superfície da pele, tornando-a úmida prevenindo a perda de água transepitelial. Este efeito poderia levar a condições

oclusivas e favorecer a permeação do fármaco no estrato córneo devido a hidratação das camadas da pele.

Zhou e colaboradores (2009) desenvolveram nanoemulsões de lecitina, sem qualquer tensoativo sintético, usando somente óleo de serpente, lecitina de soja, glicerol e água na sua preparação. O efeito de proporção de glicerol e água, assim como da concentração de lecitina, sobre as propriedades físicas da nanoemulsão, como tamanho da gota, viscosidade e morfologia, foram avaliados. A incorporação da nanoemulsão em um creme o/a melhorou significativamente a capacidade de hidratação da pele, atingindo valores cerca de 2,5 vezes maiores quando a concentração da nanoemulsão no creme foi de 1,0%. A melhora da penetração dérmica também foi evidenciada quando o creme contendo a NE encapsulando o corante vermelho foi aplicado sobre a pele abdominal de ratos. A fluorescência da derme dos animais que receberam o creme contendo o corante incorporado na NE foi cerca de 9,9 vezes maior do que aquela produzida pela aplicação do creme contendo o vermelho de Nilo não encapsulado. Este efeito foi atribuído à maior hidratação cutânea proporcionada pelo uso da nanoemulsão.

Alves e colaboradores (2007) avaliaram a permeação cutânea do antiinflamatório nimesulida, o qual foi incorporado em três diferentes formulações, nanoemulsão lipídica, nanoesferas e nanocápsulas poliméricas, associadas em hidrogéis de carbopol. Para o estudo de permeação com células de Franz foi utilizado pele humana e como meio receptor (7 mL), tampão fosfato pH 7,4, contendo 10% de polietilenoglicol 400. Uma dose de 1 g de gel foi utilizada para os experimentos sendo colocados sobre a pele. Em intervalos de tempos determinados, alíquotas de 500 µg foram coletadas. A temperatura do meio foi mantida em 37 °C, sob agitação com agitador magnético. Após 24h de experimento foi realizado a técnica de *tape stripping*. Os resultados mostraram que a nimesulida encapsulada na nanoemulsão e, posteriormente veiculada no gel, não foi detectada no estrato córneo, uma vez que o fármaco permeou diretamente para a derme. As outras formulações apresentaram retenção no estrato córneo, sugerindo afinidade dos polímeros por esta camada.

2.1 Materiais

2.1.1 Matérias-primas

Acido linoléico conjugado CLA, LUTA-CLA (composição: 4 a 6% de ácidos graxos livres, 30% de metil ésteres de CLA cis9-trans11, 30 % de metil ésteres de CLA trans10-cis12, menos de 1% dos outros isômeros (cis-cis e trans-trans), 22% de metil ésteres do ácido oléico, 6% de metil ésteres do ácido palmítico, 4% de metil ésteres do ácido esteárico, 2% de metil ésteres do ácido linoleico) (BASF, EUA)

Estearato de polietilenoglicol, Solutol HS-15[®] (constituído de poliglicol mono- e diésteres do ácido 12-hidroxiesteárico, contendo cerca de 30% de polietilenoglicol livre) (BASF, Trostberg, Alemanha)

Hidroxipropilmetilcelulose HPMC (2208, 19 a 24 % de grupo metoxil e 4 a 12 % de grupo hidroxipropoxil, viscosidade de 3.200 a 4.800 cPs em solução aquosa 2% m/m) (Bayer, Alemanha)

Lauril Sulfato de Sódio (Vetec, São Paulo, Brasil)

Lecitina de Soja 100% de fosfatidilcolina (Lipoid S100, Alemanha)

Monoelato de sorbitano etoxilado 20 EO, Tween 80 (Deg, Brasil)

Quitosana de Baixo Peso Molecular (50.000 a 190.000 Da, viscosidade de 20 a 300 cP a 1% em solução de ácido acético 1%) (Sigma-Aldrich Co., EUA)

2.1.2 Solventes, soluções e reagentes

Acetona PA (Synth, São Paulo, Brasil)

Acetonitrila HPLC (JTBayer, EUA)

Ácido fosfotúngstico (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil)

Ácido láctico 85 % (Purac Sínteses, Brasil)

Álcool etílico PA (Synth, São Paulo, Brasil)

Eosina (Nuclear, São Paulo, Brasil)

Fosfato de potássio monobásico anidro 99% (Sigma Aldrich, Alemanha)

Fosfato de Sódio (Sigma Aldrich, Alemanha)

Hematoxilina (Nuclear, São Paulo, Brasil)

Paraformaldeído (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil)

Xilol (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil)

2.1.3 Equipamentos

Agitador Magnético de 6 pontos Dist (Florianópolis, Brasil)

Analizador Termogravimétrico TGA-50 (Shimadzu, Kyoto, Japão)

Balança Analítica Ohaus Corporation AS 2005 (Nova Jersey, EUA)

Bomba de Vácuo Fisatom (São Paulo, Brasil)

Calorímetro Diferencial de Varredura DSC-60 (Shimadzu, Kyoto, Japão)

Camêra digital DS-5M-L1 conectada a um microscópio óptico (Nikon Melville, NY, USA)

Centrifuga Sigma 4K15 (EUA)

Cromatógrafo Líquido LC-10A equipado com bomba LC-10AD, desgaseificador DGU-14A, detector SPD-10AV e sistema controlador SCL-10Avp (Shimadzu, Kyoto, Japão)

Evaporador Rotatório Marconi (São Paulo, Brasil)

Microscópio Eletrônico de Transmissão 100 KV JEOL JEM-1011 (Tóquio, Japão)

Micrótomo Leica RM2125RT (Leica Microsystems, EUA)

Potenciômetro Oakton WD-35613-00 (Oakton, EUA)

Viscosímetro rotacional HAAKE modelo VT 550-PK 10

Zetasizer Nano ZS Nanoseries (Malvern Instruments, Reino Unido)

2.2 Métodos

2.2.1 Preparação e caracterização das nanoemulsões de ácido linoléico conjugado (CLA)

2.2.1.1 Preparação das nanoemulsões

As nanoemulsões foram preparadas pela técnica da emulsificação espontânea descrita por BOUCHEMAL et al. (2004). Primeiramente, 20 mL de uma solução contendo CLA (LUTA-CLA, BASF) (180, 240 ou 300 μL) e lecitina de soja 0,125% (surfactante lipofílico) foi preparada usando uma mistura de etanol:acetona 60:40 (V/V) como solvente. Esta solução foi vertida, sob agitação magnética, em 10 mL de uma solução aquosa contendo monoelato de sorbitano etoxilado 20 EO (Tween 80, Deg) a 0,4% (m/V) ou estearato de polietilenoglicol (Solutol HS15, Basf) a 1,0% (m/V) como surfactantes hidrofílicos. A emulsão óleo em água (O/A) foi formada espontaneamente após a difusão do solvente orgânico na fase externa aquosa. A agitação magnética foi mantida durante 20 minutos para permitir que o sistema atingisse o equilíbrio. A emulsão finamente dividida foi então submetida à evaporação sob pressão reduzida para remoção do solvente orgânico e concentração até volume de 10 mL. O efeito do tipo de surfactante e da concentração de CLA sobre as características físico-químicas das dispersões coloidais foi avaliado. As concentrações finais obtidas em 10 mL das nanoemulsões de CLA foram de 16,46; 21,96 e 27,44 $\mu\text{g/mL}$ levando em conta a densidade do CLA de 0,915 g/mL, previamente determinada. As formulações brancas foram preparadas da mesma maneira, porém, sem a adição do CLA na fase orgânica. A composição final das formulações estudadas é mostrada na Tabela 2.

Tabela 2. Composição final das formulações.

FORMULAÇÃO	T-B	T-180	T-240	T-300	S-B	S-180	S-240	S-300
CLA (μL)	-	180	240	300	-	180	240	300
lecitina de soja (%)	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125
Tween 80 (%)	0,4	0,4	0,4	0,4	-	-	-	-
Solutol HS15 (%)	-	-	-	-	1,0	1,0	1,0	1,0
Água (mL) qsp	10	10	10	10	10	10	10	10
Concentração teórica final de CLA ($\mu\text{g/mL}$)	-	16,46	21,96	27,44	-	16,46	21,96	27,44

2.2.1.2 Caracterização físico-química das nanoemulsões

2.2.1.2.1 *Determinação do diâmetro médio, distribuição granulométrica e potencial zeta*

O diâmetro médio, a distribuição granulométrica e potencial zeta das nanoemulsões foram determinados por espectroscopia de correlação fotônica e Anemometria laser Doppler, respectivamente, utilizando um Zetasizer Nano Series (Malvern Instruments, Worcestershire, UK). As medidas foram realizadas a 25°C após diluição apropriada das amostras em água destilada. Cada análise de tamanho durou 120 s e foi obtida com um ângulo de detecção de 173 °. Para determinar o potencial zeta, as amostras foram colocadas em célula eletroforética, onde um potencial de ± 150 mV foi estabelecido. Os valores potenciais foram calculados com a média dos valores da mobilidade eletroforética utilizando a equação de Smoluchowski.

2.2.1.2.2 *Avaliação da morfologia das nanoemulsões*

A morfologia das nanoemulsões foi visualizada por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) utilizando um microscópio JEOL JEM – 1011 – 100 kV (Tóquio, Japão). As análises foram realizadas no Centro de Microscopia Eletrônica da UFSC. Nanoemulsões contendo CLA foram previamente diluídas em água 1:200 (50 μ L de formulação em 10 mL de água). Uma alíquota de cada uma das respectivas amostras foi depositada em grids de cobre (200 mesh) revestidos com filme de carbono e corados com ácido fosfotúngstico 1,0% (m/V). Após 48 horas (tempo para secagem completa das amostras nos grids) as amostras foram visualizadas. Micrografias foram obtidas com aumentos entre 3.000 e 80.0000 vezes.

2.2.2 Preparação e caracterização de hidrogéis contendo as nanoemulsões de CLA

2.2.2.1 Preparação dos hidrogéis

Primeiramente, 10 mL de uma dispersão aquosa de hidroxipropilmetilcelulose 2% (m/V) (2208, viscosidade de 3.200 a 4.800 cPs em solução aquosa 2% m/m, Bayer) e 10 mL de uma dispersão aquosa de hidroxipropilmetilcelulose 2 % (m/V) e quitosana 1% (m/V) (MM 50.000 a 190.000, Sigma-Aldrich, EUA), previamente acidificada com ácido láctico 0,1M, foram preparadas. Após, estas dispersões foram

deixadas em repouso durante 24 horas para o completo intumescimento dos polímeros.

Hidrogéis de HPMC 1% (m/V) contendo as nanoemulsões de CLA foram preparados pela adição dos 10 mL da dispersão aquosa de hidroxipropilmetilcelulose 2% (m/V) a 10 mL de cada uma das formulações de nanoemulsões de CLA a temperatura ambiente sem agitação. Estas formulações foram identificadas como: HT-180, HT-240, HT-300 para os hidrogéis contendo Tween 80 como surfactante nas três diferentes concentrações de CLA utilizadas (180, 240 e 300 μ L) e HS-180, HS-240 e HS-300 para os hidrogéis contendo Solutol HS-15 como surfactante nas três diferentes concentrações de CLA utilizadas (180, 240 e 300 μ L).

Hidrogéis de hidroxipropilmetilcelulose 1% (m/V) e quitosana 0,5% (m/V) (MM 50.000 a 190.000, Sigma-Aldrich, EUA) foram preparados pela adição dos 10 mL da dispersão aquosa de HPMC 2% (m/V) e quitosana 1% (m/V), a 10 mL de cada uma das formulações de nanoemulsões de CLA à temperatura ambiente, sem agitação. Estas formulações foram identificadas como: HQT-180, HQT-240, HQT-300 para os hidrogéis contendo Tween 80 como surfactante nas três diferentes concentrações de CLA utilizadas (180, 240 e 300 μ L) e HQS-180, HQS-240 e HQS-300 para os hidrogéis contendo Solutol HS-15 como surfactante nas três diferentes concentrações de CLA utilizadas (180, 240 e 300 μ L).

Todas as formulações dos hidrogéis contendo as nanoemulsões de CLA foram ajustadas para pH 5,5 com a utilização de uma solução aquosa de trietanolamina 50% (m/m). As concentrações finais obtidas de CLA em 20 mL dos hidrogéis de HPMC 1,0% e de HPMC 1,0% e quitosana 0,5% foram de 8,23; 10,98 e 13,72 μ g/mL, considerando a densidade do CLA de 0,915 g/mL.

Hidrogéis brancos foram preparados da mesma forma descrita anteriormente, porém, a dispersão dos polímeros foi adicionada a formulações que não continham CLA e foram identificados como HT-B e HS-B para os hidrogéis de HPMC 1,0% contendo Tween 80 e Solutol HS-15, respectivamente e HQT-B e HQT-B para os hidrogéis de HPMC 1,0% e quitosana 0,5% contendo Tween 80 e Solutol HS-15, respectivamente.

2.2.2.2 Caracterização dos hidrogéis contendo as nanoemulsões de CLA

2.2.2.2.1 Avaliação da morfologia

A morfologia dos hidrogéis foi visualizada por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) utilizando um microscópio JEOL JEM – 1011 – 100 kV (Tóquio,

Japão). As análises foram realizadas no Centro de Microscopia Eletrônica da UFSC. Hidrogéis contendo nanoemulsões de CLA foram previamente diluídos em água 1:200 (50 µL de formulação em 10 mL de água). Uma alíquota de cada uma das respectivas amostras foi depositada em grids de cobre (200 mesh) revestidos com filme de carbono e corados com ácido fosfotúngstico 1,0% (m/V). Após 48 horas (tempo para secagem completa das amostras nos grids) as amostras foram visualizadas. Micrografias foram obtidas com aumentos entre 3.000 e 80.0000 vezes.

2.2.2.2.2 Avaliação da viscosidade aparente e perfil de escoamento dos hidrogéis contendo CLA nanoemulsionado

A viscosidade das formulações foi determinada mediante a aplicação da seguinte equação que expressa a lei básica da viscosimetria (ANSEL et al., 2000):

$$\sigma = \eta \dot{\gamma}$$

onde:

η = viscosidade dinâmica em Pa.s

σ = tensão de cisalhamento em Pa

$\dot{\gamma}$ = taxa de cisalhamento em s⁻¹

A caracterização reológica dos hidrogéis foi realizada utilizando um viscosímetro rotacional HAAKE, modelo VT 550-PK 10, acoplado ao Software RheoWin Job Manager e RheoWin Data Manager. O sensor escolhido foi o tipo cone/placa PK 1/1°. As amostras foram avaliadas quanto ao comportamento de escoamento e viscosidade utilizando-se amostras de aproximadamente 500 mg, a uma temperatura controlada de 25°C (Termocontrolador DC30). As amostras dos hidrogéis foram submetidas a velocidades de rotação variáveis (faixa de velocidade de cisalhamento empregada entre 0,01 a 80 s⁻¹). Os valores de tensão de cisalhamento e viscosidade, em função do gradiente de cisalhamento, foram avaliados e comparados. A viscosidade aparente dos hidrogéis foi verificada durante 3 meses, e seus respectivos perfis de escoamento foram caracterizados com a aplicação de 3 modelos matemáticos: Lei das Potências, para valores indicativos de índice de fluxo (b), Bingham, para valores indicativos de viscosidade plástica (η_0) e Herschel Bulkley, para valores indicativos de ponto de ruptura ou limite de escoamento (Pa).

2.2.3 Estudos de permeação e retenção cutânea do CLA *in vitro*

2.2.3.1 Avaliação da solubilidade e estabilidade do CLA na solução aceptora

Para a determinação da solubilidade, um excesso de CLA foi adicionado a 10 mL de uma solução de lauril sulfato de sódio 0,1% (m/V) em tampão fosfato pH 7,4 (solução aceptora). A mistura foi mantida sob agitação durante 1 hora a temperatura ambiente e após, submetida à centrifugação a 2500 rpm durante 30 minutos. Uma alíquota do sobrenadante foi então coletada e analisada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) conforme descrito em 2.2.4.1.

Para avaliação da estabilidade, uma solução de CLA 10 µg/mL em lauril sulfato de sódio 0,1% (m/V)/tampão fosfato pH 7,4 foi mantida sob agitação magnética a 37° C ± 1° C durante 10 horas. Duas alíquotas desta solução foram coletadas, no tempo zero e após 10 horas, e analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) conforme descrito em 2.2.4.

2.2.3.2 Estudos de permeação cutânea

Estudos de permeação cutânea CLA foram realizados em modelo bicompartimental de célula de difusão tipo Franz (FRANZ, 1975) com área de interface de 2,54 cm² e volume interno de aproximadamente 10 mL. Foi utilizada pele de orelha suína como modelo de membrana, obedecendo às normas para experimentação animal (GOLDIM, 1995). As orelhas de porco foram obtidas de um abatedouro localizado em Antônio Carlos (Santa Catarina, Brasil), após 2 horas de abate dos animais.

2.2.3.3 Preparação das membranas para difusão

Foram utilizadas orelhas de porco selecionadas e desprovidas de pêlos e danificações teciduais, as quais foram armazenadas em temperatura de aproximadamente - 20°C, após as mesmas serem limpas com água corrente e lentamente descongeladas em temperatura ambiente no momento antecedente do experimento (Figura 11). Depois de descongeladas, as orelhas foram higienizadas com água corrente, com posterior secagem com papel absorvente. Com um bisturi, a pele da orelha foi destacada da cartilagem e, com auxílio de uma pinça, foram removidos restos de vasos sanguíneos e gorduras excedentes, a fim de se obter uma melhor homogeneidade na espessura da pele (em torno de 1 mm). Cortes circulares da pele suína foram colocados na célula de Franz, com auxílio de cola acrílica, na borda contígua à fase aceptora. Estas peles foram utilizadas como interface entre o meio doador e o meio receptor da célula de Franz, sendo que a face interna da pele ficou voltada para o interior da célula. Depois de montadas as células, as peles foram hidratadas com tampão fosfato pH 7,4, *overnight*, sob refrigeração (4 °C).



Figura 11. Fotografia ilustrativa da pele de orelha de porco sendo preparada para estudo de permeação cutânea do ácido linoléico conjugado (CLA).

2.2.3.4 Cinética de permeação

Para o experimento, 500 μL de cada uma das formulações dos hidrogéis contendo as nanoemulsões de CLA foram aplicados sobre a superfície da pele, voltada para o compartimento doador, totalizando uma quantidade de 4,12; 5,49 e 6,86 μg de CLA na superfície da membrana. Uma solução de lauril sulfato de sódio a 0,1 % em tampão fosfato pH 7,4 foi utilizada como meio receptor. O sistema foi mantido sob agitação magnética constante a $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$, por um período de 10 horas. Após o início da cinética de permeação cutânea, alíquotas de 800 μL do meio receptor foram coletadas em diferentes intervalos de tempo: 0, 15 min e 30 min, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8 e 10 horas, para posterior análise e quantificação do CLA por CLAE, conforme metodologia descrita no item 2.2.4. O volume total da fase receptora retirada em cada amostragem foi substituído para manutenção das condições *sink* do sistema. Hidrogéis brancos foram testados utilizando as mesmas condições para serem utilizados como referência na validação do método analítico. Gráficos de quantidade de CLA permeada por área ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) *versus* tempo foram construídos. Os parâmetros de permeação cutânea determinados foram: fluxo ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$), tempo de latência (h) e quantidade total permeada (μg). O fluxo de permeação (J_{ss}) ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$) foi determinado graficamente a partir da inclinação da porção linear da curva, e o tempo de latência (h) foi determinado como sendo o ponto em que a porção reta da curva intersecta o eixo x. O coeficiente de permeabilidade (k_p) foi calculado utilizando a seguinte equação:

$$k_p = \frac{J_{ss}}{C}$$

onde C (μg) é a massa de CLA colocada sobre a membrana no compartimento doador.

2.2.3.5 Estudos de retenção cutânea do CLA

A retenção do CLA nas diferentes camadas da pele foi avaliada utilizando a técnica do *tape-stripping* (ESCOBAR-CHÁVEZ et al., 2008). Ao fim do experimento de permeação, as peles foram retiradas da célula de difusão e o excesso de formulação presente na pele foi delicadamente removido com auxílio de um cotonete e estas foram, posteriormente, secas com papel absorvente. As peles foram fixadas em uma superfície lisa com o estrato córneo (EC) voltado para cima e, em seguida, foram aplicadas 15 fitas adesivas (Cristal 3M - 48mm x 30m) sobre as mesmas, sendo a primeira fita desprezada. Em cada aplicação, um peso de 500 g foi utilizado para manter a pele pressionada por 15 segundos para auxiliar na remoção do EC, a qual pôde ser visualizada pela ausência de brilho na face exposta da pele, no momento em que a epiderme viável foi atingida. As fitas e os tecidos remanescentes foram cortados e transferidos para um balão volumétrico de 25,0 mL e o volume foi completado com acetonitrila. Estas amostras foram mantidas em repouso *overnight* à temperatura ambiente. Após, as amostras foram submetidas a banho de ultra-som por 1 hora e filtradas através de membranas (PVDP, 0,45 µm, Millipore, EUA) para posterior análise por metodologia analítica de CLAE previamente validada, conforme descrito em 2.2.4. Os resultados foram expressos como µg.cm⁻².

2.2.3.6 Análise estatística

Os valores de concentrações de CLA retido na pele e na fita após estudo *in vitro* foram submetidos à análise da variância (ANOVA) usando o programa StatPlus, seguida do teste de Tukey de comparação entre as médias. O valor da diferença mínima significativa entre cada média foi calculado utilizando a seguinte equação:

$$DMS = q \sqrt{\left(\frac{QME}{r}\right)}$$

onde:

QME é o quadrado médio do erro (resíduo) da ANOVA;

r o número de repetições de cada um dos tratamentos;

q é o valor tabelado em função do número de tratamentos e dos graus de liberdade do resíduo.

2.2.4 Desenvolvimento e validação de um método analítico para determinação do CLA nos estudos de permeação e retenção cutânea

2.2.4.1 Condições cromatográficas

As análises foram realizadas em um cromatógrafo Shimadzu LC-10A (Shimadzu, Kyoto, Japão) equipado com bomba LC-10AD, desgaseificador DGU-14A, detector SPD-10AV e sistema controlador SCL-10Avp. Os experimentos foram executados em coluna de fase reversa Phenomenex (Torrance, CA) Luna C18 (150 mm \leftrightarrow 4,6 mm d.i., 5 μ m). O sistema foi operado isocraticamente à 25°C utilizando uma fase móvel constituída de acetonitrila:água (95:5; V/V), filtrada em membrana de 0,45 μ m. O fluxo da fase móvel foi de 1,2 mL/min e o volume de injeção de 50 μ L. A detecção foi realizada por UV a 233 nm. A aquisição dos dados foi realizada utilizando o software CLASS-VP.

O método de cromatografia líquida de alta eficiência foi validado para os hidrogéis contendo o ácido linoléico conjugado nas diferentes camadas da pele, de acordo com os seguintes parâmetros: especificidade, linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão, exatidão e robustez (BRASIL, 2003; ICH 2005).

2.2.4.2 Validação do método analítico

2.2.4.2.1 Especificidade

Soluções obtidas após procedimento de *tape-stripping* para remoção do estrato córneo (EC) e após extração da epiderme/derme (EP + D) em acetonitrila, soluções obtidas após dissolução dos hidrogéis brancos (HT-B, HS-B, HQT-B e HQS-B) 50:50 (V/V) em acetonitrila e em lauril sulfato de sódio 0,1%/tampão fosfato pH 7,4 e a solução de lauril sulfato de sódio 0,1%/tampão fosfato pH 7,4 utilizada como meio acceptor nos estudos de permeação cutânea *in vitro* foram analisados por CLAE conforme metodologia descrita em 2.2.4.1. Para o método ser considerado específico nenhum dos componentes presentes nas formulações e na pele deve eluir no tempo de retenção do fármaco (SHABIR, 2003).

2.2.4.2.2 Linearidade

Para avaliação da linearidade do método, cerca de 0,100 g de CLA foram exatamente pesados em balão volumétrico de 10 mL e o volume completado com acetonitrila. Esta solução foi então diluída em acetonitrila ou lauril sulfato de sódio 0,1 % (m/V) em tampão fosfato pH 7,4 (meio acceptor) para obtenção de soluções padrão

nas concentrações de 0,025; 0,05; 0,25; 0,5; 1,0; 2,5; 5,0 e 10,0 µg/mL. Essas soluções foram analisadas por CLAE conforme condições descritas em 2.2.4.1. Gráficos das áreas absolutas *versus* concentrações foram então construídos, e os respectivos coeficientes de correlação e as equações da reta foram obtidos pelo método dos mínimos quadrados. As análises foram realizadas em triplicata. Três curvas de calibração foram obtidas em três dias diferentes para cada um dos solventes.

2.2.4.2.3 Limites de Detecção e de Quantificação

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados pelas seguintes equações, respectivamente:

$$LD = \frac{DP_i \times 3}{IC} \quad e \quad LQ = \frac{DP_i \times 10}{IC}$$

Onde:

DP_i é o desvio padrão do intercepto com o eixo do Y obtido a partir das três curvas de calibração e IC é a inclinação da curva de calibração.

2.2.4.2.4 Precisão

A precisão do método foi determinada pelos ensaios de repetibilidade (intra-dia) e de precisão intermediária (inter-dia). A repetibilidade foi determinada após análise de seis soluções obtidas após extração do CLA nas amostras de pele (EC e EP + D) e da solução do meio acceptor contendo CLA, após estudo de permeação *in vitro*, no mesmo dia, sob as mesmas condições. Para análise da solução do meio acceptor contendo CLA, uma alíquota de 3 mL do meio acceptor foi coletada após 10 horas do ensaio de permeação e contaminada com uma solução padrão de CLA 10 µg/mL em lauril sulfato de sódio 0,1%/tampão fosfato pH 7,4 afim de obter concentrações de CLA teóricas de 1,0; 2,5 e 5,0 µg/mL. A precisão intermediária foi determinada analisando as mesmas amostras em triplicata, em três dias diferentes.

2.2.4.2.5 Exatidão

A exatidão do método foi avaliada por meio da determinação da recuperação do CLA após contaminação de amostras de diferentes camadas da pele (estrato córneo e epiderme/derme) e do meio acceptor obtido após estudo de permeação *in vitro*.

2.2.4.2.5.1 Recuperação do CLA nas diferentes camadas da pele

Para avaliação da recuperação do CLA, amostras de pele de área de 2,54 cm² foram submetidas à técnica de *tape-stripping* para remoção do estrato córneo (EC), conforme descrito em 2.2.3.5. As fitas adesivas contendo o estrato córneo foram cortadas, transferidas para tubos de ensaio e contaminadas com 100 µL de uma solução padrão de CLA em acetonitrila, apresentando três diferentes concentrações (40, 200 e 400 µg/mL) (Tabela 3). As amostras foram mantidas em repouso para evaporação da acetonitrila, as fitas foram transferidas para um em balão volumétrico de 25,0 mL, e o volume foi completado com o mesmo solvente. Estas amostras foram mantidas em repouso *overnight*, à temperatura ambiente. Após, as amostras foram submetidas a banho de ultra-som por 1 hora e filtradas através de membranas (PVDP, 0,45 µm, Millipore, EUA) para posterior análise por metodologia analítica de CLAE previamente validada, conforme descrito em 2.2.4.1. Os resultados foram expressos em µg/mL.

Após a remoção do estrato córneo, as pele foram cortadas e transferidas para tubos de ensaio. A estes tubos foram adicionados 100 µL de uma solução padrão de CLA em acetonitrila, em três diferentes concentrações (40, 200 e 400 µg/mL) (Tabela 3). Após a evaporação da acetonitrila, os corte de pele foram transferidos para um balão volumétrico de 25,0 mL e o volume foi completado com o mesmo solvente. Estas amostras foram mantidas em repouso *overnight*, à temperatura ambiente. Após, as amostras foram submetidas a banho de ultra-som por 1 hora e filtradas através de membranas (PVDP, 0,45 µm, Millipore, EUA) para posterior análise por metodologia analítica de CLAE previamente validada, conforme descrito em 2.2.4.1. Os resultados foram expressos em µg/mL. Todas as análises foram realizadas em triplicata e foi considerado que não havia nenhum vestígio de CLA nas peles utilizadas.

Tabela 3. Quantidades de solução padrão de CLA em acetonitrila adicionadas nas fitas adesivas contendo o EC e na pele sem o EC para estudo de recuperação do CLA.

	Solução Padrão (µg/mL)	Volume adicionado (µL)	Quantidade teórica adicionada (µg)	Concentração teórica final (µg/mL)
CLA	40	100	4	0,16
	200	100	20	0,8
	400	100	40	1,6

2.2.4.2.5.2 Recuperação do CLA no meio acceptor

Para avaliação da recuperação do CLA nos estudos de permeação *in vitro*, uma alíquota de 3 mL do meio acceptor foi coletada após 10 horas do ensaio de permeação e contaminada com uma solução padrão de 10 µg/mL de CLA em lauril sulfato de sódio 0,1%/tampão fosfato pH 7,4 afim de obter concentrações de CLA teóricas de 1,0; 2,5 e 5,0 µg/mL. As amostras foram analisadas por CLAE conforme descrito em 2.2.4.1. A exatidão foi calculada como a porcentagem de fármaco recuperada em cada amostra. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

2.2.4.2.6 Robustez

A robustez do método analítico avaliada após contaminação dos hidrogéis brancos (HQT-B e HQS-B) com uma solução estoque de CLA a 10,0 µg/mL em acetoneitrila, de modo que a sua concentração final foi de 0,25 µg/mL. As amostras foram analisadas por CLAE conforme os parâmetros mostrados na Tabela 4. Os resultados foram avaliados quanto à concentração de CLA, tempo de retenção e simetria dos picos.

Tabela 4. Parâmetros de robustez avaliados na validação do método por cromatografia líquida de alta eficiência.

Parâmetro	Nível Inferior	Nível Superior
Fluxo (mL/min)	1,0	1,3
Comprimento de onda (λ)	231	235

2.2.5 Análise termogravimétrica (TGA) e Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

As análises termogravimétricas da pele e do CLA foram realizadas em termobalança TGA-50 (Shimadzu) sob atmosfera dinâmica de nitrogênio com fluxo de 50 mL/min. Cerca de 5 mg de cada amostra foram colocados em cadinhos de platina e submetidos ao aquecimento numa razão de 10 °C/min até 900 °C.

A avaliação das interações do CLA com os componentes da pele foi realizada pela técnica de calorimetria exploratória diferencial (DSC) utilizando um equipamento DSC-60 da Shimadzu (Shimadzu, Kyoto, Japão). Após os ensaios de permeação cutânea, as peles foram removidas das células de difusão e cortadas. Em seguida, cerca de 8 mg de pele contendo o CLA foram pesados e colocados em recipientes de alumínio hermeticamente fechados, os quais foram submetidos ao aquecimento até

120°C, numa razão de 10°C/min, sob atmosfera de nitrogênio. Uma panela de alumínio vazia lacrada foi utilizada como referência. Para visualização do evento térmico do CLA, as amostras foram previamente congeladas com nitrogênio líquido e analisadas a partir de -80° até 120° C, numa razão de aquecimento de 5°C/min. Termogramas foram obtidos a partir do CLA, pele sem tratamento, e pele submetida ao ensaio de permeação usando as diferentes formulações (HOELLE, SPERGER, VALENTA, 2009). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

2.2.6 Análise histológica da pele após estudos de permeação

Após os ensaios de permeação cutânea, as peles foram removidas das células de difusão, foram limpas e colocadas em tubo cônico tipo falcon contendo 5 mL de paraformaldeído (PFA) 4 % por 24 horas. Após, as mesmas foram mantidas em álcool 70% até o momento do processamento de inclusão. Para a inclusão, os cortes de pele foram colocados em cassetes com identificação. Cada cassete foi mergulhado em álcool 70, 80, 90 e 100 % consecutivamente durante 30 minutos. Posteriormente, os cassetes foram colocados em banho de Xilol, por três vezes consecutivas, durante 30 minutos cada e, em seguida, colocados em banho de parafina onde permaneceram por 3 horas. As amostras foram emblocadas em parafina, cortadas em fatias com espessura de 3 µm, utilizando um Micrótomo e depositadas sobre lâminas de vidro. Para a coloração, as lâminas foram colocadas em estufa até o derretimento da parafina, submetidas a 3 banhos de xilol, 3 banhos de álcool e 1 banho de água destilada, para hidratação das amostras. Decorridas estas etapas, as lâminas foram mergulhadas na solução de hematoxilina por 5 minutos e em seguida submetidas a mais 3 banhos de água destilada, 2 banhos de água amoniacal e então mergulhadas na solução de eosina, por 5 minutos. As lâminas foram submetidas a mais 2 banhos de água destilada, 3 banhos de álcool e 3 banhos de xilol. As amostras foram visualizadas microscópio óptico (Nikon) em aumento de 20x e fotografias foram obtidas com auxílio de câmera digital DS-5M-L1 (Nikon, Melville, NY, USA) acoplada ao microscópio.

3.1 Preparação e caracterização das nanoemulsões de ácido linoléico conjugado (CLA)

Neste trabalho, a técnica de emulsificação espontânea foi empregada na preparação das nanoemulsões. Esta técnica se baseia na adição de uma solução orgânica de um solvente miscível com a água contendo o óleo e um surfactante lipofílico em uma solução aquosa contendo um surfactante hidrofílico. Uma turbulência interfacial é gerada (efeito Maragoni) pela rápida difusão do solvente na água, resultando na formação espontânea de gotículas de tamanho submicrométrico. Diversos são os fatores que afetam as características finais das dispersões coloidais, incluindo tipo e concentração do óleo, tipo e concentração dos surfactantes empregados e relação de volume de fase orgânica e fase aquosa (ALMEIDA, TEIXEIRA, KOESTER, 2008). Para obter formulações com propriedades físico-químicas adequadas, Solutol HS15, Tween 80 e Pluronic F68 foram inicialmente testados em diferentes concentrações. As concentrações que mais se adequaram às formulações foram de 1,0% (m/V) para o Solutol HS15 e 0,4% (m/V) para o Tween 80. As formulações contendo Pluronic F68 (copolímero de polioxietileno – polioxipropileno) foram descartadas em razão da incompatibilidade com os polímeros utilizados para a formação dos hidrogéis, apresentando formação de grumos. Todas as formulações foram preparadas usando lecitina de soja 0,125 % (m/V) (Lipoid S100) como surfactante lipofílico. Com o intuito de verificar o efeito da concentração do óleo sobre a sua permeação através da pele, três diferentes quantidades foram adicionadas à formulação: 180, 240 e 300 μL .

As nanoemulsões preparadas com Tween 80 0,4% (m/V) como surfactante exibiram aspecto mais leitoso do que aquelas preparadas com Solutol HS15 1% (m/V). Esta característica também foi observada por Dora et al. (2011) para nanoemulsões preparadas pela técnica da difusão do solvente a quente, usando óleo de rícino como fase oleosa e com Solutol 1% (m/V) como surfactante. Nessa concentração de Solutol HS15, os autores indicaram a obtenção de sistemas isotrópicos e transparentes característicos das microemulsões, com tamanho de gota de cerca de 20 nm. No nosso caso, este aspecto pode ser vantajoso para sistemas emulsionados de uso tópico, pois o tamanho reduzido da gotícula poderia promover a penetração do CLA na pele (SHAKEEL et al., 2007).

3.1.1 Determinação do tamanho e potencial zeta

A Tabela 5 demonstra as características de tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta dos sistemas nanoemulsionados obtidos a partir das diferentes formulações.

Tabela 5. Características de tamanho e potencial zeta dos sistemas nanoemulsionados (média \pm DP; $n = 3$).

CLA (μ L)	Tween 80 0,4% (m/V)			Solutol 1,0% (m/V)		
	Diâmetro (nm)	IP*	Potencial Zeta (mV)	Diâmetro (nm)	IP*	Potencial Zeta (mV)
180	101,34 \pm	0,18 \pm	- 34,40 \pm	51,07 \pm	0,15 \pm	- 24,23 \pm
	4,96	0,02	0,50	2,68	0,02	4,87
240	137,90 \pm	0,13 \pm	- 36,51 \pm	54,00 \pm	0,01 \pm	- 28,76 \pm
	1,93	0,01	2,79	2,64	0,02	4,86
300	147,60 \pm	0,19 \pm	- 39,30 \pm	86,75 \pm	0,15 \pm	- 36,66 \pm
	6,48	0,04	1,40	14,4	0,10	5,84

*Índice de polidispersão.

Como é possível visualizar, nanoemulsões apresentando diâmetro médio de gotícula situados entre 101,34 a 147,60 nm, para aquelas preparadas com Tween 80 0,4 % (m/V), e entre 51,07 a 86,75 nm, para aquelas preparadas com Solutol HS15 1,0% (m/V), foram obtidas. O índice de polidispersão (IP), outra propriedade analisada juntamente com o diâmetro médio de gotícula, analisa a homogeneidade na distribuição dos tamanhos. Os valores de IP obtidos indicam formação de dispersões coloidais monodispersas, desde que para todas as formulações testadas, esses valores ficaram abaixo de 0,3. O tamanho reduzido das nanoemulsões preparadas com Solutol HS15 explica, portanto, a aparência mais translúcida dessas preparações. Além disso, é possível verificar que o aumento da quantidade de CLA provocou o aumento do tamanho das gotículas (KIM, WON, LEE, 2008; SAKEENA, et al., 2011).

A maioria das partículas dispersas em um sistema aquoso adquire uma carga superficial decorrente da ionização dos grupamentos presentes na superfície, ou adsorção de espécies carregadas. Estas cargas de superfície modificam a distribuição dos íons circundantes, resultando numa camada ao redor da partícula. O potencial zeta é medido pela aplicação de um campo elétrico através da dispersão; as partículas migram em direção ao eletrodo de carga oposta com uma velocidade proporcional à

sua magnitude. Esta velocidade é medida utilizando a técnica de anemometria laser Doppler (www.malvern.com). Desde modo, o potencial zeta é um parâmetro fundamental para a caracterização das nanoemulsões, podendo fornecer informações sobre a estabilidade do sistema.

As análises de potencial zeta indicaram a obtenção de partículas com carga negativa, com valores variando entre -24 e -39 mV, sendo que estes valores diminuíram com o aumento da quantidade de CLA adicionado às formulações e foram mais reduzidos quando o Solutol HS15 foi usado como surfactante (Tabela 5). A carga de superfície das partículas é resultante de uma complexa contribuição de vários fatores, incluindo o grau de dissociação de grupos funcionais na superfície da partícula e da adsorção de espécies iônicas presentes na solução (SCHAFFAZICK et al., 2003). Assim, considerando que todas as formulações tiveram pH ajustado a 5,5 e que a concentração de lecitina foi mantida constante, os resultados sugerem que o aumento do potencial zeta com o aumento da quantidade de CLA ocorreu devido a uma maior densidade de cargas proveniente da dissociação dos grupamentos ácidos na superfície das gotículas (relacionado à porcentagem de ácidos graxos livres do LUTA-CLA). Ambos os surfactantes empregados na fase aquosa são de natureza não-iônica, entretanto, o Solutol HS15 usado na concentração de 1,0% (m/V) pareceu ser mais efetivo na neutralização da carga superficial das gotículas. Dora e colaboradores (2011) demonstraram que nanoemulsões de óleo de rícino estabilizadas com Solutol HS15 1% (m/V) apresentam potencial zeta próximo da neutralidade e que um efeito estérico foi responsável pela estabilização das dispersões. Tendo em vista que o óleo de rícino é constituído principalmente por triglicerídeos do ácido ricinoléico (70-77%), esse resultado corrobora com a premissa de que a contribuição da ionização dos grupos carboxílicos do CLA na superfície das gotículas foi preponderante para a carga final das dispersões. Os valores obtidos evidenciaram que a repulsão eletrostática foi responsável pela estabilização das nanoemulsões.

3.2.2 Avaliação da morfologia das nanoemulsões

As fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de transmissão (MET), conforme descrito no item 2.2.2.2.1, podem ser visualizadas na Figura 12. Como pode ser observado, as nanoemulsões preparadas a partir do Tween 80 apresentaram formato mais esférico que aquelas obtidas usando o Solutol HS15. Entretanto, o tamanho das gotículas parece ser menor que aqueles obtidos nas análises por espectroscopia de correlação fotônica. Este dado pode ser atribuído à visualização de apenas uma população de partículas no MET. Além disso, as fotomicrografias obtidas a partir das nanoemulsões preparadas com Tween 80 mostram algumas estruturas

semelhantes a uma cápsula, em que os componentes das gotas apresentam certo grau de separação. Entretanto, estudos mais aprofundados de microscopia eletrônica necessitariam ser realizados para elucidar completamente a estrutura interna das nanoemulsões.

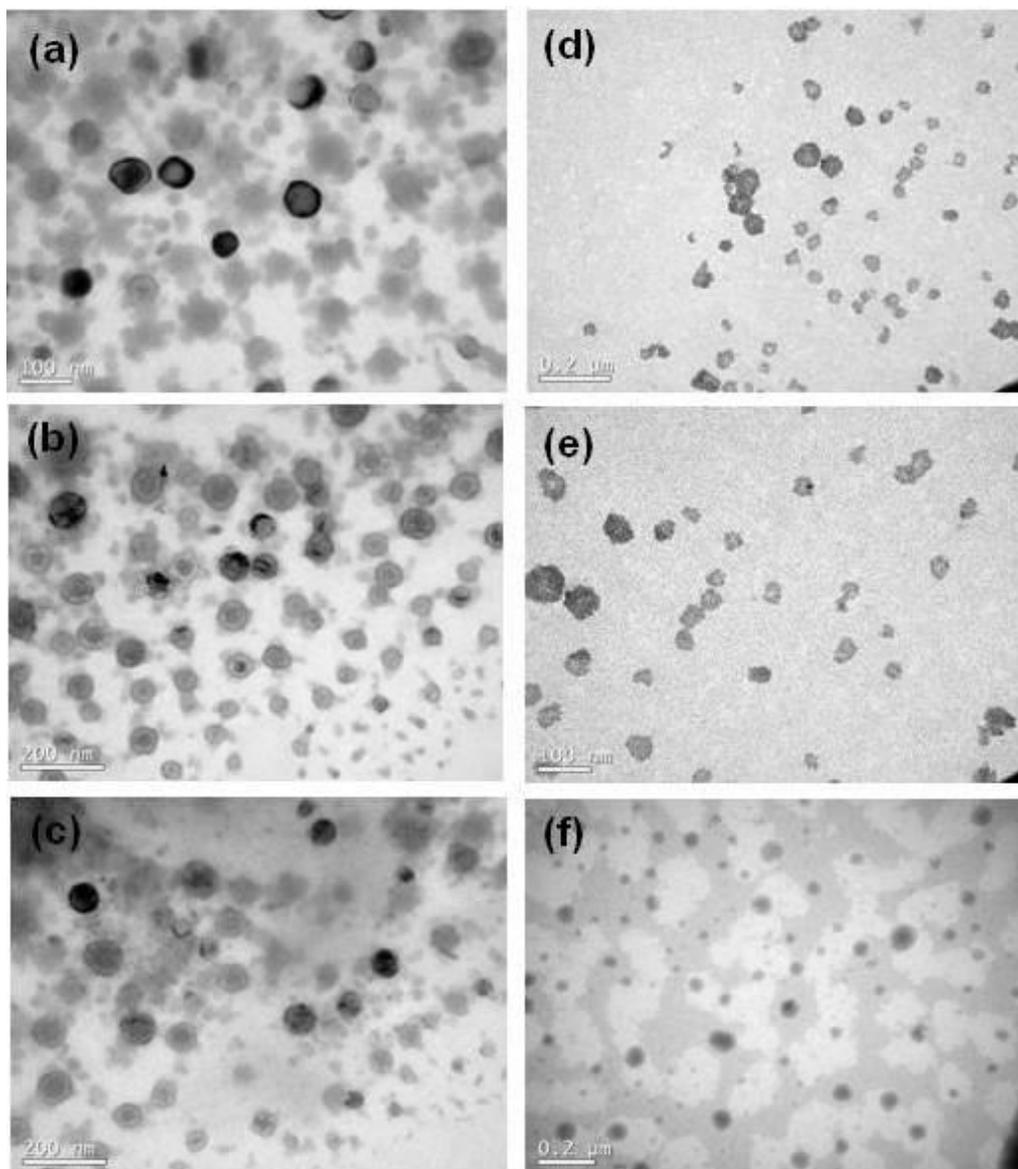


Figura 12. Fotomicrografias obtidas por MET dos sistemas nanoemulsionados de CLA. As micrografias (a), (b) e (c) correspondem às nanoemulsões preparadas com Tween 80 0,4% (m/V), com 180, 240 e 300 μ L de CLA, respectivamente (T-180, T-240 e T-300). As micrografias (d), (e) e (f) correspondem às nanoemulsões preparadas com Solutol HS-15 1,0% (m/V), com 180, 240 e 300 μ L de CLA, respectivamente (S-180, S-240 e S-300).

3.3 Preparação e caracterização dos hidrogéis contendo as nanoemulsões de CLA

3.3.1 Preparação dos hidrogéis

Com o intuito de aumentar a viscosidade das nanoemulsões visando a aplicação tópica cutânea, hidrogéis contendo as nanoemulsões de CLA foram preparados. Atualmente há vários polímeros que são utilizados para aumentar a viscosidade de nanoemulsões. Os derivados de celulose têm sido extensivamente utilizados nas últimas décadas, principalmente pela potencial aplicação em diferentes áreas devido a sua biodegradabilidade, solubilidade em água e capacidade de formação de filmes (ZACCARON et al., 2005). O hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) é um polímero hidrofílico não-iônico, composto de unidades de $\beta(1\rightarrow4)$ -D-glicose ligadas por ligações glicosídicas. O HPMC tem sido utilizado como matriz para liberação controlada de fármacos (BAUMGARTNER et al., 2000) e apresenta a possibilidade de formar gel em meio aquoso (VUEBA et al., 2004). Outras aplicações como agentes removedores de tintas, adesivos, colas, cosméticos, revestimentos, na agricultura e em produtos têxteis, tem sido atribuídas ao HPMC (PEKEL et al., 2004).

Outro polímero que tem sido bastante estudado para a preparação de géis de uso tópico é a quitosana. Trata-se de um aminopolissacarídeo linear composto de unidades de D-glucosamina e N-acetil-D-glucosamina randomicamente distribuídas, obtida pela desacetilação da quitina, o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza depois da celulose, encontrado no exoesqueleto de crustáceos como camarões e caranguejos (KUMAR, 2000). O emprego da quitosana e a pesquisa por novas aplicações têm aumentado exponencialmente em diversas áreas, especialmente na indústria farmacêutica, no desenvolvimento de cosméticos e biomateriais, tais como géis, filmes e membranas poliméricas. A quitosana e seus derivados, como por exemplo a *N*-trimetilquitosana, têm mostrado ser capazes de agir como promotores de permeação de macromoléculas e compostos hidrofílicos, resultando em maior absorção destes agentes pela epiderme ou mucosas (COSTA SILVA, DOS SANTOS, FERREIRA, 2006).

Neste contexto, a hidroxipropilmetilcelulose foi selecionada para a preparação dos hidrogéis na concentração de 1,0% (m/V), sendo as formulações preparadas com Tween 80 e Solutol HS15, denominadas HT e HS, respectivamente. A quitosana em solução aquosa de ácido láctico 0,1M foi incorporada juntamente com os hidrogéis de HPMC, com o objetivo de avaliar o seu potencial como agente promotor de absorção (SILVA, SANTOS, FERREIRA, 2006). Assim, o segundo tipo de hidrogel constituía de

HPMC 1,0% (m/V), e quitosana 0,5% (m/V), sendo as formulações preparadas com Tween 80 e Solutol HS15, denominadas HQT e HQS, respectivamente. Todos os hidrogéis foram ajustados para pH 5,5 com a utilização de uma solução aquosa de trietanolamina 50% (m/m). A figura 13 mostra os aspectos macroscópicos dos hidrogéis obtidos a partir das nanoemulsões de CLA. Como é possível visualizar, com exceção dos hidrogéis de HPMC preparados a partir das nanoemulsões estabilizadas com Solutol HS15, todos os outros hidrogéis exibiram aspecto leitoso e homogêneo, sendo que o aumento na concentração do CLA aumentou o diâmetro das gotículas a opalescência das preparações.

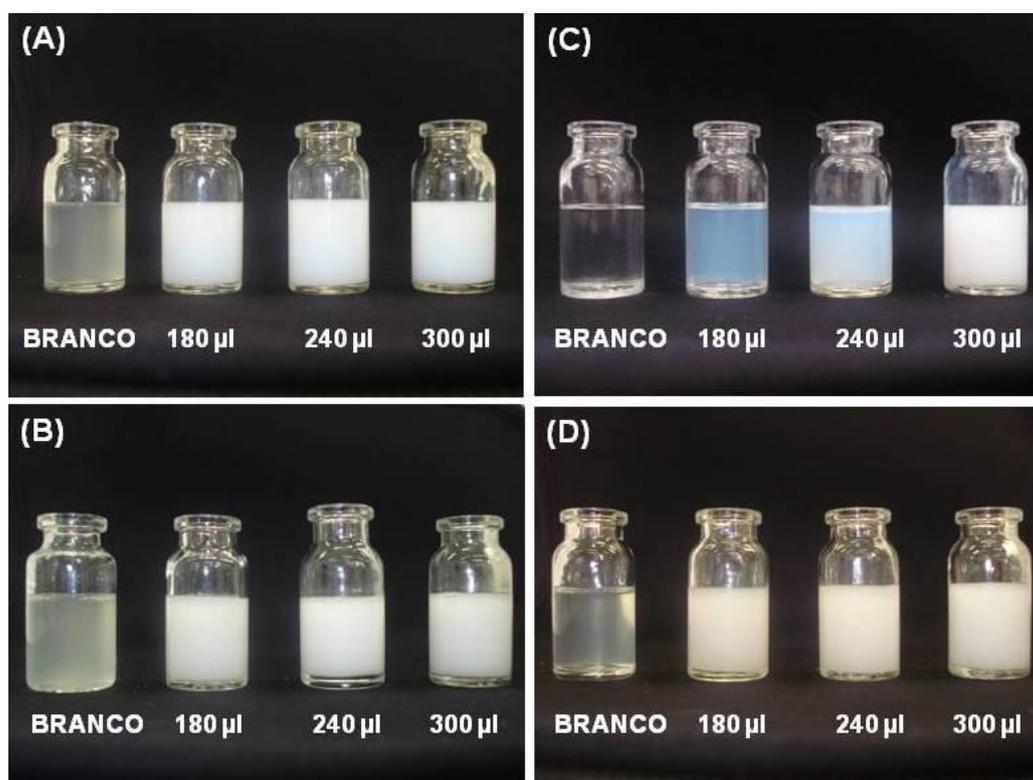


Figura 13. Hidrogéis obtidos a partir dos sistemas nanoemulsionados de CLA. (A e B) hidrogéis de HPMC (HT-B, HT-180, HT-240 e HT-300) e de HPMC e quitosana (HQT-B, HQT-180, HQT-240 e HQT-300), contendo nanoemulsões de CLA estabilizadas com Tween 80 0,4% (m/V), respectivamente. (C e D) hidrogéis de HPMC (HS-B, HS-180, HS-240 e HS-300) e HPMC com quitosana (HQS-B, HQS-180, HQS-240 e HQS-300), contendo nanoemulsões de CLA estabilizadas com Solutol HS15 1,0% (m/V), respectivamente.

3.3.2 Avaliação da morfologia dos hidrogéis

As fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de transmissão (MET) conforme descrito no item 2.2.2.2.1, podem ser visualizadas na Figura 14. A presença das gotículas dispersas na matriz polimérica de HPMC e quitosana pode ser

observada em todas as amostras analisadas. É possível visualizar que todos os hidrogéis exibiram estruturas nanométricas de formato esférico.

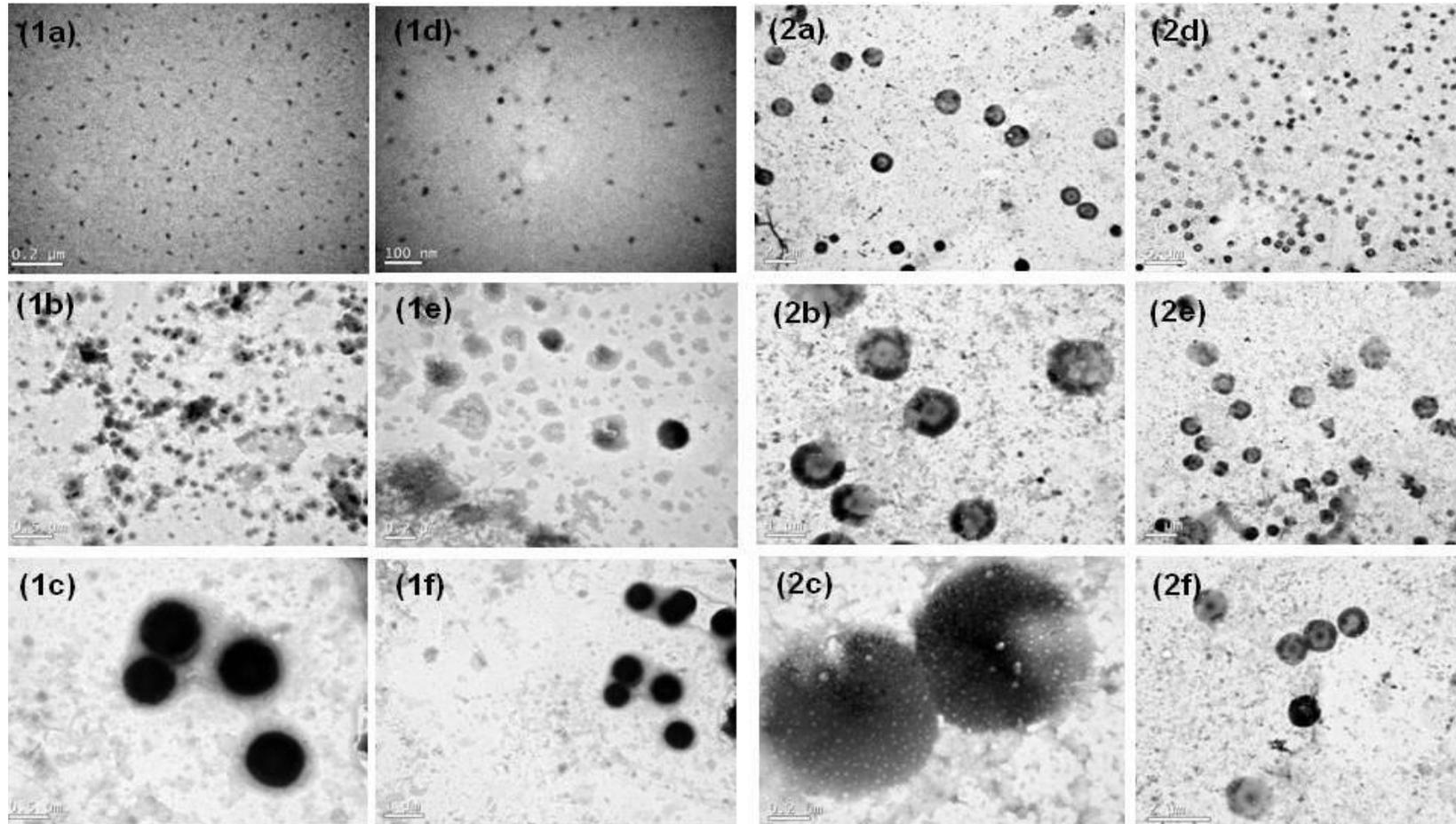


Figura 14. Fotomicrografias obtidas por MET dos hidrogéis contendo as nanoemulsões de CLA. O número 1 se refere aos hidrogéis contendo somente HPMC 1,0% (m/V). O número 2 se refere aos hidrogéis contendo HPMC 1,0% (m/V) e quitosana 0,5% (m/V). 1a, 1b, 1c se referem às formulações HT-180, HT-240 e HT-300, respectivamente. 1d, 1e, 1f se referem às formulações HS-180, HS-240 e HS-300, respectivamente. 2a, 2b, 2c se referem às formulações HQT-180, HQT-240 e HQT-300, respectivamente. 2d, 2e, 2f se referem às formulações HQS-180, HQS-240 e HQS-300, respectivamente.

3.3.3 Avaliação da viscosidade e perfil de escoamento dos hidrogéis contendo CLA nanoemulsionado

Estudos sobre a reologia de formulações farmacêuticas de uso tópico têm se tornado cada vez mais freqüentes em pesquisas realizadas pela comunidade científica, uma vez que a reometria pode representar uma importante ferramenta para a obtenção de informações quanto à caracterização, à aceitabilidade e ao desempenho de um produto durante a aplicação, assim como é útil também na avaliação da estabilidade. Estudos reológicos caracterizam as manifestações das forças que ocorrem no sistema, podendo ser relacionadas a processos como floculação, sedimentação, cremagem e coalescência (TADROS, 2004; CORRÊA et al., 2005).

A viscosidade aparente (viscosidade em uma determinada taxa de deformação) é um parâmetro reológico que indica a resistência de um determinado material em fluir, determinada pela taxa de deformação sob uma determinada tensão de cisalhamento empregada. De um modo geral está associada à consistência do material, sendo este aspecto importante tanto no aspecto sensorial e de aplicação da formulação, como também está relacionado com a capacidade do material em se manter estável frente a variações ambientais, como a temperatura e o deslocamento (REBELLO, 2005). As formulações que possuem partículas assimétricas, como a maioria dos produtos cosméticos e farmacêuticos, apresenta fluxo não-Newtoniano, ou seja, em que a viscosidade depende da tensão de cisalhamento, sendo este representado por três tipos principais de perfil de escoamento: plástico, pseudoplástico e dilatante (ANSEL et al., 2000).

De acordo com a equação que expressa a lei básica da viscosimetria (item 2.2.2.2.2) nota-se que η é a constante de proporcionalidade da equação, sendo este o único parâmetro que caracteriza os dados. Um fluido que demonstrar qualquer desvio deste comportamento a uma temperatura constante é não-Newtoniano (BARNES HUTTON, WALTERS, 1993; SCHRAMM, 2006). Para adaptar os dados de viscosidade de fluídos não-Newtonianos medidos às situações práticas como agitação, fluxo em tubos, bombeamento, sedimentação e espalhamento, são usados modelos matemáticos que descrevam o comportamento de fluxo. Alguns dos diversos modelos disponíveis são: Ostwald, Herschel-Bulkley, Ellis e Bingham (STEFF, 1996; BOLMSTEDT, 2000). Neste trabalho, a viscosidade aparente dos hidrogéis desenvolvidos foi verificada logo após a preparação e durante 3 meses seguintes (armazenados sob refrigeração, $\pm 4^{\circ}\text{C}$). Os respectivos perfis de escoamento foram caracterizados diante a primeira medida de viscosidade aparente, com a aplicação de

3 modelos matemáticos: Lei das Potências para valores indicativos de índice de fluxo (b), Bingham para valores indicativos de viscosidade plástica (η_0) e Herschel Bulkley, para valores indicativos de ponto de ruptura (Pa).

A tensão mínima para início de fluxo viscoso é conhecida como ponto de ruptura (Pa) e se refere à tensão de cisalhamento crítica necessária para iniciar o escoamento, fluindo então após este ponto (SCHRAMM, 2006). Já a medida da dependência da viscosidade em função da taxa de cisalhamento é avaliada por meio do índice de fluxo (b) (AULTON, 2005). Segundo a Lei das Potências, o índice de fluxo ou de escoamento caracteriza o desvio de um fluido em relação ao comportamento newtoniano. Fluidos pseudo-plásticos apresentam um valor de b situado abaixo de 1, os plásticos, próximo de 1 e os dilatantes, acima de 1. A viscosidade plástica (η_0) descreve as características de fluxo depois de iniciado, e é influenciada pela presença de materiais cerosos ou outros doadores de viscosidade (CORRÊA et al., 2005).

Os resultados obtidos após avaliação do comportamento reológico dos hidrogéis contendo as nanoemulsões de CLA são apresentados na Figura 15 e na Tabela 6.

Tabela 6. Resultados obtidos na avaliação do comportamento reológico dos hidrogéis contendo as nanoemulsões de CLA, obtidos a 25 °C.

HIDROGÉIS	TIXOTROPIA (-) (Pa/s)	ÍNDICE DE FLUXO (b)	PONTO DE RUPTURA (τ_0)	VISCOSIDADE PLÁSTICA (η_0)	VISCOSIDADE APARENTE (η)
HT-B	153,3	- 0,1817	2,873	0,2303	247,0
HT-180	124,2	- 0,5830	2,220	0,2262	239,8
HT-240	105,6	- 0,4100	1,001	0,2333	219,0
HT-300	108,8	- 0,4385	1,165	0,2115	228,0
HS-B	110,7	-0,3224	1,523	0,1924	247,0
HS-180	135,8	- 0,0599	2,700	0,2180	219,9
HS-240	133,9	- 0,7079	2,480	0,1948	218,7
HS-300	110,9	- 0,5000	1,059	0,1889	239,8
HQT-B	44,17	- 0,1446	3,631	0,3810	483,0
HQT-180	58,5	- 0,4876	3,706	0,3633	348,8
HQT-240	54,2	- 0,3422	5,220	0,4649	414,2
HQT-300	49,1	- 0,4398	5,221	0,3834	305,2
HQS-B	49,3	-0,3312	3,486	0,4059	483,0
HQS-180	42,4	- 0,3265	3,480	0,3259	479,6
HQS-240	50,1	- 0,6005	4,400	0,3033	523,2
HQS-300	39,9	- 0,0936	3,740	0,2941	436,0

Foi possível verificar que a inclusão da quitosana tornou a base dos hidrogéis mais viscosa. É possível perceber também que estas formulações apresentaram maiores valores de viscosidade plástica (η_0), ou seja, tem maior caráter plástico, sendo confirmadas por apresentar maiores valores de ponto de ruptura (Pa) quando comparadas as formulações contendo apenas HPMC (Tabela 6), ou seja, por serem mais viscosas apresentam uma dificuldade maior de escoamento.

Del Blanco e colaboradores (1999) estudaram a capacidade de quitosanas com diferentes graus de desacetilação como agentes emulsificantes e como doadores de viscosidade. Os autores avaliaram formulações com diferentes concentrações e concluíram que formulações contendo 1% de quitosana, utilizada como único agente doador de consistência e emulsificante, é capaz de proporcionar emulsões estáveis, de gotículas esféricas, homogêneas e viscosas. Este polieletrólito é capaz de estabilizar as gotículas em função da formação de uma película viscoelástica, sendo capaz de manter as gotículas da fase interna com menor mobilidade, e também, por

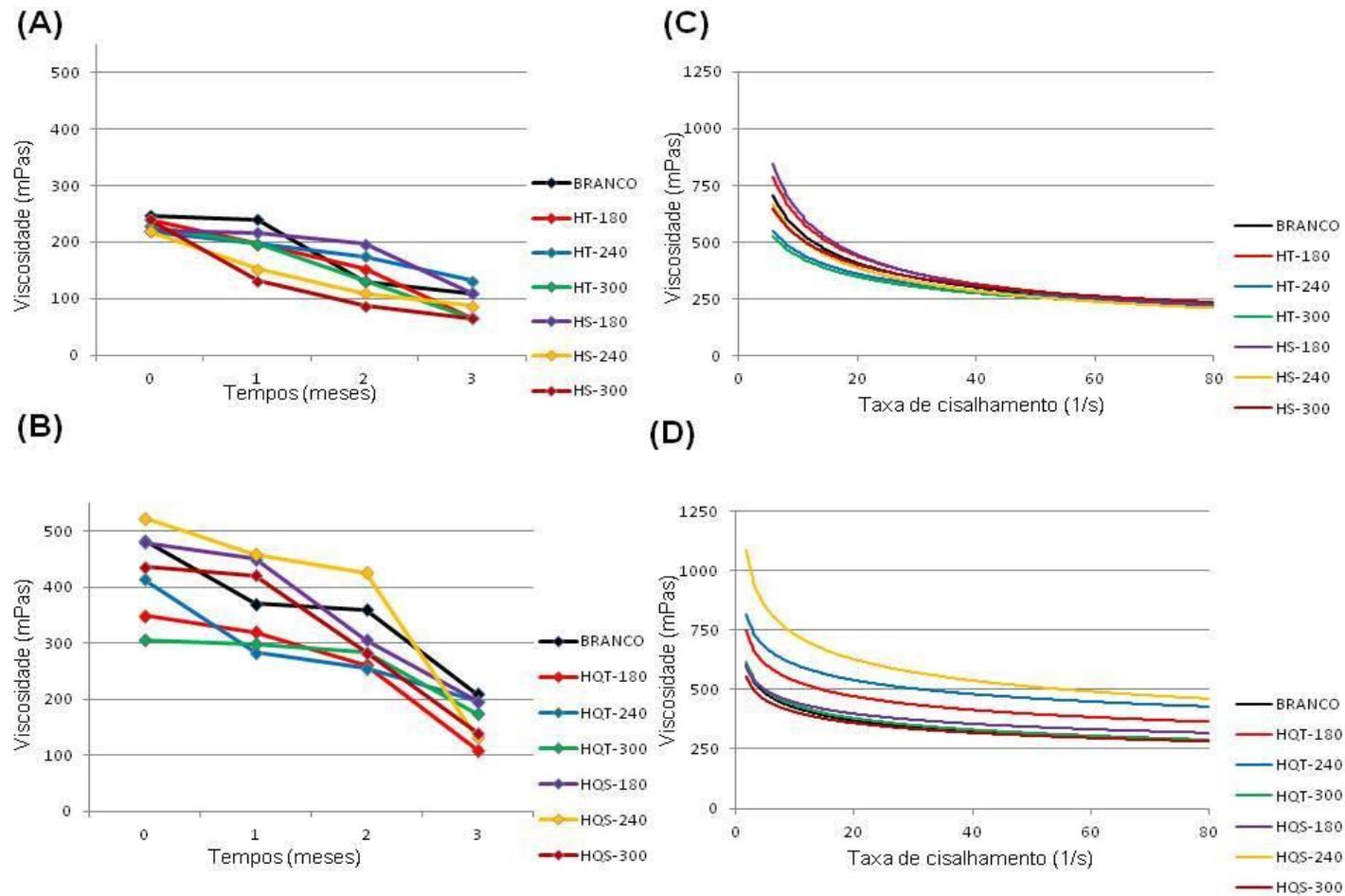


Figura 15. Avaliação da viscosidade dos hidrogéis em função do tempo de armazenamento e perfil de escoamento: (A) e (B) viscosidade em dos hidrogéis de HPMC 1,0% (m/V) e de HPMC 1,0% (m/V) com quitosana 0,5% (m/V), respectivamente. (C) e (D) perfil de escoamento dos hidrogéis de HPMC 1,0% (m/V) e de HPMC 1,0% (m/V) com quitosana 0,5% (m/V), respectivamente.

ser um polímero carregado, pelo mecanismo eletro-estérico (RODRÍGUEZ, ALBERTENGO, AGULLÓ, 2002). Através da análise do potencial zeta dos hidrogéis (dados não mostrados) foi possível perceber que todas as formulações contendo HPMC e quitosana apresentaram carga superficial positiva, diferente daquelas contendo apenas HPMC, que exibiram valores negativos. Este resultado indica que houve uma adsorção preferencial da quitosana na superfície das gotículas por meio de interações eletrostáticas com o CLA, resultando na inversão da carga superficial.

Durante o período de 3 meses de armazenamento das formulações foi observado um declínio nos valores de viscosidade para todos os hidrogéis (Figura 15). Ou seja, com o tempo, o grau de fricção molecular entre a rede formada pelos polímeros diminuiu, provavelmente devido a uma menor interação de seus componentes (CORRÊA et al., 2005).

Todas as formulações analisadas apresentaram comportamento tixotrópico negativo ou antitixotropia, ou seja, a viscosidade da curva ascendente foi menor que a da descendente. Esta ocorrência pode ser explicada como resultado do aumento da frequência de colisão das partículas dispersas ou das moléculas do polímero em suspensão, resultando no aumento da ligação interparticular com o tempo (MARTIN, 1993). De acordo com Martin (1993), isso não deve ser confundido com o fluxo dilatante ou reopexia, pois geralmente estes sistemas apresentam grande quantidade de sólidos dispersos (acima de 50%).

A tixotropia é uma variável da viscosidade dependente do tempo. Este parâmetro fornece informações da capacidade e do tempo necessário para o produto retornar à sua estrutura após a retirada da tensão. O grau de tixotropia é avaliado pela área resultante entre a curva ascendente e descendente do reograma, denominada histerese (MARTIN, 1993; TADROS, 2004). O produto tixotrópico tende a ter maior vida de prateleira (*shelf-life*), pois durante o armazenamento, este apresenta viscosidade constante, o que dificulta a separação dos constituintes da formulação (MARTIN, 1993). Além dessa vantagem, a obtenção de formulações de uso tópico com caráter tixotrópico é bastante almejada, pois elas se deformam durante a aplicação, ou seja, tornando-se mais fluídas facilitam o espalhamento e recuperam a viscosidade inicial no momento que se encerra a aplicação, o que evita que o produto escorra. No entanto, formulações com altos graus de tixotropia podem também estar relacionadas a fatores de desestabilização das emulsões. É interessante a obtenção de um valor de tixotropia não muito elevado para que o produto não escoe sobre a pele após aplicação devido a uma recuperação muito lenta da sua estrutura e também de um valor não muito baixo, pois isso pode acarretar em baixa espalhabilidade do produto dificultando a distribuição uniforme sobre a pele (GASPAR & MAIA CAMPOS, 2003).

É possível perceber que os valores de tixotropia maiores foram obtidos para os hidrogéis contendo apenas HPMC e menores para aqueles contendo HPMC e quitosana. Este resultado pode ser atribuído às características viscoelásticas da quitosana (TORRES, 2001).

De acordo com o perfil de escoamento dos hidrogéis, observa-se que a viscosidade diminui com o aumento do gradiente de cisalhamento (Figura 15) categorizando todos os hidrogéis como pseudoplásticos. Este perfil foi confirmado pelo valor de índice de fluxo (Tabela 6). O comportamento pseudoplástico é freqüente em formulações que contém gomas (naturais ou sintéticas) e polímeros (YASAR, TOGRUL, ARSLAN, 2007). De acordo com Wood (2001), o comportamento pseudoplástico ocorre em soluções de polímeros e, na maioria dos sistemas semi-sólidos que contenham componentes poliméricos, em consequência da existência de interações intermoleculares entre as cadeias poliméricas. Como verificado, não houve relação entre os valores numéricos de índice de fluxo (b) e viscosidade aparente (η) das nanoemulsões de CLA nos hidrogéis, sugerindo que este tipo comportamento esteja relacionado com a presença dos componentes poliméricos.

3.4 Estudos de permeação e retenção cutânea do CLA *in vitro*

3.4.1 Avaliação da solubilidade e estabilidade do CLA na solução acceptora

Estudos de liberação e permeação cutânea de fármaco a partir de formas farmacêuticas semissólidas requerem a utilização de condições *sink*, que é definida como uma situação de diluição infinita, onde não há saturação do fármaco no meio acceptor. Para os estudos de liberação tem-se estipulado que a concentração máxima do fármaco no meio deva ser inferior a 10% da sua concentração de saturação. Desta forma a solubilidade não atuaria como um fator limitante para a permeação. Assim, se a substância ativa de interesse for pouco solúvel em água, é admitido adicionar solventes não aquosos ou agentes solubilizantes ao meio para torná-lo *sink* (SINKO, 2008). Nesse estudo, tampão fosfato pH 7,4 contendo lauril sulfato de sódio 0,1% (m/V) foi selecionado com meio acceptor. A solubilidade do CLA nesse meio foi de 1,2 mg/mL. Supondo que 100% do CLA aplicado sobre a pele fossem permeados, a concentração máxima no meio acceptor seria de 0,686 $\mu\text{g/mL}$. Portanto, as condições *sink* foram perfeitamente atingidas para realização dos estudos de permeação cutânea.

Com o intuito de verificar a estabilidade do CLA durante o ensaio de permeação, soluções de CLA no meio acceptor foram analisadas no tempo 0 e após 10 horas de incubação em banho a 37°C. As amostras foram analisadas por CLAE de

acordo com o método descrito no item 2.2.4.1. Como é possível visualizar na Tabela 7, a concentração de CLA permaneceu constante após 10 horas a 37°C, indicando que ele se manterá estável durante os ensaios de permeação.

Tabela 7. Teor do CLA no meio acceptor no tempo 0 e após 10 horas de incubação a 37° C (n = 3).

Período (tempos)	CLA (µg/mL)*	DPR (%) [†]
Tempo 0	10,0	0,5
Tempo 10	10,3	0,7

*Média da triplicata; [†]DPR % = desvio padrão relativo.

3.4.2 Desenvolvimento e validação de uma metodologia analítica para determinação do CLA nos estudos de permeação e retenção cutânea

A análise cromatográfica do CLA foi realizada conforme descrito em 2.2.4. Para obtenção das melhores condições cromatográficas, a fase móvel foi otimizada visando a melhor simetria do pico e sensibilidade adequada do método. O eluente escolhido foi a acetonitrila/água, testado em diferentes proporções, sendo 95:05 de acetonitrila/água a proporção que resultou em melhor tempo de retenção e melhor simetria do pico. Nessas condições, O CLA apresentou tempo de retenção de 8,9 min. A validação do método analítico é essencial para a obtenção de dados de permeação e retenção cutânea confiáveis. Assim, a validação do método foi realizada usando as fitas adesivas utilizadas na técnica de *tape-stripping*, que corresponde à fração de CLA retida no estrato córneo (EC), e o restante da pele, que corresponde à fração de CLA retida na epiderme e derme (EP + D), além do meio acceptor, que corresponde à fração permeada através da pele.

3.4.2.1. Especificidade

A especificidade é a habilidade do método em medir com exatidão a resposta do composto de interesse na presença dos demais componentes da amostra (ICH, 2005). A especificidade do método cromatográfico pôde ser determinada por meio da comparação entre os cromatogramas (Figura 16) obtidos a partir da solução padrão de CLA e das soluções amostra preparadas conforme descrito em 2.2.4.2.1. A análise dos cromatogramas evidenciou que os componentes da formulação e da pele não interferiram no pico do CLA, indicando que o método foi específico nas condições de análise testadas.

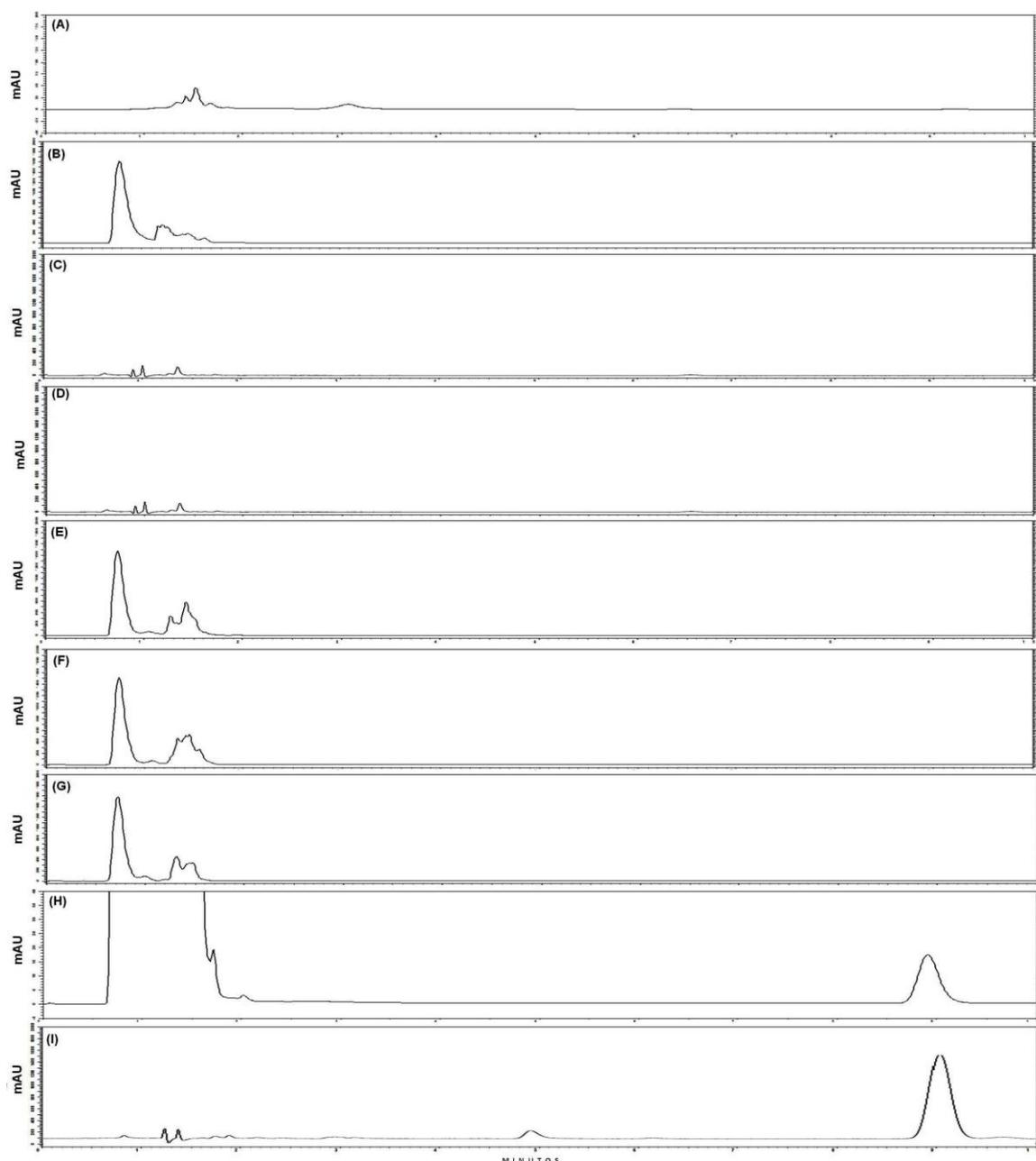


Figura 16. Cromatogramas obtidos após análise por CLAE das seguintes amostras: (A) e (B) soluções obtidas após procedimento de *tape-stripping* para remoção do estrato córneo (EC) e após extração da epiderme/derme (EP + D) com acetonitrila, respectivamente; (C) e (D), soluções obtidas após dissolução dos hidrogéis brancos HQT-B e HQS-B em acetonitrila, respectivamente; (E) e (F) soluções obtidas após dissolução dos hidrogéis brancos HQT-B e HQS-B em lauril sulfato de sódio 0,1%/tampão fosfato pH 7,4, respectivamente (G) Solução de lauril sulfato de sódio 0,1% em tampão fosfato pH 7,4; (H) e (I) solução de CLA 5,0 µg/mL em lauril sulfato de sódio 0,1/ tampão fosfato pH 7,4 e em acetonitrila, respectivamente. Coluna Luna C18 (150 mm ↔ 4,6 mm d.i., 5 µm); fase móvel: acetonitrila:água 95:05 (V/V); volume de injeção 50 µL; fluxo de 1,2 mL/min; detecção: 233 nm.

3.4.2.2 Linearidade

A linearidade é a capacidade do método em obter resultados diretamente proporcionais em uma determinada faixa de concentração do composto de interesse. O intervalo é a faixa entre os níveis superiores e inferiores do analito que são determinados com precisão, exatidão e linearidade utilizando o método desenvolvido. O ICH especifica um mínimo de cinco níveis de concentração (ICH, 2005; SHABIR, 2005).

As áreas absolutas relativas a cada concentração de CLA em lauril sulfato de sódio 0,1% em tampão fosfato pH 7,4, utilizado como meio acceptor nos estudos de permeação, e em acetonitrila, utilizada como solvente extrator, estão apresentadas nas Tabelas 8 e 9, respectivamente. As curvas foram consideradas lineares no intervalo de 0,025-10,0 µg/mL, com coeficiente de correlação $r = 0,999$. A equação da reta, obtida pelo método dos mínimos quadrados, corresponde a $y = 48590x - 2205,6$; onde x é a concentração de CLA e y é a área absoluta do pico para curva em lauril sulfato de sódio 0,1%/tampão fosfato pH 7,4 (Figura 17), e a $y = 107718x - 3136,1$; onde x é a concentração de CLA e y é a área absoluta do pico, para curva em acetonitrila (Figura 18).

Tabela 8. Valores das áreas dos picos do CLA obtidas em diferentes concentrações em lauril sulfato de sódio 0,1%/tampão fosfato pH 7,4.

CURVA	Concentração CLA (µg/mL)							
	0,025	0,05	0,25	0,5	1,0	2,5	5,0	10,0
1	1680	3027	14789	27944	48398	125725	248001	486837
2	1695	3074	14217	28502	48898	125934	248393	482417
3	1691	3062	14465	28797	48976	126239	247901	489301
MÉDIA	1688,6	3054,3	14490,3	28414,3	48757,3	125966	248098,3	486185
DP	6,34	19,94	234,20	353,71	256,07	211,05	212,32	2847,94
DPR	0,37	0,65	1,62	1,24	0,53	0,17	0,09	0,59

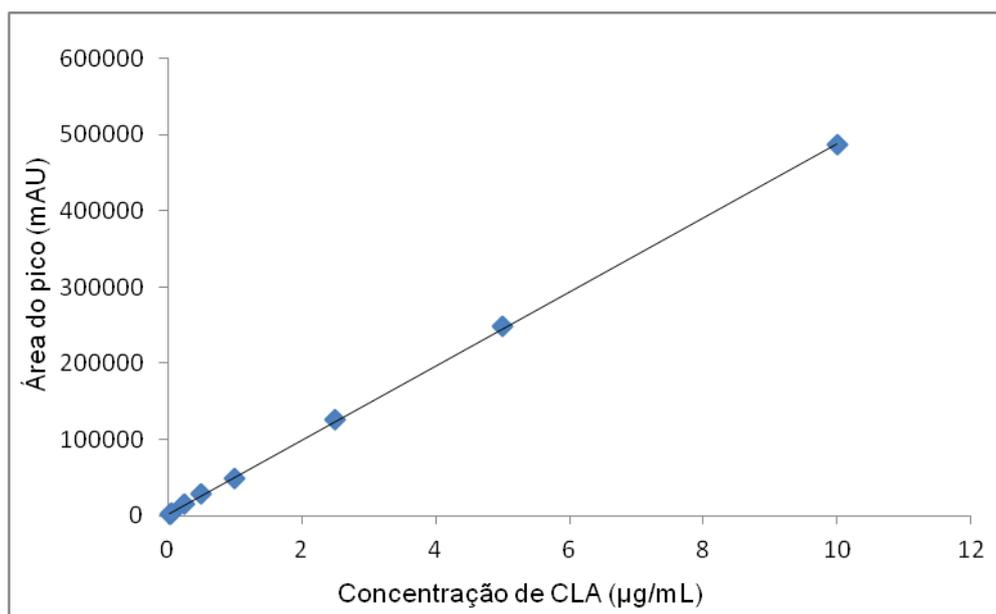


Figura 17. Curva de calibração para o CLA em lauril sulfato de sódio 0,1%/ tampão fosfato pH 7,4 obtida através de cromatografia líquida de alta eficiência.

Tabela 9. Valores das áreas dos picos do CLA obtidas em diferentes concentrações em acetonitrila.

CURVA	Concentração CLA (µg/mL)							
	0,025	0,05	0,25	0,5	1,0	2,5	5,0	10,0
1	3385	13906	26528	54735	107225	282146	539653	1072217
2	3341	13712	26493	54788	107368	281907	539586	1079624
3	3326	13865	26483	54662	107437	281709	539133	1087003
MÉDIA	3350,6	13827,6	26501,3	54728,3	107343,3	281920,6	539457,3	1079615
DP	25,04	83,48	19,29	51,65	88,38	178,66	230,96	6036,36
DPR	0,75	0,60	0,07	0,09	0,08	0,06	0,04	0,55

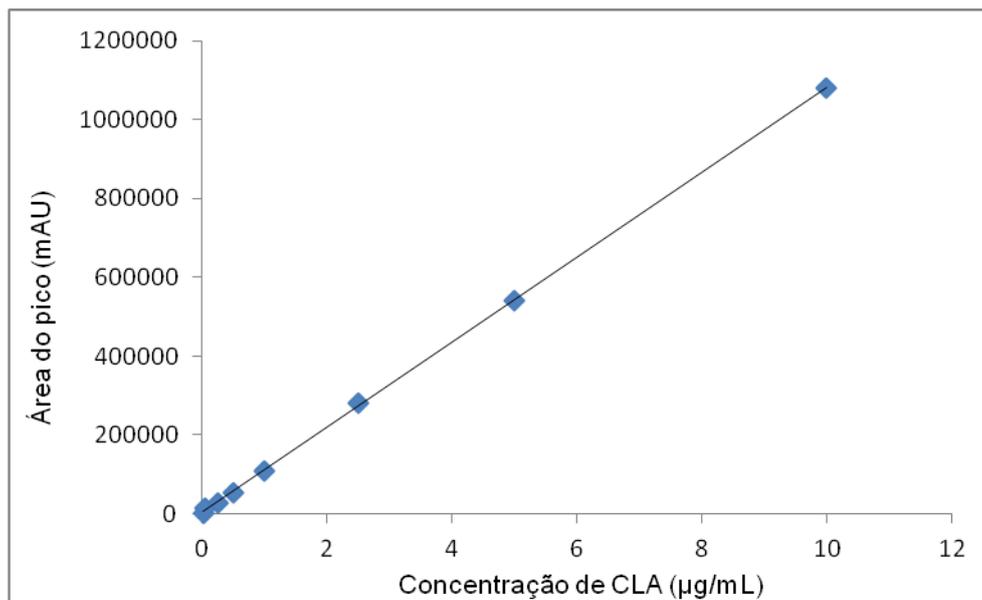


Figura 18. Curva de calibração para o CLA em acetonitrila obtida através de cromatografia líquida de alta eficiência.

3.4.2.3 Limites de Detecção e de Quantificação

O limite de detecção (LD) é definido como a menor quantidade do fármaco que pode ser detectada em uma amostra, porém não necessariamente quantificada como um valor exato (ICH, 2005). O limite de quantificação (LQ) é definido como sendo a menor quantidade do fármaco em uma amostra capaz de ser quantitativamente determinada com precisão e exatidão (ICH, 2005).

Para o cálculo do limite de detecção (LD) e do limite de quantificação (LQ), a equação da reta do CLA foi gerada usando os valores de inclinação e intercepto da média dos três gráficos de calibração. Para a curva de CLA em lauril sulfato de sódio 0,1% em tampão fosfato pH 7,4, a média da inclinação da reta e o desvio padrão das curvas foram de 48590,3 e 295,3, respectivamente. Os valores calculados para LD e LQ, através das equações descritas no item 3.5.4.1, foram de 0,018 e 0,06 µg/mL, respectivamente. Para a curva de CLA em acetonitrila, a média da inclinação da reta e o desvio padrão das curvas foram de 107718,3 e 646,1, respectivamente. Os valores calculados para LD e LQ, através das equações descritas no item 3.5.4.1, foram de 0,019 e 0,06 µg/mL, respectivamente.

3.4.2.4 Precisão

O parâmetro que avalia a proximidade entre várias medidas efetuadas na mesma amostra é a precisão do método analítico. A precisão foi avaliada por meio do ensaio de repetibilidade, onde o desvio padrão relativo (DPR) foi calculado após seis

análises consecutivas das amostras das fitas utilizadas no procedimento de tape stripping (EC) e pele (EP + D) providas do estudo de recuperação descrito no item 2.2.4.2.5.1, contaminadas com uma solução padrão de CLA de modo a se obter concentrações teóricas de 0,16, 0,8 e 1,6 µg/mL, além de seis análises consecutivas das amostras contendo o CLA permeado nas concentrações de 1,0, 2,5 e 5,0 µg/mL no mesmo dia e sob as mesmas condições cromatográficas. Os valores obtidos encontram-se na Tabela 10.

Tabela 10. Valores experimentais obtidos na avaliação da repetibilidade do método.

Parâmetros avaliados	Concentração teórica CLA (µg/mL)	Média da concentração de CLA (µg/mL) obtida das 6 repetições	DPR %
EC	0,16	0,16	0,54
	0,80	0,79	1,28
	1,60	1,65	0,79
EP + D	0,16	0,16	0,73
	0,80	0,79	0,53
	1,60	1,66	0,48
PERMEADO	1,0	0,92	1,10
	2,5	2,59	0,59
	5,0	4,98	1,60

A precisão intermediária foi analisada utilizando as mesmas amostras descritas acima, em três diferentes dias (Tabelas 11 e 12). Desta maneira, o método foi considerado preciso, pois os valores de DPR obtidos foram $\leq 5,0$ %.

Tabela 11. Valores experimentais obtidos na avaliação da precisão intermediária após extração do CLA a partir das fitas obtidas após remoção do extrato córneo (EC) e da pele (EP + D).

DIAS	CLA _{teórico} (µg/mL)	EC			EP + D		
		CLA _{exp.} (µg/mL) *	(%)*	DPR % +	CLA _{exp.} (µg/mL) *	(%)*	DPR (%) +
1, 2 e 3	0,16	0,16	100,0	0,95	0,16	100,0	0,84
	0,80	0,79	98,75	0,81	0,79	98,75	0,56
	1,60	1,66	103,75	0,72	1,65	103,12	1,17

*média da triplicata; DPR % + = desvio padrão relativo.

Tabela 12. Valores experimentais obtidos na avaliação da precisão intermediária no meio acceptor (permeado).

DIAS	CLA _{teórico} (µg/mL)	CLA _{exp.} *	(%)*	DPR % +
1, 2 e 3	1,0	0,96	96,0	1,26
	2,5	2,58	103,2	0,91
	5,0	4,98	99,6	1,06

*média da triplicata; DPR % + = desvio padrão relativo.

3.4.2.5 Exatidão

A exatidão representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados nas amostras em análise e um valor de referência aceito como verdadeiro (ICH, 2005). A exatidão foi determinada por meio da análise em triplicata de amostras de pele (EC e EP + D) e do meio acceptor, obtidas após ensaios de permeação cutânea, e contaminadas com uma solução padrão de CLA de concentração conhecida. Os resultados obtidos na avaliação da exatidão do método estão demonstrados na Tabela 13 e 14.

Tabela 13. Valores experimentais obtidos na avaliação da exatidão após extração do CLA a partir das fitas obtidas após remoção do extrato córneo (EC) e a partir da pele (EP + D).

CLA teórico ($\mu\text{g/mL}$)	EP + D			EC		
	CLA recuperado ($\mu\text{g/mL}$)	Recuperação (%)	DPR (%) ⁺	CLA recuperado ($\mu\text{g/mL}$)	Recuperação (%)	DPR (%) ⁺
0,16	0,16	101,12	1,61	0,16	98,01	1,62
0,80	0,79	98,82	0,74	0,79	99,03	1,33
1,60	1,66	103,81	2,11	1,659	103,16	2,71

⁺ DPR % = desvio padrão relativo.

Tabela 14. Valores experimentais obtidos na avaliação da exatidão para o CLA no meio acceptor.

Concentração de CLA no meio acceptor ($\mu\text{g/mL}$) ^a	Volume de solução padrão de CLA 10 $\mu\text{g/mL}$ (mL)	Concentração teórica de CLA ($\mu\text{g/mL}$) ^b	Concentração média obtida* ($\mu\text{g/mL}$)	Rec. (%)	DPR (%) ⁺
0,90	0,73	1,0	0,95	95,50	0,81
0,90	2,23	2,5	2,53	100,93	0,94
0,90	4,73	5,0	5,02	100,49	1,92

* Média da triplicata; ⁺ DPR % = desvio padrão relativo, ^a volume utilizado da solução = 3,0 mL,

^b volume final = 10,0 mL.

Conforme pode ser observado, valores de recuperação entre 98,01 e 103,81% e DPR entre 0,74 e 2,71%, foram obtidos após análise das soluções obtidas após extração do CLA a partir das fitas e de amostras de pele. Para o meio acceptor, os valores de recuperação variaram entre 95,50 e 100,93% e de DPR entre 0,81 e 1,92%. Para ambos os casos, o método foi considerado exato para a faixa de aplicação.

3.4.2.6 Robustez

A robustez de um método é a medida da sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos, indicando sua confiança durante o uso normal (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

A Tabela 15 apresenta os valores de tempo de retenção e simetria do pico obtidos na avaliação da robustez do método. Os valores de concentração de CLA para a alteração do fluxo da fase móvel foram entre 102,8 e 104,9 % e para a variação do

comprimento de onda de detecção foram de 101,8 e 103,6 %. O método foi considerado robusto.

Tabela 15. Variação do fluxo da fase móvel e comprimento de onda para avaliação da robustez do método de quantificação do CLA (n=3).

Fatores		Teor % *	DPR % †	Tempo de retenção (min)	Simetria do Pico
Fluxo (mL/min)	1,1	104,9	0,5	9,31	1,09
	1,2	103,6	1,4	9,29	1,11
	1,3	102,8	0,1	9,18	1,02
Comprimento de onda (nm)	231	102,5	0,7	9,25	0,99
	233	103,6	1,4	9,37	1,01
	235	101,8	0,5	9,13	1,02

*Média da triplicata; †DPR = desvio padrão relativo.

3.4.3 Estudos de permeação cutânea

A administração cutânea de fármacos é considerada uma via não-invasiva que exhibe inúmeras vantagens sobre as outras vias de administração. A administração cutânea evita o metabolismo de primeira passagem, possibilita o prolongamento da ação, permite a redução dos efeitos colaterais indesejáveis decorrentes da absorção sistêmica, e é mais aceitável para o paciente, principalmente quando o tratamento de desordens cutâneas é desejado. Entretanto, a administração cutânea ainda é um desafio na área farmacêutica, visto que o estrato córneo impõe uma barreira à passagem de fármacos, dificultando o alcance do mesmo nas diferentes camadas da pele (RIZWAN et al., 2009).

Muitos fatores influenciam a penetração/absorção de substâncias através da pele, incluindo a integridade do estrato córneo, as características físico-químicas das substâncias ativas, tais como pKa, massa molecular e coeficiente de partição, e as características do veículo e/ou da forma farmacêutica ou cosmética. A penetração e a permeação de diferentes componentes ativos de baixa absorção podem ser aumentadas por meio de algumas alternativas como a adição de promotores de absorção específicos na formulação ou, como relatado nos últimos anos, pelo uso de sistemas de liberação nanoestruturados, em especial os nanocarreadores lipídicos como os lipossomas, as nanopartículas lipídicas sólidas e as nanoemulsões (FRIEDMAN, SCHWARZ & WEISSPAPIR, 1995).

As propriedades físicoquímicas das nanoemulsões formadas, tais como tamanho da gotícula, carga de superfície, tensão superficial e viscosidade parecem exercer influência na velocidade e extensão da permeação na pele. O reduzido diâmetro de gotícula apresenta-se como vantagem em relação aos sistemas convencionais de uso tópico, pois permite a aplicação de um depósito uniforme na pele resultando em uma elevada superfície de contato do sistema com este órgão (BENITA, 1999). Quando comparado as macroemulsões, as nanoemulsões têm demonstrado penetrar significativamente mais rápido, além de conferir um maior grau de hidratação à pele (SONEVIILE-AUBRUN, J.-T. SIMONNET & ALLORET, 2004). Por estes aspectos, as nanoemulsões têm sido consideradas veículos promissores para a liberação de fármacos na pele, entretanto, nos últimos anos interesse têm sido dado à preparação de nanoemulsões de óleos que exibem atividade terapêutica (ALMEIDA et al., 2009, TEO et al., 2011).

Com o objetivo de verificar a habilidade dos hidrogéis em liberar o CLA na pele, estudos de permeação *in vitro* foram realizados utilizando células de difusão tipo Franz. Neste experimento, uma alíquota (500 µL) de cada formulação, contendo diferentes quantidades de CLA (4,12; 5,49 e 6,86 µg) foram aplicadas no compartimento doador da célula de difusão. Os perfis de permeação do CLA através da pele de orelha suína depois da aplicação dos diferentes hidrogéis estão representados na Figura 19. Os parâmetros de permeação determinados conforme descrito em 2.2.3.4 são apresentados na Tabela 16.

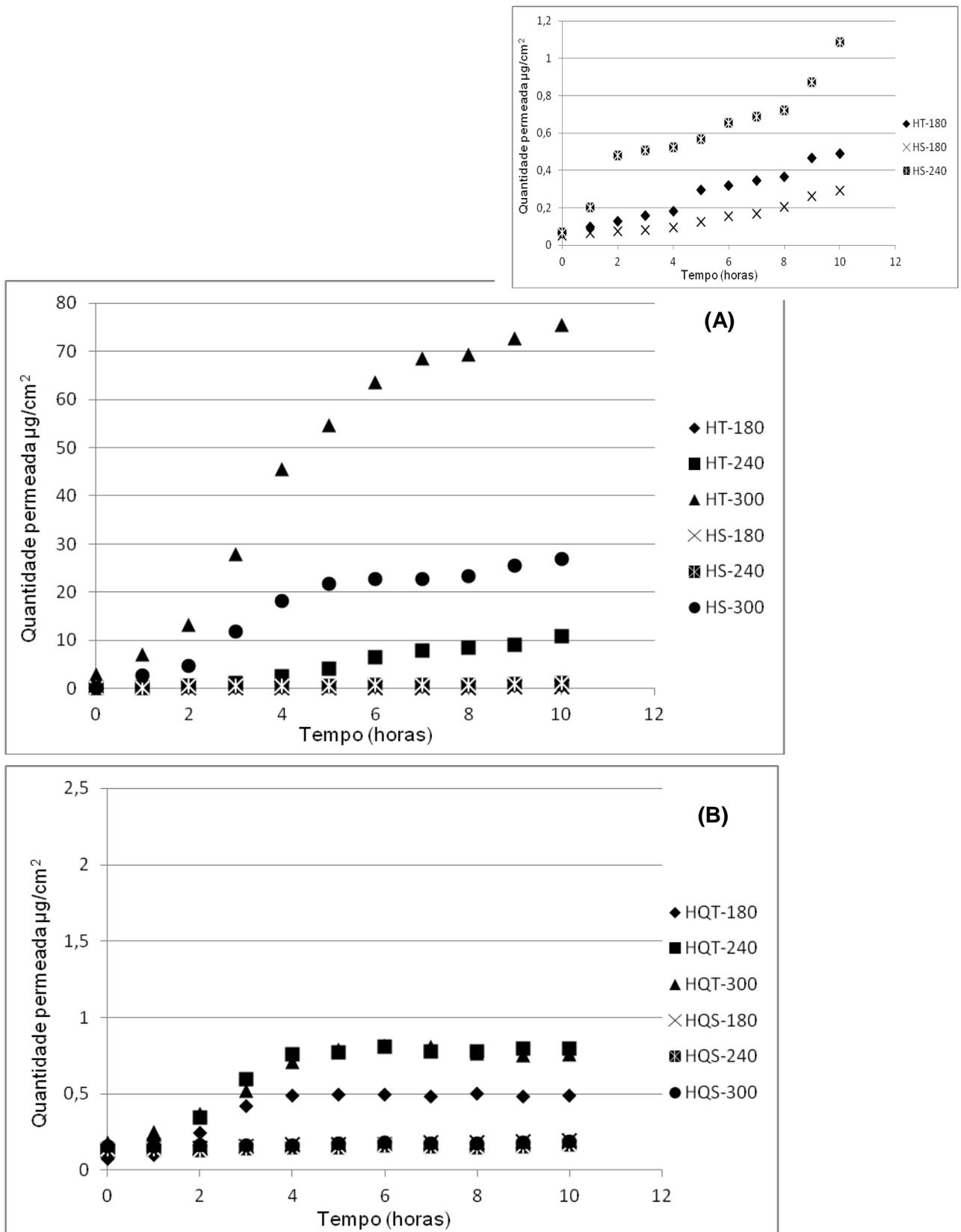


Figura 19. Perfil de permeação do CLA através de pele de orelha suína. (A) Hidrogéis contendo HPMC 1% (m/V), (B) hidrogéis contendo HPMC 1% (m/V) e quitosana (0,5%).

Como pode ser observada, a permeação do CLA através da pele foi grandemente afetada pela composição das formulações. Quando unicamente o HPMC foi empregado para formação do hidrogel, o fluxo e coeficiente de permeabilidade

aumentaram com o aumento do teor de CLA das nanoemulsões. Da mesma maneira, o tipo de surfactante empregado na estabilização das nanoemulsões mostrou afetar a permeação do CLA, uma vez que as nanoemulsões estabilizadas com Tween 80 exibiram maiores valores de fluxo, para uma mesma concentração de CLA. Por outro lado, a adição da quitosana exerceu um efeito negativo na permeação, sendo que aquelas formulações contendo as nanoemulsões estabilizadas com Solutol HS 15, pouca ou quase nenhuma permeação do CLA foi verificada, impossibilitando o alcance do estado-estacionário (steady-state) e, portanto, a determinação do fluxo e coeficiente de permeabilidade. Considerando as formulações de hidrogéis de HPMC, após 10 horas de experimento, a quantidade acumulada média de CLA permeado decresceu conforme a seguinte ordem: HT-300 > HS-240 > HT-300 > HS-240 > HT-180 > HS-180.

Tabela 16. Permeação dos hidrogéis de CLA em pele de orelha de suíno: fluxo, tempo de latência e quantidade permeada, após 10 horas de experimento *in vitro* (n ≥ 3).

FORMULAÇÕES	FLUXO ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$)	Kp ($\text{cm}\cdot\text{h}^{-1}\times 10^{-3}$)	TEMPO DE LATÊNCIA (h)	Quantidade acumulada de CLA (cm^{-2})
HT-180	0,02 ± 0,02	0,01 ± 0,01	0,19 ± 0,10	0,49 ± 0,57
HT-240	1,41 ± 0,95	0,26 ± 0,17	0,54 ± 0,54	10,95 ± 7,74
HT-300	9,20 ± 4,93	1,34 ± 0,72	0,32 ± 0,22	77,40 ± 29,50
HS-180	0,04 ± 0,03	0,01 ± 0,01	0,62 ± 0,47	0,29 ± 0,20
HS-240	0,17 ± 0,24	0,03 ± 0,04	0,24 ± 0,19	1,09 ± 1,22
HS-300	6,66 ± 4,56	0,97 ± 0,66	1,61 ± 1,17	26,98 ± 18,02
HQT-180	0,14 ± 0,14	0,03 ± 0,03	1,48 ± 0,55	0,49 ± 0,37
HQT-240	0,19 ± 0,09	0,04 ± 0,02	0,34 ± 0,17	0,80 ± 0,02
HQT-300	0,15 ± 0,06	0,02 ± 0,01	0,35 ± 0,23	0,76 ± 0,34
HQS-180	n.d.	n.d.	n.d.	n.d
HQS-240	n.d.	n.d.	n.d.	n.d
HQS-300	n.d.	n.d.	n.d.	n.d

n.d.: não determinado

Muitos autores destacam que a composição das formulações afeta as propriedades de permeação do fármaco através da pele, não somente devido a sua composição estrutural, mas também devido às propriedades de promoção de absorção dos surfactantes utilizados. Muitos deles são capazes de se inserir entre as camadas hidrofóbicas da pele, desestruturando sua organização, aumentando sua fluidez e, conseqüentemente, levando a uma facilitada difusão de penetrantes lipídicos

(PIEMI et al., 1999). Dois possíveis mecanismos de aumento de penetração do fármaco através de surfactantes não iônicos são sugeridos. De um lado, a penetração nas regiões intercelulares do estrato córneo, aumenta a fluidez e eventualmente solubiliza o fármaco lipídico e, por outro lado, a interação e a ligação com os filamentos de queratina podem resultar no rompimento dos corneócitos (HOELLER, SPERGER, VALENTA, 2009).

Dodane e colaboradores (1999) demonstraram que a quitosana aumenta a permeabilidade celular ao provocar efeitos relativamente leves e reversíveis na morfologia epitelial, afetando as vias paracelular e transcelular, e podendo ser considerado um composto promissor para melhora da permeação cutânea de fármacos. Ao contrário do observado no presente estudo, os hidrogéis constituídos de quitosana apresentaram baixa permeação cutânea. É possível que tenha ocorrido uma interação entre a quitosana e o CLA, visto que a quitosana em meio ácido apresenta cargas positivas devido à protonação dos grupos amino (NH_3^+) e o CLA, um ácido fraco (relacionado à porcentagem de ácidos graxos livres do LUTA-CLA), apresenta carga negativa. Provavelmente, esta complexação foi responsável pela retenção do CLA na superfície da pele, impedindo o fluxo e a sua penetração, diferente do perfil apresentado pelos hidrogéis contendo somente HPMC. De acordo com Mateti e colaboradores (2010), géis de HPMC aumentam da hidratação da pele, prevenindo a perda de água transepitelial, conduzindo a condições oclusivas, e favorecendo a permeação de fármacos através do estrato córneo.

3.4.4 Estudos de retenção cutânea do CLA

O *tape stripping* é um método simples, eficiente e não invasivo para verificação da qualidade e eficácia de formulações cosméticas e dermatológicas. Após a penetração das formulações, as camadas do estrato córneo são sucessivamente removidas a partir de uma mesma área de pele usando fitas adesivas. Este método tem sido padronizado de modo a permitir a remoção completa estrato córneo. As fitas adesivas contêm a quantidade de corneócitos e a correspondente quantidade de formulação penetrada, a qual pode ser determinada por métodos analíticos clássicos (LINDEMANN et al., 2003; LADEMANN et al., 2009). Nesse estudo, esta técnica foi empregada para determinação da quantidade retida de CLA no estrato córneo (EC) e no restante da pele, ou seja, epiderme e derme (EP+D). Os resultados obtidos após a determinação da retenção do CLA nas diferentes camadas da pele, após 10 horas de experimento de permeação, estão mostrados na Figura 20 e Tabela 17.

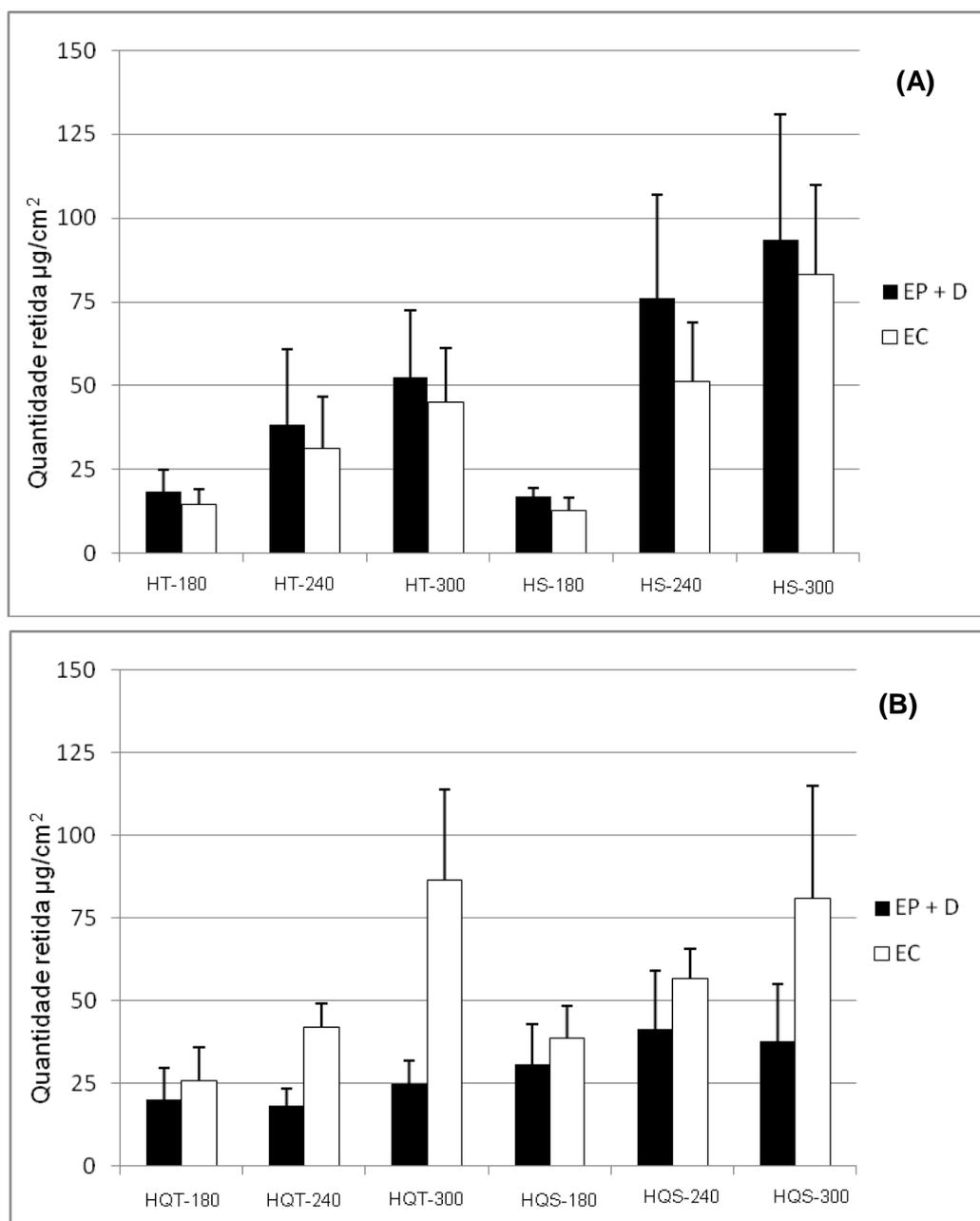


Figura 20. Quantidade retida de CLA no estrato córneo (EC) e na epiderme após *tape stripping*. (A) Hidrogéis de HPMC 1% (m/V), (B) hidrogéis e HPMC 1% (m/V) e quitosana 0,5% (m/V).

Como pode ser observado na Figura 20 e Tabela 17, a quantidade retida de CLA no estrato córneo (EC) e na epiderme e derme (EP + D) também foi afetada pela composição das formulações. Principalmente para os hidrogéis de HPMC, a quantidade retida no EC e EP+D aumentou com o aumento da concentração de CLA nas nanoemulsões. Ainda, é visível que as formulações contendo quitosana exibiram maiores valores de retenção cutânea, sobretudo no estrato córneo, que aquelas preparadas usando unicamente o HPMC como agente gelificante.

Tabela 17. Quantidade de CLA retida nas diferentes camadas de pele após ensaio de permeação cutânea.

FORMULAÇÕES	Quantidade de CLA ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$)	
	EC	EP+D
HT-180	14,45 ^a \pm 4,55	18,43 ^a \pm 6,61
HT-240	31,15 ^{a,b} \pm 15,54	38,19 ^{a,b} \pm 22,76
HT-300	44,95 ^{b,c} \pm 16,45	52,44 ^{b,c} \pm 20,15
HS-180	12,61 ^{a,b} \pm 3,99	16,87 ^{a,b} \pm 2,63
HS-240	51,12 ^{b,c} \pm 17,73	76,19 ^{c,d} \pm 30,89
HS-300	83,09 ^d \pm 26,94	93,67 ^d \pm 37,29
HQT-180	25,94 ^{a,b,c} \pm 10,10	20,13 ^{a,b} \pm 9,47
HQT-240	42,09 ^{b,c} \pm 7,25	18,22 ^{a,b} \pm 5,11
HQT-300	86,58 ^d \pm 27,28	24,97 ^{a,b} \pm 6,86
HQS-180	38,73 ^{a,b,c} \pm 9,78	30,81 ^{a,b,c} \pm 12,12
HQS-240	56,74 ^c \pm 8,90	41,31 ^{a,b,c} \pm 17,63
HQS-300	80,95 ^d \pm 34,05	37,90 ^{a,b,c} \pm 17,02

Todos os valores representam a média de seis experimentos \pm D.P.R (n=6). A diferença mínima significativa entre os valores médios do CLA retido no estrato córneo é igual a 24,79 e para epiderme/derme (EP+D) é igual a 26,69. Letras iguais representam valores médios que não diferem estatisticamente entre si, para um nível de significância de 5%.

A análise da variância com três fatores foi realizada para comparar as quantidades de CLA retido nas diferentes camadas de pele após aplicação dos hidrogéis. Os fatores analisados foram: o tipo de agente gelificante (HPMC ou HPMC/quitosana), o tipo de surfactante utilizado na estabilização das nanoemulsões (Tween 80 ou Solutol HS15) e a quantidade de CLA adicionada nas nanoemulsões (180, 240 ou 300 μL). Como pode ser observado na Tabela 18, o valor de $F_{\text{calculado}}$ foi maior que o valor de $F_{\text{crítico}}$ ($\alpha = 0,05$), para todos os fatores avaliados, demonstrando que os mesmos afetaram significativamente a retenção do CLA, tanto no EC como na EP+D. Para determinar aonde ocorreu a significância estatística, o teste de Tukey de comparação entre as médias foi aplicado para determinação da diferença mínima significativa (d.m.s.). Os valores de d.m.s. foram 24,79 e 26,69 para os valores de CLA retido no EC e na EP+D, respectivamente. Considerando os valores médios mostrados na Tabela 17, é possível afirmar que a adição de quitosana para obtenção

dos hidrogéis provocou a redução da penetração do CLA na pele, o qual permaneceu nas camadas superiores da pele. Este resultado corrobora com os achados na determinação da quantidade de CLA permeada, podendo ser explicado por uma associação forte da quitosana com o CLA. Além disso, sabe-se que a pele é negativamente carregada em pH neutro (CONRADS & ZAHN, 1987), podendo esse fator também ter contribuído para a retenção do CLA e da quitosana na pele. O efeito promotor de absorção do Tween 80 também foi observado nesse experimento, visto que para as formulações preparadas com HPMC, valores menores de retenção cutânea foram observados para quando esse surfactante foi empregado.

Tabela 18. ANOVA dos valores de quantidade de CLA retido no estrato córneo (EC) e na epiderme e derme (EP +D).

EP+D					
Fonte de Variação	SQ	GL	MQ	F calculado	F crítico
1	8.542,5521	1	8.542,5521	23,107	4,0012
2	7.953,5476	1	7.953,5476	21,5138	4,0012
3	11.655,1178	2	5.827,5589	15,7632	4,0012
1 + 2	774,9985	1	774,9985	2,0963	4,0012
1 + 3	6.443,9155	2	3.221,9577	8,7152	3,1504
2 + 3	2.224,7596	2	1.112,3798	3,0089	3,1204
1 + 2 + 3	781,2477	2	390,6238	1,0566	1,0566
Resíduo	22.181,7033	60	369,6951	-	-
Total	60.557,842	71	852,9274	-	-
EC					
Fonte de Variação	SQ	GL	MQ	F calculado	F crítico
1	4.402,8164	1	4.402,8164	13,8085	4,0012
2	3.063,2269	1	3.063,2269	9,6072	4,0012
3	31.278,0423	2	15.639,0211	49,0486	4,0012
1 + 2	588,3022	1	588,3022	1,8451	4,0012
1 + 3	489,1652	2	244,5826	0,7671	3,1504
2 + 3	507,1177	2	253,5588	0,7952	3,1504
1 + 2 + 3	2.654,6592	2	1.327,3296	4,1629	4,1629
Resíduo	19.130,8324	60	318,8472	-	-
Total	62.114,1622	71	874,8474	-	-

Fontes de variação: 1 = Agente formador do gel: HPMC 1 (%) ou HPMC 1 (%) e quitosana 0,5 (%), 2 = Tipo de surfactante utilizado na estabilização das nanoemulsões: Tween 80 ou Solutol HS15; 3 = Quantidade de CLA utilizada: 180, 240 ou 300 μ L. $\alpha = 0,05$.

3.5 Análise termogravimétrica (TGA) e Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

Com intuito de verificar possíveis interações do CLA com os componentes da pele, análise termogravimétrica e de calorimetria exploratória diferencial foram realizadas com o CLA puro e amostras de pele obtidas antes e após estudos de permeação cutânea. Os resultados obtidos por TGA encontram-se mostrados na Figura 21 e Tabela 19.

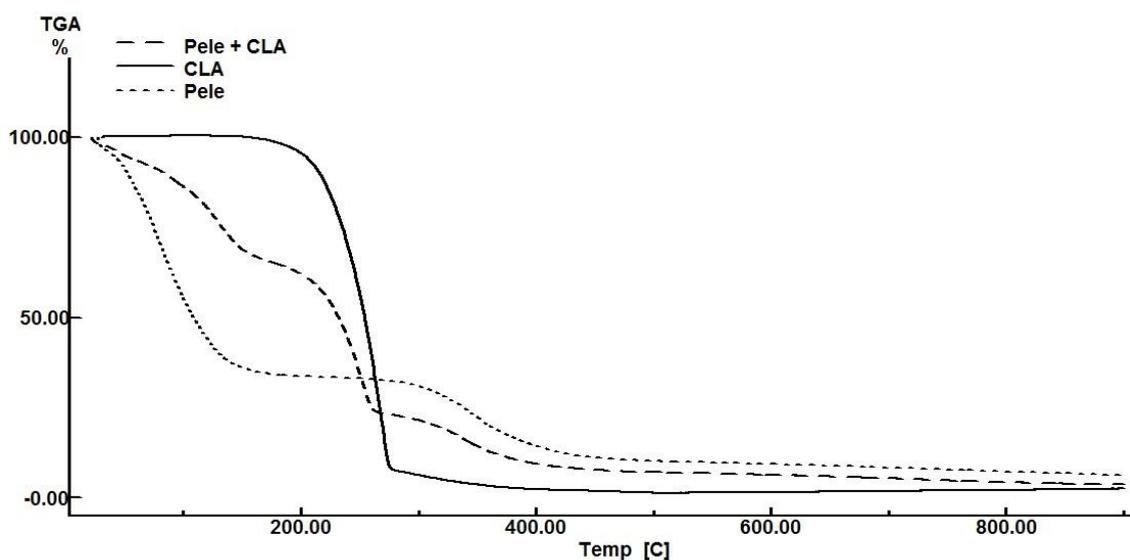


Figura 21. Curvas termogravimétricas do CLA e da pele.

As análises termogravimétricas exibiram perfis diferentes de perda de massa para a pele contendo o CLA, quando comparado com os perfis obtidos para pele e o CLA isoladamente. É possível visualizar na Figura 21 e Tabela 19, que apenas um evento caracteriza a perda de massa do CLA em 253,32°C, com 97,80% de perda de massa, podendo ser indicativo de sua decomposição. Já em relação à pele, é possível visualizar dois eventos, sendo um evento em 85,81°C e outro em 348,60°C, totalizando 90,38% de perda de massa durante todo o evento. Quando há mistura do CLA com a pele, é possível visualizar quatro eventos térmicos, sendo o primeiro em 40,34°C, o segundo em 120,40°C, o terceiro em 238,46°C e o último em 349,98°C, totalizando 94,06% de perda de massa durante todo o evento. Com estes dados, é possível sugerir que existe algum tipo de interação do CLA com os componentes da pele.

Tabela 19. Valores de temperatura de máxima velocidade de perda de massa (T pico), temperatura inicial e final e percentuais de perda de massa obtidos após análise do CLA e da pele.

Amostras	T pico (°C)	T início (°C)	T final (°C)	Perda de massa (%)
CLA	253,32	235,09	279,85	97,80
Pele	85,81	53,33	121,73	63,41
	348,60	308,77	395,21	26,97
Pele + CLA	40,34	31,97	53,37	5,62
	120,40	102,87	149,35	26,98
	238,46	222,46	261,19	42,61
	349,98	312,95	398,14	18,85

As curvas termoanalíticas obtidas após análise do CLA e da pele por DSC podem ser visualizadas na Figura 22. Como pode ser observado, o CLA exibiu dois eventos endotérmicos em $-51,65$ e $-44,73^{\circ}\text{C}$, enquanto a pele, quando analisada isoladamente não exibiu nenhum evento térmico na faixa de -60° a -20°C . Quando CLA e pele foram misturados, um pequeno deslocamento nos eventos térmicos do CLA para $-54,78$ e $-46,00^{\circ}\text{C}$ foi observado, podendo indicar algum tipo de interação entre ambos os componentes.

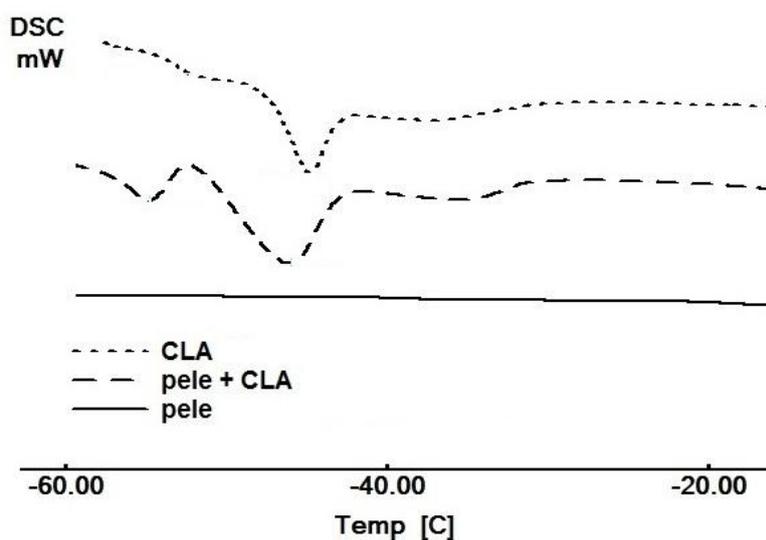


Figura 22. Curvas de DSC obtidas para o CLA, pele com o CLA e pele.

A literatura indica que transições em pele suína ocorrem perto de 60 e 70°C , estando relacionado às transições lipídicas de lipídeos intercelulares e proteínas intercelulares, respectivamente (POTTS 1989; VALENTA, NOWAK, HADGRAFT,

2001; KIM et al., 2008). Nesta faixa de temperatura, a curva de DSC obtida a partir da pele demonstrou um evento térmico em 64,14 °C. Quando amostras de pele obtidas após ensaio de permeação foram analisadas, este evento foi deslocado para valores mais baixos, em cerca de 61° C, independente do tipo de formulação usada (Tabela 20).

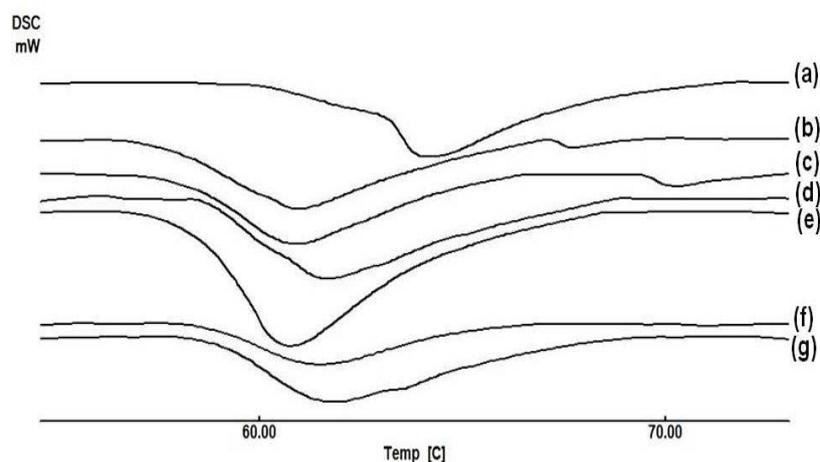


Figura 23. Curvas de DSC obtidas a partir da pele e formulações. (a) pele; (b) HQS-B; (c) HQT-B; (d) HQS-300; (e) HQT-300; (f) HS-300; (g) HT-300.

Tabela 20. Resultados obtidos por DSC após análise do CLA, pele e de amostras de pele obtidas após estudos de permeação.

Amostras	T (°C)
Pele	64,14
CLA	-44,73/-51,65
Pele/HQS-B	60,95 / 67,75
Pele/HQT-B	60,96 / 70,29
Pele/HQS-300	61,66
Pele/HQT-300	60,77
Pele/HS-300	61,59
Pele/HT-300	61,88

* T (°C) = Temperaturas máximas de transição.

Sabe-se que a penetração percutânea implica em muitas etapas. A liberação do fármaco na pele depende de propriedades físico-químicas do fármaco em si, combinadas com a influencia do veículo em alterar o seu perfil de permeação (PRIEMI et al., 1999; CAZARES-DELGADILLO et al., 2005). Deste modo, mesmo considerando a possível interação das formulações com a pele, como mostrado na Figura 22, todas

as formulações tiveram a capacidade de interagir com a pele, provocando alterações nos componentes da matriz lipídica.

3.6 Análise histológica da pele após estudos de permeação

Diversos corantes podem ser usados para visualização de tecidos, mas de um modo geral podem ser agrupados em três classes distintas: corantes que diferenciam os componentes ácidos e básicos das células; corantes especializados que diferenciam os componentes fibrosos da matriz extracelular e os sais metálicos que precipitam nos tecidos. Os corantes mais utilizados nos procedimentos histológicos são a hematoxilina e a eosina (HE). A hematoxilina é uma base que cora, preferencialmente, componentes ácidos das células em um tom azulado escuro. Como os componentes ácidos mais abundantes são o DNA e o RNA, tanto o núcleo, quanto certas partes do citoplasma, se tornam azulados. Esses componentes são chamados de basófilos. A eosina, ao contrário, é um ácido que cora as estruturas básicas da célula de rosa. Estas estruturas são abundantes no citoplasma e são chamadas de acidófilas (GARTNER & HIATT, 1999).

Com o intuito de verificar possíveis mudanças estruturais decorrentes da aplicação dos hidrogéis contendo as nanoemulsões de CLA nas membranas de pele suína, as amostras de pele foram coradas com eosina e hematoxilina e visualizadas por microscopia óptica. As fotografias obtidas de amostras controle e amostras com CLA estão demonstradas na Figura 24. A morfologia normal do estrato córneo foi observada para ambas peles tratadas com os hidrogéis de HPMC brancos e hidrogéis de HPMC contendo CLA. Não ocorreram alterações aparentes em nível de epiderme. Em algumas áreas da pele, é possível observar alguns espaços vazios na região dérmica. Ao mesmo tempo, as microfotografias apresentam uma fina camada de queratina, derme normal e tecido subcutâneo. A fragmentação da queratina e a ruptura das bicamadas lipídicas foram observadas. A ablação do estrato córneo pode ter contribuído no aumento da permeação cutânea para as amostras contendo HPMC. Como o CLA é um componente ácido, é possível perceber claramente o aumento da coloração azul-violeta decorrente do corante hematoxilina após aplicação das formulações contendo apenas HPMC como agente gelificante, as quais o CLA mais permeou. Este aumento na coloração azul-violeta não foi tão pronunciado nas peles obtidas após estudos de permeação em que hidrogéis de HPMC e quitosana foram empregados. Além disso, na Figura 24 é possível visualizar uma alteração na coloração da superfície da pele para um rosa-avermelhado, quando os hidrogéis contendo quitosana foram usados. Esses resultados corroboram com os ensaios de

permeação *in vitro*, que evidenciaram a dificuldade do CLA em permear na pele com o uso dessas formulações. Como o CLA é um ácido fraco, ele parece interagir com a quitosana, que apresenta carga positiva, e desta maneira a formulação fica retida na pele.

A pele não tratada (Figura 24, I) tem um compacto estrato córneo, com uma camada de corneócitos intimamente conjugados. A aplicação dos hidrogéis favoreceu o inchaço do estrato córneo e a espessura total da pele parece ter sido aumentada, o que sugere que os hidrogéis provocam um efeito hidratante sobre a pele. Como resultado, o aumento da hidratação do estrato córneo pode ter contribuído para a penetração do CLA nas camadas mais profundas da pele (SCHÄFER-HORTING, MEHNERT & KORTING, 2007). Além disso, os componentes das formulações podem se fundir e se misturar com os lipídeos da pele, aumentando a espessura do estrato córneo por perturbar o arranjo lamelar dos lipídeos (EL MAGHRABY, BARRY, WILLIAMS, 2008; YOKOMIZO & SAGITANI, 1996; ZELLMER, PFEIL, LASCH 1995).

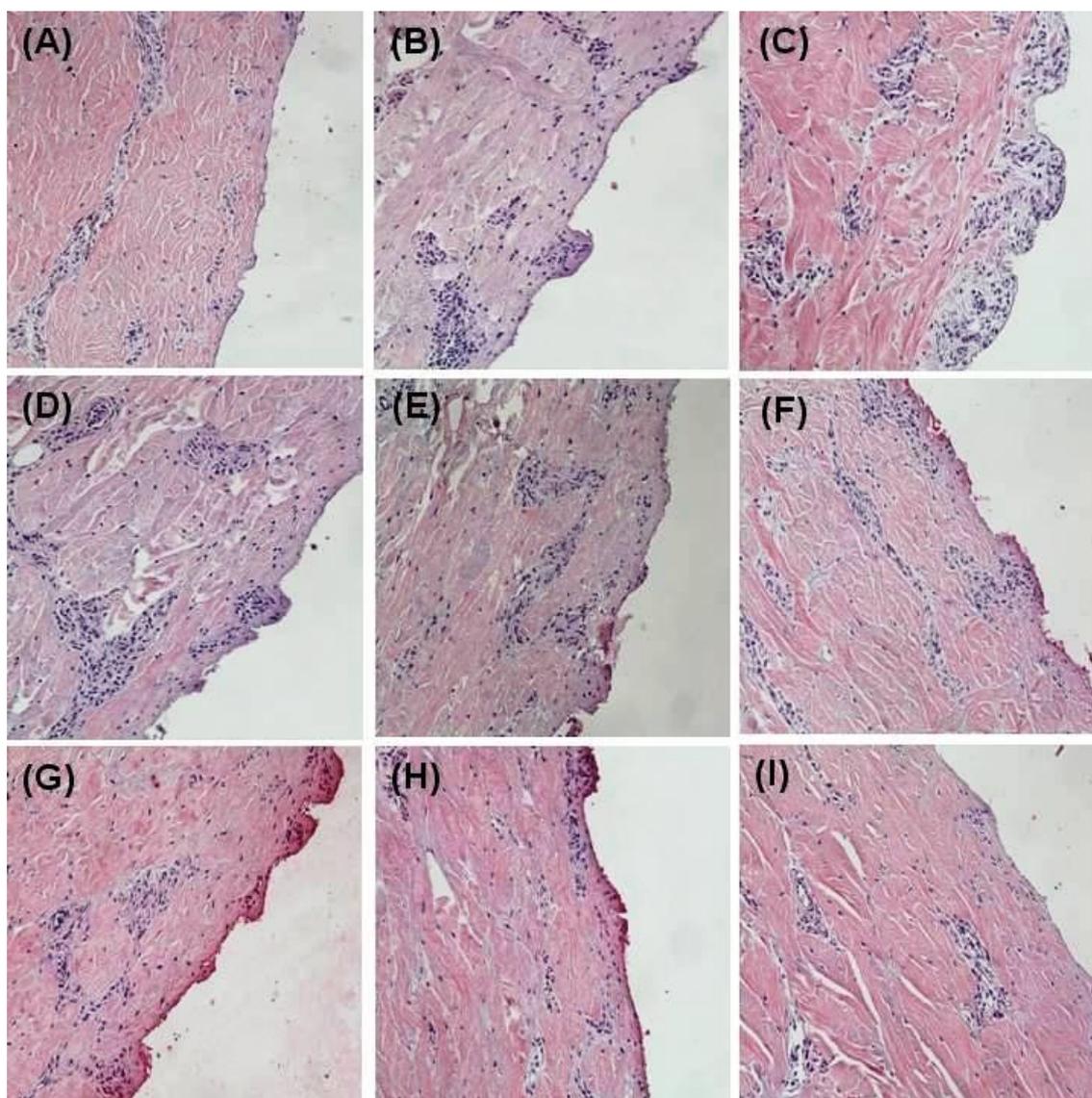


Figura 24. Cortes histológicas da pele após coloração com eosina e hematoxilina. (A) HS-B; (B) HS-300, (C) HT-B; (D) HT-300; (E) HQS-B, (F) HQS-300; (G) HQT-B; (H) HQT-300 e (I) pele sem tratamento.

- A preparação de nanoemulsões de ácido linoléico conjugado pela técnica de emulsificação espontânea e a preparação de seus respectivos hidrogéis, mostrou ser viável e de simples execução.
- As micrografias de microscopia eletrônica de transmissão evidenciaram a formação de gotículas esféricas tanto para as nanoemulsões como para os seus respectivos hidrogéis.
- Os valores de tamanho de gotícula nas nanoemulsões aumentaram conforme o aumento da concentração de CLA. Os valores de potencial zeta evidenciaram carga superficial negativa e o índice de polidispersão indicou a presença de nanoemulsões com gotículas estáveis.
- A viscosidade aparente dos hidrogéis foi maior com o uso de quitosana e diminuiu com o tempo de armazenamento. Todos os hidrogéis apresentaram perfil não-Newtoniano com caráter pseudoplástico.
- O método analítico de cromatografia líquida de alta eficiência para a determinação do CLA retido e permeado após estudo *in vitro* provou ser específico, linear, preciso, exato e robusto.
- A permeação do CLA através da pele foi grandemente afetada pela composição das formulações. Quando unicamente o HPMC foi empregado para formação do hidrogel, o fluxo e coeficiente de permeabilidade aumentaram com o aumento do teor de CLA das nanoemulsões. Da mesma maneira, o tipo de surfactante empregado na estabilização das nanoemulsões mostrou afetar a permeação do CLA, uma vez que as nanoemulsões estabilizadas com Tween 80 exibiram maiores valores de fluxo, para uma mesma concentração de CLA. A adição de quitosana para obtenção dos hidrogéis provocou a redução da penetração do CLA na pele, o qual permaneceu nas camadas superiores da pele, podendo este resultado ser explicado por uma associação forte da quitosana com o CLA.
- Os estudos de calorimetria exploratória diferencial e análise termogravimétrica comprovaram a interação do CLA com a pele, assim como todas as

formulações tiveram a capacidade de interagir com a pele, provocando alterações nos componentes da matriz lipídica.

- Os estudos histológicos comprovaram a maior penetração do CLA quando hidrogéis contendo apenas HPMC foram aplicados na pele. A aplicação dos hidrogéis favoreceu o inchaço do estrato córneo e a espessura total da pele parece ter sido aumentada, o que sugere que os hidrogéis provocam um efeito hidratante sobre a pele. Como resultado, o aumento da hidratação do estrato córneo pode ter contribuído para a penetração do CLA nas camadas mais profundas da pele.
- O desenvolvimento de sistemas nanoemulsionados de CLA demonstrou ser uma estratégia promissora para formulações de uso tópico capazes de permear o extrato córneo, tornando-se assim, uma interessante opção no tratamento de processos inflamatórios da pele, na prevenção dos danos causados pela exposição à radiação e no combate à celulite.

AKOMEAH, F., NAZIR, T., MARTIN, G. P., BROWN, M. B. Effect of heat on the percutaneous absorption and skin retention of three model penetrants. *European Journal Pharmaceutical Sciences*, v. 21, p. 337-345, 2004.

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

ALMEIDA, M. E., TEIXEIRA, H. F., KOESTER, L. S. Preparação de emulsões submicrométricas: Aspectos teóricos sobre os métodos empregados na atualidade. *Latin American Journal of Pharmacy*, v. 27, p. 780-788, 2008.

ALMEIDA, I. F., BAHIA, M. F. Reologia: interesse e aplicações na área cosmético-farmacêutica. *Cosmetics & Toiletries*, v. 15, p. 96-100, 2003.

ALVAREZ-ROMÁN, R., NAIK, A. KALIA, Y.N., FESSI, H., GUY, R. H. Visualization of skin penetration using confocal laser scanning microscopy. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 58, p. 301-316, 2004.

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

ALVES, M. P., SCARRONE, A. L., SANTOS, M., GUTERRES, S.S. Human skin penetration and distribution of nimesulide from hydrophilic gels containing nanocarriers. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 314, p. 215-220, 2007.

ANSEL, H. C., POPOVICH, N. G., ALLEN, L. V. J. Farmacotécnica - Formas farmacêuticas & sistemas de liberação de fármacos. São Paulo: Premier, p. 281-316, 2000.

ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, Resolução nº 899 de 19 de maio de 2003.

ASPDEN, T., ILLUM, L., SKAUGRUD, O. Chitosan as a nasal delivery system: Evaluation of insulin absorption enhancement and effect on nasal membrane integrity using rat models. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 4, p. 23-31, 1996.

AULTON M. E. Delineamento de formas farmacêuticas. 2. Ed. São Paulo: Editora Artmed, 2005, p. 504-531.

BARNES, H. A., HUTTON, J. F., WALTERS, K. F. R. S. An introduction to rheology, 3. ed. Amsterdam: Elsevier, p. 2-16, 1993.

BARRY, B. W. Novel mechanism and devices to enable successful transdermal drug delivery. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 14, p. 101-114, 2001.

BASSAGANYA-RIERA, J., HONTECILLAS, R. CLA and n-3 PUFA differentially modulate clinical activity and colonic PPAR-responsive gene expression in a pig model of experimental IBD. *Clinical Nutrition*, v. 25, p. 454-456, 2006.

BASSAGANYA-RIERA, J., REYNOLDS, K., MARTINO-CATT, S., CUI, Y., HENNIGHAUSEN, L., GONZALEZ, F., ROHRER, J., BENNINGHOFF, A. U., HOTENCILLAS, R. Activation of PPAR [γ] and [δ] by conjugated linoleic acid

mediates protection from experimental inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, v. 127, p. 777-791, 2004.

BAUMAN, D. E., GRIINARI, J. M. Regulation and nutritional manipulation of milk fat: low-fat milk syndrome. *Livestock Production Science*, v. 70, p. 15-29, 2001.

BAUMGARD, L. H., CORL B. A., DWYER D. A., SAEBO A., BAUMAN D. E. Identification of the conjugated linoleic acid isomer that inhibits fat synthesis. *American Journal of Physiology Regulatory Integrative Comparative Physiology*, v. 278, p.179-184, 2000.

BAUMGARTNER, S., KRISTL, J., VRECER, F., VODOPIVEC, P., ZORKO, B. Optimization of floating matrix tablets and evaluation of their gastric residence time. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 195, p. 125-135, 2000.

BARNES, H. A. Thixotropy- a review. *Journal of Non-Newtonian Fluid Mechanics*, v. 70, p. 1-33, 1997.

BELURY, M. A. Dietary conjugated linoleic acid in health: Physiological Effects and Mechanisms of Action. *Annual Review of Nutrition*, v. 22, p. 505-531, 2002.

BELURY, M. A., MAHUN, A., BANNI, S. The conjugated linoleic acid (CLA) isomer, t10c-12-CLA, is inversely associated with changes in body weight and serum leptin in subjects with type 2 diabetes mellitus. *The Journal of Nutrition*, v. 133, p. 257-260, 2003.

BENFELDT, E., HANSEN, S. H., VOLUND, A., MENNÉ, T., SHAH, V. P. Bioequivalence of topical formulations in humans: evaluation by dermal microdialysis sampling and the dermatopharmacokinetic method. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 127, p. 170-178, 2007.

BENITA, S. Submicron emulsion on drug targeting and delivery. Amsterdam: Harwood Academic Publishers, p. 340, 1998.

BIVAS-BENITA, M., OUDSHOORN, M., ROMEIJN, S., VAN MEIJAGAARDEN, C., KOERTEN, H., VAN DER MEULEN, H., LAMBERT, G., OTTENHOFF, T., BENITA, S., JUNGIENGER, H., BORCHARD, G. Cationic submicron emulsion for pulmonary DNA polymerization. *Journal of Controlled Release*, v. 100, p. 145-155, 2004.

BOLMSTEDT, U. Viscosity & Rheology: Theoretical and practical considerations in liquid food processing. *New Food*, v. 3, i. 2, 2000.

BONFERONI, M. C., GIUNCHEDI, P., SCALIA, S., ROSSI, S., SANDRI, G., CARAMELLA, C. Chitosan gels for the vaginal delivery of lactic acid: relevance of formulation parameters to mucoadhesion and release mechanisms. *AAPS Pharm Sci Tech*, v. 7, p.1-8, 2006.

BOUCHEMAL, K., BRIANÇON, S., PERRIER, E., FESSI, H. Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimization. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 280, p. 241-251, 2004.

BOUNOURE, F., SKIBA, M. L., BESNARD, M., ARNAUD, P., MALLET, E., SKIBA, M. Effect of iontophoresis and penetration enhancers on transdermal absorption of metopimazine. *Journal of Dermatological Sciences*, v. 52, p. 170-177, 2008.

BOUWSTRA, J. A., HONEYWELL-NGUYEN, P. L., GOORIS, G. S., PONEC, M. Structure of the skin barrier and its modulation by vesicular formulations. *Progress in Lipid Research*, v. 42, p. 1-36, 2003.

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

BOUWSTRA, J. A., HONEYWELL-NGUYEN, P. L. Skin structure and mode of action of vesicles. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 54, p. 41-55, 2002.

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

CAPÉK, I. Degradation of kinetically-stable o/w emulsions. *Advances in Colloid Interfacial Science*, v. 107, p. 125-155, 2004.

CARON, J. C., QUEILLE-ROUSSEL, C., SHAH, V. P., SCHAEFER, H. The correlation between the drug penetration and vasoconstriction of hydrocortisone creams in human. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 23, p. 458-462, 1990.

CARVALHO, P. O., CAMPOS, P. R. B., NOFFS, M. D. A., OLIVEIRA, J. G., SHIMIZU, M. T., SILVA, D. M. Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados. *Química Nova*, v. 26, p. 75-80, 2003.

CAZARES-DELGADILLO, J., NAIK, A., KALIA, Y. N., QUINTANAR-GUERRERO, D., GANEM-QUINTANAR, A. Skin permeation renhancement by sucrose esters: a pH-dependent phenomenon. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 297, p. 204-212, 2005.

CHEN, H., CHANG, X. A study of microemulsion systems for transdermal delivery of triptolide. *Journal of Controlled Release*, v. 98, p. 427-436, 2004.

CHORILLI, M., BRIZANTE, A. C., RODRIGUES, C. A., SALGADO, H. R. N. Aspectos gerais em sistemas transdérmicos de liberação de fármacos. *Revista Brasileira de Farmácia*, v. 88, p. 7-13, 2007.

CHUNG, H., KIM, T. W., KWON, M., KWON, I. C., JEONG, S. Y. Oil components modulate physical characteristics and function of the natural oil emulsion as drug or gene delivery system. *Journal of Controlled Release*, v. 71, p. 339-350, 2001.

CONRADS, A., ZAHN, H. A study of the interaction of sodium dodecyl sulphate with the proteins of human heel stratum corneum. *International Journal of Cosmetics Science*, v. 9, p. 29-46, 1987.

CORL, B. A., OLIVER, S. A. M., LIN, X., OLIVER, W. T., MA, Y., HARRELL, R.J., ODLE, J. Conjugated linoleic acid reduces body fat accretion and lipogenic gene expression in neonatal pigs fed low- or high- fat formulas. *The Journal of Nutrition*, v. 3, p. 449-454, 2008.

CORL, B. A., BAUMGARD, L. H., DWYER, D. A., GUIINARI, J. M., PHILLIPS, B. S., BAUMAN, D. E. The role of 9-desaturase in the production of cis-9, trans-11 CLA. *Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 12, p. 622-630, 2001.

CORRÊA, N. M., CAMARGO JUNIOR, F. B., IGNÁCIO, R. F., LEONARDI, G. R. Avaliação do comportamento reológico de diferentes géis hidrofílicos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.41, p.73-78, 2005.

COSTA SILVA, H. S. R., DOS SANTOS, K. S. C. R., FERREIRA, E. I. Quitosana: Derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. *Química Nova*, v. 29, n. 4, p. 776-785, 2006.

DAMASCENO, B. P. G. L. Estudo do comportamento físico-químico e farmacotoxicológico da anfotericina B em microemulsões do tipo O/A. 2005. 70f. [Dissertação de Mestrado. Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Rio Grande do Norte].

DEL BLANCO, L. F., RODRIGUEZ, M. S., SCHULZ, P. C., AGUILLÓ, E. Influence of the deacetylation degree on chitosan emulsification properties. *Colloid & Polymer Science*, v. 277, p. 1087-1092, 1999.

DELGADO-CHARRO, M. B., IGLESIAS-VILAS, G., BLANCO-MÉNDEZ, J., LÓPEZ-QUINTELA, M. A., MARTY, J. P., GUY, R. H. Delivery of a hydrophilic solute through the skin from novel microemulsion systems. *European Journal Pharmaceutics Biopharmaceutics*, v. 43, p. 37-42, 1997.

DODANE, V., KHAN, M. A., MERWIN, J. R. Effect of chitosan on epithelial permeability and structure. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 182, p. 21-32, 1999.

DORA, C. L., SILVA, L. F. C., TAGLIARI, M. P., SILVA, M. A. S., LEMOS-SENNA, E. Formulation study of quercetin-loaded lipid-based nanocarriers obtained by hot solvent diffusion method. *Latin American Journal of Pharmacy*, v. 30, p. 289-296, 2011.

DREHER, F., WALDE, P., WEHRLI, E. Interaction of a lecithin microemulsion gel with human stratum corneum and its effect on transdermal transport. *Journal of Controlled Release*, v. 45, p. 131-140, 1997.

EL MAGHRABY, G. M., BARRY, B. W., WILLIAMS, A. C. Liposomes and skin: from drug delivery to model membranes. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 34, p. 203-222, 2008.

ESCOBAR-CHÁVEZ, J. J., MERINO-SANJUÁN, V., LÓPEZ-CERVANTES, M., URBAN-MORLAN, Z., PIÑÓN-SEGUNDO, E., QUINTANAR-GUERRERO, D., GANEM-QUINTANAR, A. The tape stripping technique as a method for drug quantification in skin. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Science*, v.11, p. 104-130, 2008.

EVANS, M., GEIGERMAN, C., COOK, J., CURTIS, L., KUEBLER, B., MCINTOSH, M. Conjugated linoleic acid suppresses triglyceride accumulation and induces apoptosis in 3T3-L1 preadipocytes. *Lipids*, v. 35, p. 899-910, 2000.

Farmacopéia Americana – USP 24. Ed. Rockville: US Pharmacopeial Convention, 1989.

FASOLO, D., LIEGE, S., HOLZSCHUH, M., BASSANI, V., TEIXEIRA, H. Validation of an isocratic LC method for determination of quercetin and methylquercetin in topical nanoemulsions. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 44, p. 1174-1177, 2007.

FERNANDEZ, P., ANDRE, V., RIEGER, J., KUHMLE, A. Nano-emulsions formation by emulsions phase inversion. *Colloids and Surfaces: A physicochemical and Engineering Aspects*, v. 251, p. 53-58, 2004.

FERRARI, M. *Desenvolvimento e avaliação da eficácia fotoprotetora de emulsões múltiplas contendo metoxicinamato de etilexila e óleo de andiroba (Carapa guyanensis)*. Ribeirão Preto, 2002. 142p. [Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo].

FORMARIZ, T. P. *Incorporação da doxorubicina em microemulsões estabilizadas por fosfatidilcolina de soja e estudo da atividade antiproliferativa in vitro através de culturas de células*. 2004. 199f. [Dissertação de Mestrado. Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, São Paulo].

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

FRANTZ, S. W. Instrumentation and methodology for in vitro skin diffusion cells in methodology for skin absorption. In: KEMPPAINEN, B. W., REIFENRATH, W. E. (eds) *Methods for Skin Absorption*. Boca Raton: CRC, p. 35-59, 1990.

FRESNO CONTRERAS, M. J., JIMÉNEZ SORIANO, M. M., RAMÍREZ DIÉGUEZ, A. In vitro percutaneous absorption of all-trans retinoic acid applied in free form or encapsulated in stratum corneum lipid liposomes. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 297, p. 134-145, 2005.

FRIEDMAN, D. I., SCHWARZ, J. S., WEISSPAPIR, M. Submicron emulsion vehicle for enhanced transdermal delivery of steroidal and nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Journal of Pharmaceutical Science*, v. 84, p. 324-329, 1995.

GARTNER, Leslie P.; HIATT, James L. *Tratado de histologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

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

GEVE, G. Lipid vesicles and other colloids as drug carriers on the skin. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 56, p. 675– 711, 2004.

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

GOLDIM, J. R. *Pesquisa em saúde e direito dos animais*. Porto Alegre: HCPA, 1995.

GRIINARI, J. M., DWYER, D. A., MCGUIRE, M. A., BAUMAN, D E., PALMQUIST, D. L., NURMELA, K. V. V. Trans-octadecenoic acids and milk fat depression in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 81, p. 1251-1261, 1998.

GUARATINI, T.; GIANETI, M.D.; MAIA CAMPOS, P.M.B.G. Stability of cosmetic formulations containing esters of Vitamins E and A: chemical and physical aspects. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 327, n.1/2, p. 12-16, 2006.

- HADGRAFT, J. Skin, the final frontier. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 224, p. 1-18, 2001.
- HADGRAFT, J. Skin deep. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 58, p. 291-299, 2004.
- HADGRAFT, J., LANE, M. E. Skin permeation: the years of enlightenment. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 305, p. 2-12, 2005.
- HAQ, M. I., SMITH, E., JOHN, D. N., KALAVALA, M., EDWARDS, C., ANSTEY, A., MORRISSEY, A., BIRCHALL, J. C. Clinical administration of microneedles: skin puncture, pain and sensation. *Biomedical Microdevices*, v. 11, p. 35-47, 2009.
- HARDING, C. R. The stratum corneum: structure and function in health and disease. *Dermatol Ther*, v. 17, p. 6-15, 2004.
- HARFOOT, C.G.; HAZLEWOOD, G.P. Lipid metabolism in the rumen. In: HOBSON, P.N.; STEWART, C.S. (Eds.). *The rumen microbial ecosystem*. 2.ed. Great Britain: Blackie Academic & Professional, p. 467-491, 1997.
- HAYEK, M. G., HAN, S. N., WU, D., WATKINS, B. A., MEYDANI, M., DORSEY, J. L., SMITH, D. E., MEYDANI, S. N. Dietary conjugated linoleic acid influences the immune response of young and old C57BL/6NCrIBR mice. *The Journal of Nutrition*, v. 129, p. 129, 132-38, 1999.
- HERNÁNDEZ, A., CANO, M. P. High-pressure and temperature affects on enzyme inactivation in tomato puree. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 46, p. 266-270, 1998.
- HOELLER, S., SPERGER, A., VALENTA, C. Lecithin based nanoemulsions: A comparative study of the influence of non-ionic surfactants and the cationic phytosphingosine on physicochemical behavior and skin permeation. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 370, p. 181-186, 2009.
- ICH - INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION. Validation of analytical procedures: methodology, Q2B, 2005.
- ILLUM, L., FARRAJ, N., DAVIS, S. Chitosan as a novel nasal delivery system for peptide drugs. *Pharmaceutical Research*, v. 11, p. 1186-1189, 2004.
- ILLUM, L., WATTS, P., FISHER, A. N., HINCHCLIFFE, M., NORBURY, H., JABBAL-GILL, I., NANKERVIS, R., DAVIS, S. S. Intranasal delivery of morphine. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 301, p. 391-400, 2002.
- INOUE, N., NAGAO, K., HIRATA, J., WANG, Y. M., YANAGITA, T. Conjugated linoleic acid prevents the development of essential hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 323, p. 679-684, 2004.
- IP, C., BANNI, S., ANGIOINE, E., CARTA, G., MCGINLEY, J., THOMPSON, H. J., BARBANO, D., BAUMAN, D. Conjugated linoleic acid-enriched butter fat alters mammary gland morphogenesis and reduces cancer risk in rats. *The Journal of Nutrition*, v. 129, p. 2135-2142, 1999.

- ISLAM, M. A., KIM, Y. S., JANG, W. J., LEE, S. M., KIM, H. G., KIM, S. Y., KIM, J. O., HA, Y. L. A mixture of trans, trans conjugated linoleic acid induces apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells with reciprocal expression of Bax and Bcl-2. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 56, p. 5970–5976, 2008.
- JIANG, J., BJOERCK, L., FONDÉN, R., EMANUELSON, M. Occurrence of conjugated cis-9, trans-11-octadecadienoic acid in bovine milk: effects of feed and dietary regimen. *Journal of Dairy Science*, v. 79, p. 438-445, 1996.
- JOSÉ, A. A. F. B. V., GAMA, M. A. A. S., LANNA, D. D. P. Effects of trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid on gene expression and lipid metabolism of adipose tissue of growing pigs. *Genetics and Molecular Research*, v. 7, p. 284-294, 2008.
- JUMMA, M., MULLER, B. W. Physicochemical properties of chitosan-lipid emulsions and their stability of parenteral fat emulsions. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 163, p. 81-89, 1998.
- JUNYAPRASERT, V. B., TEERANACHAIDEEKUL, V., SOUTO, E. B., BOONME, P., MULLER, R. H. Q10-loaded NLC versus nanoemulsions: stability, rheology and *in vitro* skin permeation. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 377, p. 207-214, 2009.
- KANG, K., PARIZA, M. W. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 287, p. 377-382, 2001.
- KELLEY, N. S., HUBBARD, N. E., ERICKSON, K. L. Conjugated linoleic acid isomers and cancer. *The Journal of Nutrition*, v. 137, p. 2599-2607, 2007.
- KELMANN, R. G., KUMINEK, G., TEIXEIRA, H. F., KOESTER, L. S. Carbamazepine parenteral nanoemulsions prepared by spontaneous emulsification process. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 342, p. 231-239, 2007.
- KIM, Y. C., PARK, J. H., LUDOVICE, P. J., PRAUSNITZ, M. R. Synergistic enhancement of skin permeability by N-lauroylsarcosine and ethanol. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 352, p. 129-138, 2008.
- KIM, B. S., WON, M., LEE, K. M. In vitro permeation studies of nanoemulsions containing ketoprofen as a model drug. *Drug Delivery*, v. 15, p. 465-469, 2008.
- KREILGAARD, M. Influence of microemulsions on cutaneous drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 54, p. 77-98, 2002.
- KRIWET, K., MULLERGOYMANN, C. C. Diclofenac release from phospholipid drug systems and permeation through excised human stratum-corneum. *International Journal of Pharmaceutics*, v.125, p. 231-242, 1995.
- KUHNT K., KRAFT, J., MOECKEL P., JAHREIS, G. Trans-11-18: 1 is effectively Delta 9- desaturated compared with trans-12–18: 1 in humans. *The Journal of Nutrition*, v. 95, p. 752–761, 2006.
- KUMAR, N. M. V. R. A review of chitin and chitosan applications. *Reactive & functional polymers*, v. 16, p. 1-27, 2000.
- LABA, D. Rheological properties of cosmetics and toiletries. New York: Marcel Dekker, p. 09-33, 1993.

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.

LANGEVIN, D. Microemulsions. *Accounts of Chemical Research*, v. 21, p. 255-260, 1988.

LAROSA, P. C., MINER, J., XIA, Y., ZHOU, Y., KACHMAN, S., FROMM, M. E. Trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid causes inflammation and delipidation of white adipose tissue in mice: a microarray and histological analysis. *Physiological Genomics*, v. 27, p. 282-294, 2006.

LASHMAR, U. T., HADGRAFT, J., THOMAS, N. Topical application of penetration enhancers to the skin of nude mice: a histopathological study. *Journal of Pharmaceutical and Pharmacology*, v. 41, p. 118-122, 1989.

LEONARDI, G. R., MAIA CAMPOS, P. M. B. G. Estabilidade de formulações cosméticas. *International Journal of Pharmaceutical Compounding*, v. 3, p.154-156, 2001.

LI, G., DONG, B., BUTZ, D. E., PARK, Y., PARIZA, M. W., COOK, M. E. NF-kappaB independent inhibition of lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase by a conjugated linoleic acid cognate, conjugated nanodecadienoic acid. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1761, p. 969-972, 2006.

LINDEMANN, U.; WILKEN, K., WEIGMANN, H. J., SCHAEFER, H., STERRY, W., LADEMANN, J. Quantification of the horny layer using tape stripping and microscopy techniques. *Journal of Biomedical Optics*. v. 8, n. 4, p. 601-607, 2003.

LOSCHER, C. E., DRAPER, E., LEAVY, O., KELLEHER, D., MILLS, K. H., ROCHE, H. M. Conjugated linoleic acid suppresses NF-kappa B activation and IL-12 production in dendritic cells through ERK-mediated IL-10 induction. *The Journal of Immunology*, v. 175, p. 4990-4998, 2005.

MADISON, K. C. Barrier function of the skin: "La Raison d'être" of the epidermis. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 121, p. 231-241, 2003.

MAIA CAMPOS, P. M. B. G., BONTEMPO, E. M. B. G., LEONARDI, G. R. *Formulário Dermocosmético*. São Paulo: Tecnopress Editora e Publicidade, v. 2, p.37-38, 1999.

MARTIN, A. N. *Physical pharmacy*. 4.ed. London: Lea & Febiger, p. 453-473, 1993.

MARTIN, C. A., ALMEIDA, V. V., RUIZ, M. R., VISENTAINER, J. E. L., MATSHUSHITA, M., SOUZA, N. E., VISENTAINER, J. V. Ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 e ômega-6: importância e ocorrência em alimentos. *Revista de Nutrição*, v. 19, p. 761-770, 2006.

MARRA, F., LEVY, J. L., SANTI, P., KALIA, Y. N. In vitro evaluation of the effect of eletrotreatment on skin permeability. *Journal of Dermatology*, v. 7, p. 105-111, 2008.
MASSO-WELCH, P. A., ZANGANI, D., IP, C., VAUGHAN, M. M., SHOEMAKER, S. F., SO, M., IP, M. M. Isomers of conjugated linoleic acid differ in their effects on angiogenesis and survival of mouse mammary adipose vasculature. *The Journal of Nutrition*, v. 134, p. 299-307, 2004.

MATETI, A., JUKANTI, R., BANDARI, S., VEERAREDDY, P. R. *In vitro* transcutaneous permeation of acyclovir sodium from HPMC gels: role of chemical permeation enhancers. *Latin American Journal of Pharmacy*, v. 29, p. 861-868, 2010.

MENON, G. K. New insights into skin structure: scratching the surface. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.54, p. 3-17, 2002.

MITCHELL, P. L.; MCLEOD, R. S. Conjugated linoleic acid and atherosclerosis: studies in animal models. *Biochemistry and Cell Biology*, v. 86, p. 293-301, 2008.

MOSER, K., KRIWET, K., NAIK, A., KALIA, Y. N., GUY, R. H. Passive Skin Penetration Enhancement and its Quantification In Vitro. *European Journal Pharmaceutics Biopharmaceutics*, v. 52, p. 103-112, 2001.

NAGAO, K., INOUE, N., WANG, M. Y., HIRATA, J., SHIMADA, Y., NAGAO, T., MATSUI, T., YANAGITA, T. The 10trans, 12cis isomer of conjugated linoleic acid suppresses the development of hypertension in Otsuka Long-Evans Tokushima fatty rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 206, p. 134-138, 2003.

NAGAO, K., WANG, Y. M., INOUE, N., HAN, S. Y., BUANG, Y., NODA, T., KOUDA, N., OKAMATSU, H., YANAGITA, T. The 10trans, 12cis isomer of conjugated linoleic acid promotes energy metabolism in OLETF rats. *Nutrition*, v. 19, p. 652-656, 2003.

NAIRN, J. G. Solutions, emulsions, suspensions and extracts, In: GENARO, A. R. (Ed) *Remington: The Science and Practice on Pharmacy*, 20 ed Easton Mack, p. 741-744, 2000.

NAKAJIMA, H., TOMOSSA, S., OKABE, M. *First Emulsion Conference*, Paris, 1993.

OHNUKI, K., HARAMIZU, S., OKI, K., ISHIHARA, K., FUSHIKI, T. A. A single oral administration of conjugated linoleic acid enhanced energy metabolism in mice. *Lipids*, v. 37, p. 583-587, 2001.

OLIVEIRA, A. G., SCARPA, M. V., CORREA, M. A., CERA, L. F. R., FORMARIZ, T. P. Microemulsões: estrutura e aplicações como sistema de liberação de fármacos. *Química Nova*, v. 27, p. 131-138, 2004.

PARK, Y., PARIZA, M. W. Mechanisms of body fat modulation by conjugated linoleic acid (CLA). *Food Research International*, v. 40, p. 311-323, 2007.

PARK, Y., YANG, M., STORKSON, J.M., ALBRIGHT, K.J., LIU, W., COOK, M.E., PARIZA, M. W. Effects of CLA isomers on serum tumor necrosis factor- α concentration in mice. *Journal of Food Biochemistry*, v. 31, p. 252-265, 2007.

PEKEL, N., YOSHII, F., KUME, T., GÜVEN, O. Radiation crosslinking of biodegradable hydroxypropylmethylcellulose. *Carbohydrate Polymers*, v. 55, p.139-147, 2004.

PETERSON, D. G., BAUMGARD, L. H., BAUMAN, D. E. Milk fat response to low doses of trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid (CLA). *Journal of Dairy Science*, v. 85, p.1764–1766, 2002.

PEY, C. M., MAESTRO, A., SOLÉ, I., GONZÁLEZ, C., SÓLANS, C., GUTIÉRREZ, J. M. Optimization of nano emulsions prepared by low energy emulsification methods at

Constant temperature using factorial design study. *Colloids and Surfaces: A physicochemical and Engineering Aspects*, v. 288, p. 144-150, 2006.

PLESSIS, J. D., PUGH, W. J., JUDEFEIND, A., HADGRAFT, J. Physico-chemical determinants of dermal drug delivery: effects of the number and substitution pattern of polar groups. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 16, p. 107-112, 2002.

POIRIER, H., SHAPIRO, J. S., KIM, R. J., LAZAR, M. A. Nutritional supplementation with trans-10, cis-12-conjugated linoleic acid induces inflammation of white adipose tissue. *Diabetes*, v. 55, p. 1634-1641, 2006.

POTTS, R. O., GUY, R. H. Predicting skin permeability. *Pharmaceutical Research*, v. 9, p. 663-669, 1992 *apud* HADGRAFT, J. Skin deep. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 58, p. 291-299, 2004.

PRAUSNITZ, M. R., MITRAGOTRI, S., LANGER, R. Current status and future potential of transdermal drug delivery. *Nature Reviews*, v. 3, p. 115-124, 2004.

PRIEMI, M. P. Y., KORNER, D., BENITA, S., MARTY, J. P. Positively and negatively charged submicron emulsion for enhanced topical delivery of antifungal drugs. *Journal of Control Release*, v. 58, p. 177-187, 1999.

PRIMO, F. L., MICHIELETO, L., RODRIGUES, M. A. M., MACAROFF, P. P., MORAIS, P. C., LACAVA, Z. G. M., BENTILEY, M. V. L. B., TEDESCO, A. C. Magnetic nanoemulsions as drug delivery system for Foscan®: Skin permeation and retention in vitro assays for topical application in photodynamic therapy (PDT) of skin cancer. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, v. 311, p. 354-357, 2006.

POTTS, R. O. 1989. Physical characterization of the stratum corneum: The relationship of mechanical and barrier properties to lipid protein structure. In: HADGRAFT, J., GUY, R. H. *Transdermal Drug Delivery*. New York: Marcel Dekker, 2003, v. 35, p. 23-57.

RAMAKERS, J.D., PLAT.J., SEBEDIO, J., MENSINK, R.P. Effects of the individual isomers cis-9, trans-11 vs. trans-10, cis-12 of conjugated linoleic acid (CLA) on inflammation parameters in moderately overweight subjects with LDL-Phenotype B. *Lipids*, v. 40, p. 909-918, 2005.

RAPHAELIDES, S., GEORGIADIS, N. Effect of fatty acids on the rheological behaviour of pea starch dispersions during heating. *Food Hydrocoll.*, v. 21, n. 7, p.1188-1200, 2007.

REYNOLDS, C. M., ROCHE, H. M. Conjugated linoleic acid and inflammatory cell signalling. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, v. 82, p. 199-204, 2010.

RISERUS, U., ARNER, P., BRISMAR, K.; VESSBY, B. Treatment with dietary trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid causes isomer-specific insulin resistance in obese men with the metabolic syndrome. *Diabetes Care*, v. 25, p. 1516-1521, 2002.

RISERUS, U., BERGGLUND, L., VESSBY, B. Conjugated linoleic acid (CLA) reduced abdominal adipose tissue in obese middle-aged men with signs of the metabolic syndrome: a randomized controlled trial. *International Journal of Obesity*, v. 25, p. 1129-1135, 2001.

RIZWAN, M., AQIL, M., TALEGAONKAR, S., AZEEM, A., SULTANA, Y., ALI, A. Enhanced transdermal drug delivery techniques: an extensive review of patents. *Recent Patentes in Drug Delivery & Formulation*, v. 59, p. 427-443, 2009.

RODRÍGUEZ, M. S., ALBERTENGO, L. A., E.AGULLÓ, E. Emulsificaton capacity of chitosan. *Carbohydrate Polymers*, v. 48, p. 271-276, 2002.

SAKEENA, M. H. F., ELRASHID, S. M., MUNAVVAR, A. S., AZMIN, M. N. Effects of oil and drug concentrations on droplets size of palm oil esters (POEs) nanoemulsion. *Journal of Oleo science*, v. 60, p. 155-158, 2001.

SAKULKU, U., NUCHUCHUA, O., UAWONGYART, N., PUTTIPIPATKHACHORN, S., SOOTTITANTAWAT, A., RUKTANONCHAIU, U. Characterization and mosquito repellent activity of citronella oil nanoemulsion. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 372, p. 105-111, 2009.

SAJJADI, S. Nanoemulsion formation by phase inversion emulsification: on the nature of inversion. *Langmuir*, v. 22, p. 5597-5603, 2006.

SANNA, V., GAVINI, E., COSSU, M., RASSU, G., GIUNCHEDI, P. Solid lipid nanoparticles (SLN) as carriers for the topical delivery of econazole nitrate: in-vitro characterization, ex-vivo and in-vivo studies. *Journal of Pharmaceutical Pharmacology*, v. 59, p. 1057-64, 2007.

SANTORA J. E., PALMQUIST, D. L., ROEHRIG, K. L. Trans-vaccenic acid is desaturated to conjugated linoleic acid in mice. *The Journal of Nutrition*, v. 130, p. 208–215, 2000.

SCHRAMM, G. Reologia e reometria: fundamentos teóricos e práticos. São Paulo: Artliber, p. 281, 2006.

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

SCHULMAN, J. H.; ROBERTS, T. S. Transactions of the Faraday Society, 42b, p.165, 1976. In: ROBB, I.D.: Microemulsions. New York: Plenum Press, 1982.

SCHMID, M. H., KORTING, H. C. Liposomes for atopic dry skin: the rationale for a promising approach. *Clinical Investigation*, v. 71, p. 649-653, 1993.

SCWARZ, J. S., WEISSPAPIR, M. R., SHANI, A., AMSELEM, S. Enhanced antiinflammatory activity of diclofenac in jojoba oil submicron emulsion cream. *Journal of Applied Cosmetology*, v. 14, p. 19-24, 1996.

SENEL, S., HINCAL, A. Drug permeation enhancement via buccal route: possibilities and limitations. *Journal of Controlled Release*, v. 72, p. 133-144, 2001.

SHABIR, G. A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis. Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. *Journal of Chromatography A*, v. 987, p. 57-66, 2003.

- SHAH, P., BHALODIA, D., SHELAT, P. Nanormulsion: A pharmaceutical review. *Systematic Reviews in Pharmacy*, v. 1, p. 24-32, 2010.
- SHAH, V. P. Skin penetration enhancers: scientific perspectives. In: HSIEH, D. S. *Drug Permeation Enhancement: theory and applications*. New York: Mearcel Dekker, cap.2, 1994.
- SILVA, H. S. R. C., SANTOS, K. S. C. R., FERREIRA, E. I. Quitosana: Derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. *Química Nova*, v. 29, p. 776-785, 2006.
- SILVA, A. P. C., KOESTER, L. S., MAYORGA, P., BASSANI, V. L., TEIXEIRA, H. Development and validation of a LC method for determination of genistein in topical nanoemulsions. *Pharmazie*, v. 62, p. 732-734, 2007.
- SILVA, A. P. C., NUNES, B. R., OLIVEIRA, M. C., KOESTER, L. S., MAYORGA, P., BASSANI, L. Development of topical nanoemulsions containing the isoflavone genistein. *Pharmazie*, v. 64, p. 32-35, 2009.
- SINKO, J. P., Martin: físico-farmácia e ciências farmacêuticas. 5. Ed. São Paulo: Editora Artmed, p. 318-322, 2008.
- SINTOV, A. C., SHAPIRO, L. New microemulsion vehicle facilitates percutaneous penetration in vitro and cutaneous drug bioavailability in vivo. *Journal Controlled Release*, v. 95, n. 2, p. 173-183, 2004.
- SMITH, J. M., WOOD, E. J. Chitosan as a potential aid to transdermal drug delivery. *Agro Food Industry Hi-Tech*, v. 14, p. 46, 2003.
- SOEL, S. M., CHOI, O. S., BANG, M. H., PARK, J. H. Y., KIM, W. K. Influence of conjugated linoleic acid isomers on the metastasis of colon cancer cells in vitro and in vivo. *Journal of Nutritional Biochemistry*, v.18, p.650-657, 2007.
- SOLÉ, I., MAESTRO, A., PEY, C. M., GONZÁLEZ, C., SOLANS, C., GUTIÉRREZ, J. M. Nano- emulsions preparation by low energy methods in an ionic surfactant system. *Colloids and Surfaces: A Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 288, p. 138-143, 2006.
- SONNEVILLE-AUBRUN, O., SIMONNET, J. T., L'ALLORET, F. Nanoemulsions: a new vehicle for skincare products. *Advances in Colloid and Interface Science*, v. 109, p. 145-149, 2004.
- SHAKEEL, F., BABOOTA, S., AHUJA, A., ALI, J., AQIL, M., SHAFIQ, S. Nanoemulsions as vehicles for transdermal delivery of aceclofenac. *AAPS Pharm SciTech*, v. 104, p. E1-E9, 2007.
- SHOKRI, J., NOKHODCHI, A., DASHBOLAGHI, A., HASSAN-ZADEH, D., GHAFOURIAN, T., JALALI, M. B. The effect of surfactants on the skin penetration of diazepam. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 228, p. 99-107, 2001.
- STACHOWSKA, E., BASKIEWICZ-MASIUK, M., DZIEDZIEJKO, V., ADLER, G., BOBER, J., CHLUBEK, D., MACHALIN, B. Conjugated linoleic acids can change phagocytosis of human monocytes/macrophages by reduction in cox-2 expression. *Lipids*, v. 42, p.707-716, 2007.

STEFFE, J. F. Rheological methods in food process engineering. 2. ed. Michigan: Freeman, 1996.

STEINHART, C. Conjugated linoleic acid the good news about animal fat. *Journal of Chemical Education*, v. 73, p. 302-308, 1996.

STOREY, A., ROGERS, J. S., MCARDLE, F., JACKSON, M. J., RHODES, L.E. Conjugated linoleic acids modulate UVR-induced IL-8 and PGE2 in human skin cells: potential of CLA isomers in nutritional photoprotection. *Carcinogenesis*, v.28, p.1329–1333, 2007.

TABOSA DO EGITO, E. S., FESSI, H., APPEL, G., BARRATT, G., LEGRAND, P., BOLARD, J., DEVISSAGUET, J. P. A morphological study of na amphotericin B emulsion-based delivery system. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 145, p. 17-27, 1996.

TADROS, T. Application of rheology for assessment and prediction of the long-term physical stability of emulsions. *Advanced Colloid Interface Science*, v.108/109, p.227-258, 2004.

TADROS, T. F., IZQUIERDO, P., ESQUENA, J. Formation and stability of nano-emulsions. *Advances in Colloid and Interface Science*, v. 108, p. 303-318, 2004.

TADROS, T. H. F., VANDAMME, A., LEVECKE, B., BOOTEN, K., STEVENS, C. V. Stabilization of emulsions using polymeric surfactants based on insulin. *Advances in Colloid and Interface Science*, v.108/109, p.207-226, 2004.

TAGNE, J. B., KAKUMANU, S., NICOLOSI, R. J. A nano-emulsion formulation pf tamoxifen increases its efficacy in a breast cell line. *Molecular Pharmaceutics*, v. 5, p. 1055-1063, 2008.

TEIXEIRA, H., DUBERNET, C., CHACUN, H., RABINOVICH, L., BOUTET, T., DEVERRE, J. R., BENITA, S., COUVEUR, P. Cationic emulsions improves the delivery of oligonucleotides to leukemic P388/ADR cell in ascite. *Journal of Controlled Release*, v. 89, p. 473-482, 2003.

THANOU, M., NIHOT, M., JANSEN, M., VERHOEF, J., JUNGIGER, H. Mono-N-carboxymethylated chitosan (MCC), a polyampholytic chitosan derivative, enhances the intestinal absorption properties of low molecular weight heparin in rats. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 90, p. 38-46, 2001.

TOOMEY, S., HARHEN, B., ROCHE, H. M., FITZGERALD, D., BELTON, O. Profound resolution of early atherosclerosis with conjugated linoleic acid. *Atherosclerosis*, v. 187, p. 40-49, 2006.

TROTTA, M., PATTARINO, F., IGNONI, T. Stability of drug-carrier emulsions containing phosphatidylcholine mixtures. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 53, p. 203-208, 2002.

TROTTA, M., GASCO, M. R. Transcutaneous diffusion of hematoporphyrin in photodynamic therapy: in vitro release from microemulsion. *STP Pharmaceutics Science*, v. 4, p. 150-154, 1994.

VALENTA, C., NOWAK, M., HADGRAFT, J. Influence of phloretin and 6-ketocholestanol on the permeation of progesterone through porcine skin. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 217, p. 79-86, 2001.

VANDAMME, T. F. Microemulsions as ocular drug delivery systems: recent developments and future challenges. *Progress in Retinal and Eye Research*, v. 21, p. 15-34, 2002.

VIEGAS JR, C., BOLZANI, V. S., BARREIRO, E.J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. *Química Nova*, v. 29, p. 326-337, 2006.

VITALE, S. A., KATZ, J. Liquid droplet dispersions formed by homogeneous liquid-liquid nucleation: "The Ouzo Effect". *Langmuir*, v. 19, p. 4105-4110, 2003.

VUEBA, M. L., CARVALHO, L. A. E. B., VEIGA, F., SOUSA, J. J., PINA, M. E. Influence of cellulose ether polymers on ketoprofen release from hydrophilic matrix tablets. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 58, p. 51- 59, 2004.

WANG, L., TABOR, R., EASTOE, J., LI, X., HEENANC, R. K., DONG, J. Formation and stability of nanoemulsions with mixed ionic-nonionic surfactants. *Physical Chemistry Chemical Physics*, v. 11, p. 9772-9778, 2009.

WHIGHAM, L.D., WATRAS, A.C., SCHOELER, D.A. Efficacy of conjugated linoleic acid for reducing fat mass: a meta-analysis in humans. *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 85, p. 1203-1211, 2007.

WICKETT, R. R., VISSCHER, M. O. Structure and function of the epidermal barrier. *American Journal of Infection Control*, v. 34, p. 98-110, 2006.

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

WOOD J. H. Reologia farmacêutica. In: LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H. A.; KANIG, J.L., (Eds.). *Teoria e prática na indústria farmacêutica*. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, v. 2, p.211-253, 2001.

WU, H. L.; RAMACHANDRAN, C. Topical transport of hydrophilic compounds using water-in-oil nanoemulsions. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 220, p. 63-75, 2001.

YASAR, F., TOGRUL, H., ARSLAN, N. Flor properties of cellulose and carboxymethyl cellulose from orange peel. *Journal of Food Engineering*, v. 81, p. 187-199, 2007.

YILMAZ, E., BORCHERT, H. H. Design of a phytosphingosine-containing, positively-charged nanoemulsion as a colloidal carrier system for dermal application of ceramides. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 60, p. 91-98, 2005.

YILMAZ, E., BORCHERT, H. H. Effect of lipid-containing, positively charged nanoemulsions on skin hydration, elasticity and erythema – An in vivo study. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 307, p. 232-238, 2006.

YOKOMIZO, Y., SAGITANI, H. The effects of phospholipids on the percutaneous penetration of indomethacin through the dorsal skin of guinea pig in vitro. *Journal of Controlled Release*, v. 42, p. 37–46, 1996.

YU, W., TABOSA DO EGITO, E. S., BARRATT, G., FESSI, H., DEVISSAGUET, J. P., PUISIEUX, F. A novel approach to the preparation of injectable emulsions by a spontaneous emulsification process. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 89, p. 139-146, 1993.

YU, L. Free radical scavenging properties of conjugated linoleic acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 49, p. 3452–3456, 2001.

YU, Y., CORRELL, P. H., HEUVEL, J. P. Conjugated linoleic acid decreases production of pro-inflammatory products in macrophages: evidence for a PPAR [gamma]-dependent mechanism. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1581, p. 89-99, 2002.

XU, X., LUO, J. Marangoni flow in an evaporating water droplet. *Applied Physics Letters*, v. 91, 124102, 2007.

ZACCARON, M. C., OLIVEIRA, R. V. B., GUIOTOKU, M., PIRES, A. T. N., SOLDI, V. Blends of hydroxypropylmethylcellulose and poly(1-vinylpyrrolidone-co-vinyl acetate): Miscibility and thermal stability. *Polymer Degradation and Stability*, v. 90, p. 21-27, 2005.

ZELLMER, S., PFEIL, W., LASCH, J. Interaction of phosphatidylcholine liposomes with the human stratum corneum. *Biochimica Biophysica Acta*, v. 1237, p. 176–182, 1995.

ZHAO, L., YIN, J., LI, D., LAI, C., CHEN, X., MA, D. Conjugated linoleic acid can prevent tumor necrosis factor gene expression by inhibiting nuclear factor binding activity in peripheral blood mononuclear cells from weaned pigs challenged with lipopolysaccharide, v. 59, p. 429-438, 2005.

ZHOU, H., YUE, Y., LIU, G., LI, Y., ZHANG, J., GONG, Q., YAN, Z., DUAN, M. Preparation and characterization of a lecithin nanoemulsion as a topical delivery system. *Nanoscale Research Letters*, v. 5, p. 224-230, 2009.

www.malvern.com acessado em outubro de 2011.

<http://www.keystone-scientific.co.jp/.../franz/FAQ.html>. acessado em setembro de 2011.