

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Carolina Assunção Lucas da Silva

AVALIAÇÃO DA PERMEAÇÃO CUTÂNEA DE ADAPALENO A  
PARTIR DE DIFERENTES FORMULAÇÕES COMERCIAIS

Brasília, 2017

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

AVALIAÇÃO DA PERMEAÇÃO CUTÂNEA DE ADAPALENO A  
PARTIR DE DIFERENTES FORMULAÇÕES COMERCIAIS

Orientanda: Carolina Assunção Lucas da  
Silva

Matrícula: 12/0009064

Orientador: Prof. Dr. Guilherme M. Gelfuso

Co-orientadora: Mestra Paula M. de  
Oliveira

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado à Universidade de Brasília  
como requisito parcial para obtenção de  
grau Farmacêutico

Brasília, 2017

## AGRADECIMENTOS

*Primeiramente, agradeço ao Universo por todas as oportunidades de crescimento pessoal e profissional durante toda a graduação.*

*A minha mãe, por sempre ter me incentivado a estudar e por todo amor e carinho.*

*Ao meu pai, que sempre acreditou em mim.*

*Ao meu namorado **Rodrigo Carvalho**, por todo apoio em todos os momentos (bons e ruins), por todo amor, carinho e por sempre acreditar em mim.*

*Ao meu orientador, **Prof. Dr. Guilherme Gelfuso** pela oportunidade, atenção e paciência comigo.*

*A minha Co-orientadora, **Paula Martins**, por todo aprendizado pessoal e profissional durante todo o período de realização deste trabalho.*

*Aos colegas que fiz no Laboratório de Tecnologia de Medicamentos, Alimentos e Cosméticos (LTMAC), que me receberam tão bem. Em especial: **Maira Nunes Pereira**, por todos os conselhos, por todo carinho e paciência e **Ricardo Nunes** pelo carinho e por ter me ajudado em todos os momentos.*

*Aos meus colegas de curso e em especial: **Aline Fernandes** e **Bruna Caroline**, que me apoiaram em todos os momentos.*

*À minha melhor amiga de infância, **Fernanda Lira**, que sempre esteve comigo em todos os momentos, oferecendo apoio emocional, força e sempre me lembrando de ter fé em todas as situações.*

*Aos meus amigos, pelo incentivo e pelo companheirismo.*

*À Universidade de Brasília, pelo excelente ensino e por todas as oportunidades acadêmicas.*

*Por fim, sou grata a todos que contribuíram para que eu chegasse até aqui.*

## RESUMO

A *acne vulgaris* (AV) é uma doença inflamatória causada pelo bloqueio das unidades pilosebáceas da pele associada a múltiplos fatores, afetando pacientes do sexo feminino e masculino. O tratamento da acne pode envolver vários grupos farmacológicos, como por exemplo, antibióticos de uso tópico, queratolíticos e retinoides. Entre esses grupos farmacológicos, os retinoides estão no topo do tratamento da AV nos últimos 25 anos. O Adapaleno (ADP) é um retinoide sintético de terceira geração amplamente usado na terapia dermatológica tópica da AV. Um método analítico para quantificação de ADP por CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência) foi validado parcialmente seguindo os parâmetros de seletividade, linearidade, limites de detecção e quantificação preconizados pelo ICH e pela ANVISA. Estudos de permeação cutânea *in vitro* relacionam-se diretamente a eficácia do tratamento de medicamentos de uso tópico. O estudo teve o objetivo de comparar o perfil de permeação cutânea de diferentes formulações comerciais contendo ADP, tendo em vista que ambas as formulações possuem processos tecnológicos de desenvolvimento diferentes. A formulação Deriva® Micro é desenvolvida por tecnologia de microencapsulação, enquanto que a Differin® é fabricada pelo método convencional. Os estudos de permeação foram realizados em células de difusão de Franz utilizando peles de suínos durante um experimento de 12h. O ADP foi recuperado das camadas da pele (EC, FP e EP), no entanto, não houve detecção e quantificação do fármaco na solução receptora pelo método de CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência). Não houve diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre as formulações na recuperação do fármaco nas camadas da pele, evidenciando que a formulação contendo microesferas não reduziu a dose do ADP no medicamento, proporcionando o mesmo efeito da formulação mais simples. O potencial zeta das micropartículas da Deriva® Micro foi analisado, apresentando um valor de  $-41,31 \pm 1,12$  mV, o que indica estabilidade da micropartícula. Análises de teor e pH também foram realizadas, apresentando os valores de 108,6% ( $\pm 7,89$ ) e 97,2% ( $\pm 2,80$ ) de teor de ADP e pH de  $5,1 \pm 0,03$  e  $5,0 \pm 0,036$  para a Deriva® Micro e Differin®, respectivamente, sendo compatíveis com o pH cutâneo. Tendo em vista todos os aspectos abordados, este trabalho evidenciou a importância dos estudos de permeação cutânea *in vitro* para avaliação da biodisponibilidade/bioequivalência tanto para desenvolvimento quanto para controle de produtos tópicos, mostrando também a ausência de legislações mais rigorosas quanto ao registro desse tipo de medicamento e de medicamentos com tecnologia de microencapsulação.

**Palavras-chave:** Adapaleno, permeação cutânea, micropartículas, nanotecnologia, *acne vulgaris*, bioequivalência.

## ABSTRACT

Acne vulgaris (AV) is an inflammatory disease caused by multiple factors blocking the pilosebaceous units of the skin, affecting both male and female patients. Acne treatment may involve several pharmacological groups, such as topical antibiotics, keratolytics and retinoids. Among these pharmacological groups, retinoids have been at the top of AV treatment for the past 25 years. Adapalene (ADP) is a third generation synthetic retinoid widely used in topical dermatological therapy of AV. An analytical method for the quantification of ADP by HPLC was partially validated following the parameters of selectivity, linearity, limits of detection and quantification recommended by ICH and ANVISA. In vitro skin permeation studies are directly related to the efficacy of topical medications. The aim of this study was to compare the cutaneous permeation profile of different commercial formulations containing ADP, since both formulations have different technological development processes. The Deriva® Micro formulation is developed by microencapsulation technology, while Differin® is manufactured by the conventional method. Permeation studies were performed on Franz diffusion cells using swine skins during a 12h experiment. ADP was recovered from the skin layers (EC, FP and EP), however, there was no detection and quantification of the drug in the receptor solution by the HPLC method (High Performance Liquid Chromatography). There was no statistically significant difference ( $p < 0.05$ ) between formulations in drug recovery in the skin layers, evidencing that the microsphere-containing formulation did not reduce the dose of ADP in the drug, providing the same effect of the simpler formulation. The zeta potential of the microparticles of Deriva® Micro was analyzed, presenting a value of  $-41.31 \pm 1.12$  mV, which indicates stability of the microparticle. PH and content analyzes were also performed, presenting values of 108.6% ( $\pm 7.89$ ) and 97.2% ( $\pm 2.80$ ) of ADP content and pH of  $5.1 \pm 0.03$  and  $5.0 \pm 0.036$  for Deriva® Micro and Differin®, respectively, being compatible with cutaneous pH. In view of all the aspects covered, this work evidenced the importance of in vitro skin permeation studies for the evaluation of bioavailability / bioequivalence for both development and control of topical products, also showing the absence of more stringent legislation regarding the registration of this type of drug and microencapsulation technology.

**Key words:** Adapalene, skin permeation, microparticles, nanotechnology, acne vulgaris, bioequivalence.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estruturas da pele: Epiderme, derme e hipoderme (adaptado de <a href="http://www.dermatologia.net/a-pele/">http://www.dermatologia.net/a-pele/</a> ). .....	4
<b>Figura 2.</b> Estrutura das micropartículas (microcápsulas e microesferas) (SILVA et al., 2003). .....	8
<b>Figura 3.</b> Anatomia do folículo piloso (F.M. BRENNER et al, 2006). .....	9
<b>Figura 4.</b> Estrutura química do Adapaleno (MARTINS et al., 2011a). .....	11
<b>Figura 5.</b> Células de Franz modificadas (MATOS et al., 2015) .....	17
<b>Figura 6.</b> A) Peles de suínos após a permeação <i>in vitro</i> com as formulações comerciais de ADP: Differin <sup>®</sup> e Deriva <sup>®</sup> Micro. B) Células de Franz modificadas durante o estudo de permeação <i>in vitro</i> . Os ensaios foram realizados em quadruplicata. ....	18
<b>Figura 7.</b> Imagem do pico cromatográfico do ADP (20 µg/mL) com eluição em 4,5 minutos. ....	20
<b>Figura 8.</b> Padrão de ADP em uma concentração de 7µg/ml e interferentes (EC, FP e EP). ....	21
<b>Figura 9.</b> Representação gráfica da curva analítica obtida por CLAE para soluções etanólicas de ADP na faixa de concentração entre 0,5 e 20,0 µg/mL. Equação da reta: $y = 50423X - 3885,6$ $r^2 = 0,999$ . ....	22
<b>Figura 10.</b> Influência do tamanho das partículas na penetração folicular (ROLLAND et al., 1993). ....	26
<b>Figura 11.</b> Quantidade de ADP retido no estrato córneo (EC), folículo piloso (FP) e epiderme (EP) nas diferentes formulações. As barras representam a média ± desvio padrão da média. ....	27

## **LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURA**

**AV** *Acne Vulgaris*

**ADP** Adapaleno

**ANVISA** Agência Nacional de Vigilância Sanitária

**CLAE** Cromatografia líquida de alta eficiência

**EC** Estrato Córneo

**FP** Folículo Piloso

**EP** Epiderme Remanescente

**ICH** *International conference on harmonization*

**LD** Limite de detecção

**LQ** Limite de quantificação

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>3</b>
2.1. Objetivo geral .....	3
2.2. Objetivos específicos .....	3
<b>3. REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>4</b>
3.1 Pele .....	4
3.2 Vias de permeação cutânea.....	6
3.3 Micro e Nanotecnologia .....	7
3.4 <i>Acne Vulgaris</i> .....	8
3.5 Tratamento para <i>Acne vulgaris</i> .....	10
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>13</b>
4.1 Material .....	13
4.2 Formulações .....	13
4.3 Método Analítico para quantificação de ADP .....	13
4.4 Validação do método analítico .....	14
4.4.1 <i>Seletividade</i> .....	14
4.4.2 <i>Linearidade</i> .....	14
4.4.3 <i>Limites de Detecção e Limites de Quantificação</i> .....	15
4.5 Características físico-químicas das formulações: análise de teor e pH.....	15
4.5.1 <i>Potencial zeta</i> .....	15
4.6 Estudos de recuperação do ADP no estrato córneo (EC), no folículo piloso (FP) e na epiderme remanescente (EP). .....	16
4.7 Estudo <i>in vitro</i> de permeação cutânea de ADP em pele de suínos .....	16
4.8 Análise Estatística dos dados.....	18
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>19</b>
5.1 Validação do método analítico para quantificação de ADP.....	19
5.1.1 <i>Seletividade</i> .....	20
5.1.2 <i>Linearidade</i> .....	21
5.1.3 <i>Limites de Detecção e de Quantificação</i> .....	22
5.2 Características físico-químicas das formulações: análise de teor e pH.....	23
5.2.1 <i>Potencial Zeta</i> .....	24
5.3 Estudos de recuperação do ADP no estrato córneo (EC), no folículo piloso (FP) e na epiderme remanescente (EP) .....	24



5.4 Determinação da permeação cutânea <i>in vitro</i> de ADP em pele de suínos a partir das formulações .....	24
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>29</b>
<b>7. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>30</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A *acne vulgaris* (AV) é uma doença inflamatória de pele crônica e comum causada pelo bloqueio das unidades pilossebáceas da pele, que são os anexos cutâneos constituídos por folículo piloso agregado a uma glândula sebácea e músculo eretor do pelo (WILLIAMS; DELLAVALLE; GARNER, 2012).

A AV é associada a múltiplos fatores, como: hipersecreção de sebo, queratinização folicular anormal, formação de colônias de *Propionibacterium acnes* e liberação de mediadores pró-inflamatórios (ELSAIE, 2016; WILLIAMS; DELLAVALLE; GARNER, 2012). A sequência exata desses eventos não é totalmente esclarecida, mas o principal fator fisiopatológico parece ser a indução andrógena na produção e secreção de sebo (PICARDO; EICHENFIELD; TAN, 2017). Sabe-se que o acúmulo de sebo e células mortas dentro do folículo pilossebáceo aumentam a carga microbiana, que promove uma interrupção na parede do folículo, causando uma inflamação na pele, que constitui a acne (KUMAR et al., 2016).

Por ser uma doença de cunho inflamatório, as lesões causadas pela AV geralmente resultam em cicatrizes na pele dos pacientes podendo afetar sua autoestima. Estima-se que aproximadamente 80% dos pacientes afetados são adolescentes e adultos jovens numa faixa etária de 11-30 anos (ELSAIE, 2016).

Existem várias opções farmacológicas para o tratamento da AV, entre elas o uso de substâncias da classe dos retinoides foi introduzido no tratamento na década de 1970, uma vez que essas substâncias atenuam múltiplas características da patogênese da AV (CZERNIELEWSKI et al., 2001). Os retinoides são derivados da vitamina A e possuem uma ação potente em modular a proliferação e diferenciação celular (MICHEL; JOMARD; DÉMARCHEZ, 1998) que ocorre na região pilossebácea e normalizar a descamação anormal que ocorre no folículo, que bloqueia o canal pilossebáceo formando as lesões acneicas. Os retinoides mais usados na terapia da AV são a tretinoína, tazaroteno, adapaleno (ADP) e a isotretinoína para uso sistêmico (CZERNIELEWSKI et al., 2001; IRBY; YENTZER; FELDMAN, 2008; LEYDEN; STEIN-GOLD; WEISS, 2017).

O ADP é um retinoide de uso tópico usado no tratamento da acne suave e moderada. Ele apresenta ação queratolítica, anti-inflamatória e antisseborréica. Os

tratamentos com esse fármaco mostraram ser mais tolerados pelos pacientes em comparação com a isotretinoína, por exemplo, devido à sua baixa absorção sistêmica e uma menor incidência de efeitos adversos importantes, como a teratogênese. No entanto, alguns efeitos adversos tópicos, tais como eritema e secura, foram relatados com o uso das formulações comerciais (BHALEKAR, UPADHAYA, MADGULKAR, 2015; CHEN et al., 2015; RAMEZANLI; ZHANG; MICHNIAK-KOHN, 2016).

Atualmente, o mercado nacional dispõe de diferentes formas de apresentação para o ADP, seja na forma livre ou na forma microencapsulada. A justificativa para a encapsulação do fármaco em micropartículas está em aumentar estabilidade do medicamento, controlar a liberação do fármaco e, sobretudo, direcionar a ação do fármaco para a região folicular após aplicação da formulação sobre a pele (GELFUSO et al., 2015; MATOS et al., 2015).

Por se tratar de medicamentos de uso tópico, conhecer o perfil de permeação do ADP na pele é de extrema importância para se garantir a eficácia do tratamento. Apesar disso, a legislação nacional ainda não exige nenhum estudo de biodisponibilidade tópica para garantir esta eficácia, nem para registro e nem para controle de produção desse tipo de medicamento.

O presente trabalho, portanto, teve como objetivo realizar um estudo comparativo de permeação cutânea do ADP a partir de duas formulações comerciais, uma contendo o fármaco livre e outra contendo o fármaco microencapsulado, como um indicativo de efetividade dos medicamentos.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

Esse trabalho teve como objetivo avaliar *in vitro* a penetração cutânea do ADP a partir de duas formulações comerciais disponíveis no mercado nacional: uma em gel contendo micropartículas encapsulando o fármaco e outra formulação também em gel contendo o fármaco livre.

### 2.2. Objetivos específicos

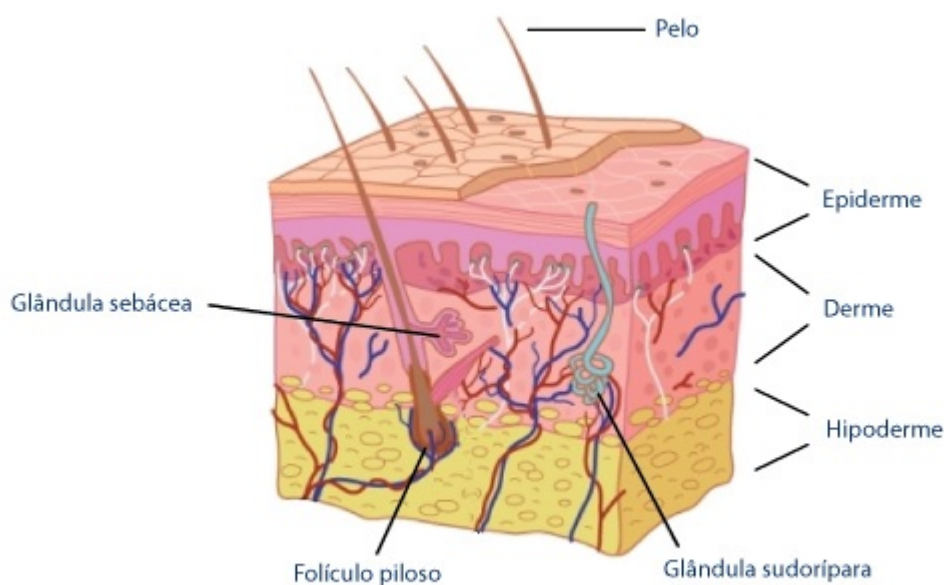
- Padronizar e validar um método analítico para quantificação de ADP nos estudos de teor e de permeação cutânea;
- Determinar o teor de ADP das diferentes formulações comerciais;
- Avaliar o potencial zeta das micropartículas de ADP presentes em uma das formulações comerciais como indicativo de estabilidade intrínseca da formulação microparticulada;
- Verificar *in vitro* a penetração cutânea do ADP a partir das diferentes formulações comerciais;
- Analisar estatisticamente os dados obtidos e avaliar se as formulações são equivalentes em termos de permeação cutânea.

### 3. REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 Pele

A pele representa aproximadamente 15% do peso total do corpo de um adulto com uma área de superfície de 2 m<sup>2</sup>. Em um adulto com 70 kg, a pele possui em torno de 13 kg, sendo considerada o maior órgão do corpo humano. A pele desempenha diversas funções, como por exemplo, barreira protetora de agentes externos, bloqueio da perda de água e eletrólitos do meio interno, proteção imunológica, controle da temperatura, percepção sensorial e secreção sebácea (LAI-CHEONG; MCGRATH, 2013; RIVITTI, E. A, 2014).

A pele é composta por três principais camadas de tecidos: a epiderme (camada superior), derme ou cório (camada intermediária) e hipoderme ou tecido subcutâneo (camada profunda)(LAI-CHEONG; MCGRATH, 2013; RIVITTI, E. A 2014). As camadas da pele estão representadas na Figura 1.



**Figura 1.** Estruturas da pele: Epiderme, derme e hipoderme (adaptado de <http://www.dermatologia.net/a-pele/>).

A epiderme constitui a maior camada da pele, sendo caracterizada pelo epitélio estratificado queratinizado. Os queratinócitos constituem as principais células da epiderme (95% das células), enquanto que os 5% restante são constituídos pelos melanócitos, células de Langerhans e células de Merkel. A epiderme é dividida em

quatro camadas que são caracterizadas pelo grau de diferenciação dos queratinócitos – camada basal ou germinativa, camada malpighiana, camada granulosa e camada córnea (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013; LAI-CHEONG; MCGRATH, 2013; RIVITTI, E. A, 2014).

A camada basal ou germinativa é a camada mais profunda da epiderme, sendo constituída por células basais e melanócitos. As células basais são os queratinócitos basais com formato cilíndrico em repouso sobre a membrana basal (membrana que separa a epiderme da derme). Essa camada germinativa sofre intensa atividade mitótica dos queratinócitos, dando origem às outras camadas da epiderme até atingir o estrato córneo. Esse processo de maturação das células ocorre de 15 a 30 dias (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013; RIVITTI, E. A, 2014).

A camada malpighiana é composta por células com formato um pouco achatado, que se aproximam da superfície. Essa camada também é chamada de camada espinhosa e as células permanecem unidas por meio dos desmossomos, que são junções intercelulares. As células da camada espinhosa e da camada basal também se mantêm unidas pelos desmossomos. A camada granulosa é constituída por células achatadas que possuem grandes quantidades de grânulos em seu interior e apenas poucas fileiras de células nessa camada (três a cinco fileiras) (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013; RIVITTI, E. A, 2014).

Por último, a camada mais externa da epiderme é o estrato córneo, que é composta por aproximadamente 10 camadas de corneócitos, porém nas regiões palmoplantares as camadas são menos espessas. Os corneócitos são os queratinócitos que sofreram diferenciação celular, tornando-se anucleadas, achatadas e com o citoplasma composto por filamentos de queratina. Nessa etapa de diferenciação as células sofrem descamação. Essas células são envolvidas por uma matriz extracelular hidrofóbica derivada de precursores lipídicos, os quais participam da formação de ácidos graxos, colesterol e ceramidas, que se organizam de forma integrada entre os corneócitos, contribuindo para a manutenção integral da barreira epidérmica. O estrato córneo sofre constantemente o processo de regeneração através da diferenciação dos queratinócitos, atuando como uma barreira protetora (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013; LAI-CHEONG; MCGRATH, 2013; POUILLOT et al., 2008; RIVITTI, E. A, 2014).

A derme ou cório (camada intermediária) é composta pelo tecido conjuntivo, que oferece suporte a camada da epiderme e promove a união da pele com o tecido subcutâneo. A derme é caracterizada pela presença de mucopolissacarídeos e por diferentes tipos de fibras (colágenas, elásticas e reticulares). Além desses componentes, a derme também é constituída pelos fibroblastos, mastócitos, células dendríticas e histiócitos, vasos sanguíneos e nervos sensoriais. As glândulas sudoríparas, folículos pilosebáceos e o musculo eretor do pelo também estão presentes na derme (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013; LAI-CHEONG; MCGRATH, 2013; RIVITTI, E. A, 214).

A camada mais profunda da pele é a hipoderme ou tecido subcutâneo, que é formada pelo tecido conjuntivo frouxo, ligando a derme aos órgãos. A hipoderme também é composta de lipócitos, sendo designada como panículo adiposo. A presença do tecido adiposo é importante para controle da temperatura e consequente proteção contra o frio, dessa forma a hipoderme atua como um isolante térmico. Além disso, o tecido subcutâneo tem o papel de funcionar como um depósito de nutrientes e proteger o organismo de pressões e traumatismos externos (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013; LAI-CHEONG; MCGRATH, 2013; RIVITTI, E. A 2014).

### 3.2 Vias de permeação cutânea

A permeação cutânea de fármacos envolve a difusão do fármaco através epiderme e de apêndices da pele (folículo piloso, glândulas sudoríparas e glândulas sebáceas). No entanto, a permeação geralmente ocorre de forma limitada devido ao estrato córneo, que atua como uma barreira protetora. Apesar de o estrato córneo apresentar essa função protetora, a permeação cutânea pode acontecer de três formas distintas: via intercelular, via transcelular (intracelular) e via apendicial (ILLEL, 1997; MOSER, 2001).

Na via intercelular, o fármaco atravessa a epiderme entre os corneócitos, difundindo-se pelas camadas lipídicas que circundam as células do estrato córneo. Já na via intracelular, o fármaco atravessa diretamente a camada de queratina dos corneócitos e a matriz lipídica circundante. A via apendicial constitui no transporte do fármaco através dos folículos pilosos, glândulas sebáceas e glândulas sudoríparas. A proximidade desses apêndices da pele com os vasos capilares faz com que a absorção

das moléculas permeadas aconteça de forma rápida, devido à passagem folicular dessas moléculas (ILLEL, 1997; MOSER, 2001).

Apesar de esses apêndices representarem uma pequena fração de superfície da pele (aproximadamente 0,1% da pele humana), eles revelaram uma notável importância na permeabilidade de íons, moléculas polares e apolares. Além disso, o folículo piloso demonstrou possuir uma capacidade reservatória de fármacos aplicados pela via tópica (BARBERO; FRASCH, 2017; BHATIA; ZHOU; BANGA, 2013; ILLEL, 1997; MOSER, 2001).

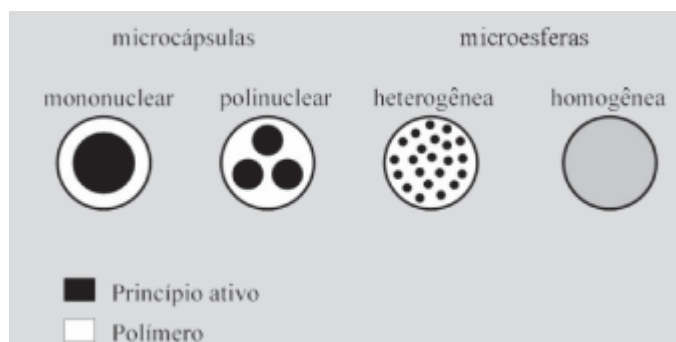
### 3.3 Micro e Nanotecnologia

A via apendicular tem sido considerada como uma potencial rota para acessar a pele através de nano e microssistemas. Esses sistemas têm sido bem estudados com o objetivo de melhorar a permeação de algumas moléculas na pele, principalmente de moléculas hidrofóbicas, pois podem oferecer vantagens na formulação de um fármaco, proporcionando uma melhora na solubilidade e biodisponibilidade. Esses sistemas são constituídos por microemulsões, nanoemulsões, nanopartículas, lipossomas e vesículas (NASTITI et al., 2017).

As micropartículas e nanopartículas são partículas poliméricas coloidais definidas pelos seus respectivos tamanhos de micrômetros e nanômetros. (PITAKSUTTEEPONG; SOMSIRI; WARANUCH, 2007) O tamanho das micropartículas pode variar entre 1 e 1000 micrometros e podem ser classificadas como microcápsulas ou microesferas. (PITAKSUTTEEPONG; SOMSIRI; WARANUCH, 2007; SILVA et al., 2003)

As microcápsulas são partículas constituídas por polímeros de diferentes espessuras que revestem a substância ativa, formando uma espécie de sistema reservatório. A membrana das microcápsulas é constituída por esses mesmos polímeros. Já as microesferas são sistemas matriciais que armazenam o fármaco de forma uniformemente dispersa ou dissolvido na rede polimérica. (SILVA et al., 2003)





**Figura 2.** Estrutura das micropartículas (microcápsulas e microesferas) (SILVA et al., 2003).

### 3.4 *Acne Vulgaris*

A *acne vulgaris* (AV) constitui uma das doenças mais comuns e frequentes na população afetando mais de 85% dos adolescentes no mundo (SUH; KWON, 2015; WILLIAMS; DELLAVALLE; GARNER, 2012); no entanto, os adultos também podem ser acometidos pela AV. Em casos extremos, a doença pode ter consequências severas para o desenvolvimento da personalidade dos jovens, visto que as alterações cutâneas podem afetar a autoestima do indivíduo, podendo contribuir com efeitos sociais e econômicos (GUPTA; GUPTA, 1998; JAPPE, 2003).

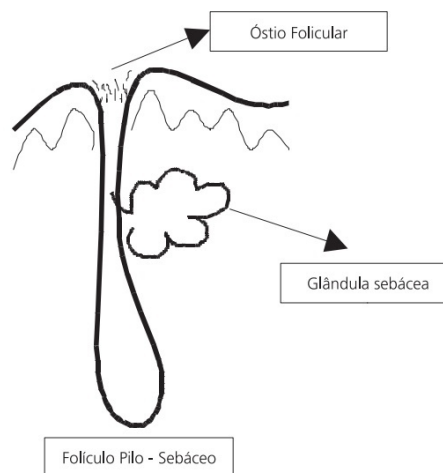
Não existe um perfil epidemiológico universal da AV. Em geral, observa-se que 95% dos meninos e 80% das meninas com aproximadamente 16 anos de idade são afetados e em adultos percebe-se uma prevalência maior em pacientes do sexo feminino do que masculino (STATHAKIS; KILKENNY; MARKS, 1997). Normalmente, a ocorrência da AV em indivíduos do sexo masculino se apresenta de forma severa (JAPPE, 2003). A acne não é uma doença fatal, porém pode persistir ao longo da vida deixando o rosto marcado com cicatrizes permanentes (SUH; KWON, 2015).

Durante a fase da adolescência o organismo sofre diversas mudanças que podem ser atribuídas às atividades hormonais, que têm seu início de manifestação justamente nesse período da puberdade, resultando em alterações de pele e cabelo. Os hormônios sexuais (andrógenos e estrógenos) estão entre os fatores que são responsáveis pelas alterações cutâneas e, conseqüentemente, pelo aparecimento da acne que é caracterizada pela presença de cravos, espinhas e nódulos (BAGATIN et al., 2014; SBD,2016).

A fisiopatologia (patogênese) da acne está associada a múltiplos fatores, dentre eles encontram-se a alteração do processo de queratinização, a formação de comedões (comedogênese), a colonização folicular por *Propionibacterium acnes*, o aumento da

produção sebácea e os mediadores inflamatórios em volta das unidades pilosebáceas. A sequência exata dos eventos e como eles ocorrem de forma interconectada ainda são desconhecidos devido à complexidade inerente da doença (SUH; KWON, 2015).

Os primeiros sintomas da acne são lesões conhecidas como comedões que são caracterizados por um bloqueio no ducto sebáceo devido a um tampão de queratina, podendo causar uma intensa resposta inflamatória (RBM, 2016). No processo de formação da acne, as unidades pilosebáceas sofrem uma hipertrofia devido à ação androgênica sobre a sua estrutura criando condições favoráveis para a formação do comedão. Em seguida, uma hiperproliferação no infundíbulo da glândula, que é constituído pela porção epidérmica, bloqueia o óstio ductal, impedindo a drenagem do sebo produzido pela glândula, levando a comedogênese (F.M. BRENNER et al, 2006).



**Figura 3.** Anatomia do folículo piloso (F.M. BRENNER et al, 2006).

A hiperestimulação androgênica pode fazer com que a produção da secreção do sebo fique acumulada no comedão obstruído e favorecer a colonização folicular por *Propionibacterium acnes* (F.M. BRENNER et al, 2006), que libera citocinas pró-inflamatórias, desencadeando uma reação inflamatória e infecciosa em toda a glândula (JAPPE, 2003).

Além de todos os fatores que contribuem para a formação da acne já citados nos parágrafos anteriores, alguns estudos mostraram que o aparecimento da AV também pode estar relacionado com fatores genéticos devido à herança de um gene autossômico dominante com expressão diferente (JAPPE, 2003). Devido a todos esses fatores a AV é uma doença de difícil compreensão.

Atualmente, pesquisadores de diversas áreas, incluindo dermatologia, imunologia, microbiologia e endocrinologia têm estudado novos conceitos para a fisiopatologia da acne, sugerindo que esses fatores estão muito mais interconectados do que tem sido compreendido previamente (SUH; KWON, 2015).

### 3.5 Tratamento para *Acne vulgaris*

As principais opções para o tratamento de primeira linha da acne com inflamação moderada e comedogênica constituem os seguintes grupos farmacológicos: antibióticos de uso tópico, queratolíticos e retinoides. A terapia combinada com diferentes grupos farmacológicos também é frequente no manejo clínico para o tratamento da acne com o objetivo de atingir alvos com diferentes fatores patogênicos. (CHEN et al., 2015).

Os retinoides são uma classe de compostos moleculares derivados da vitamina A (BUCHANAN; GILMAN, 2016). A vitamina A existe em três formas: retinol (vitamina A em função álcool), retinal (vitamina A em função aldeído) e ácido retinoide, os retinoides podem ser naturais ou sintéticos com propriedades biológicas similares a vitamina A (CARR; TREVINO; DONNELLY, 2011).

Esses compostos são usados como primeira linha no tratamento da acne inflamatória. Eles se ligam aos receptores nucleares de ácido retinóico (RAR) e ativam os genes responsáveis pela diferenciação celular. Essa ativação promove um efeito anti-proliferativo nos sebócitos, proporcionando uma diminuição na produção de sebo e na comedogênese (RAMEZANLI; ZHANG; MICHNIAK-KOHN, 2016).

Os retinoides podem reverter a descamação anormal dos folículos e, além disso, possuem efeitos anti-inflamatórios. As formulações de uso tópico além de serem usadas para o tratamento de acne moderada também são usadas para outras doenças de pele (CHEN et al., 2015).

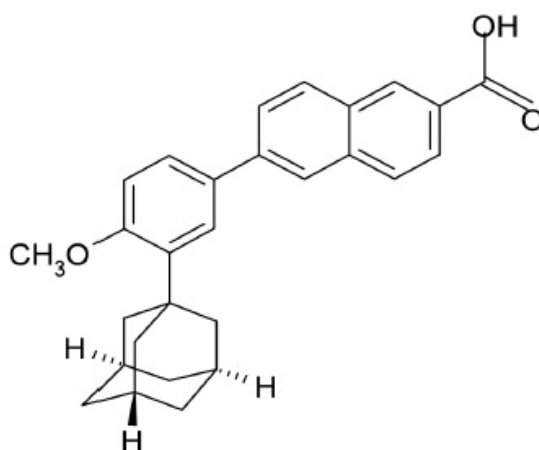
Os retinoides são os agentes comedolíticos mais efetivos e estão no topo do tratamento para acne nos últimos 25 anos. Os de uso tópico são a tretinoína, adapaleno e tazaroteno, enquanto que para uso sistêmico existe apenas a isotretinoína (AKHAVAN; BERSHAD, 2003; RUSSELL, 2000). A classe desses compostos é dividida em três gerações, que são baseadas de acordo com as suas estruturas químicas (MARTINS et al., 2011a). Na primeira geração existem a tretinoína e a isotretinoína. A segunda

geração contém etretinato e acitretina e por último, a terceira geração, estão presentes o adapaleno e o tazaroteno (VINHAL, D.C.et al., 2014).

O ADP é um retinoide sintético de terceira geração derivado do ácido naftóico. O ADP é utilizado no tratamento de acne suave-moderada com efetividade contra condições de acne em que os comedões são predominantes (ROY, 2015). Devido ao fato de ser um análogo de retinoide possui ações similares com a tretinoína (TOLBA; EL-GAMAL, 2016). Ambos possuem a capacidade de se ligar ao mesmo receptor e ativar a mesma via de sinalização (MARTINS et al., 2011a).

O ADP, quando comparado com outros retinoides de uso tópico, apresenta uma pequena incidência de efeitos adversos, exibindo um perfil satisfatório de tolerância pelos pacientes (CHEN et al., 2015).

O nome químico do adapaleno é 6- [3- (1-adamantil) -4-metoxifenil] -2- naftóico (Figura 2) e algumas de suas características físico-químicas incluem um  $pK_a=4,23$  e um  $\log P=8,0$ , que proporciona uma biodisponibilidade limitada no local dos folículos pilosos e no estrato da pele, sendo um composto altamente lipofílico. Além disso, apresenta uma estabilidade maior em presença de luz em comparação com a isotretinoína (BHATIA; ZHOU; BANGA, 2013; MARTINS et al., 2011a; RAMEZANLI; ZHANG; MICHNIAK-KOHN, 2017).



**Figura 4.** Estrutura química do Adapaleno (MARTINS et al., 2011a).

Quando comparado a isotretinoína, o ADP possui baixa absorção sistêmica, e melhor eficácia, sendo mais tolerado pelos pacientes, o que contribui para as vantagens

do seu uso. Outra vantagem é que não há evidência clínica de ser teratogênico (MARTINS et al., 2011a).

Em 1995 foram aprovadas duas formulações tópicas de adapaleno: uma em gel (0,1% e 0,3%) e uma em creme (0,1%) (MARTINS et al., 2011b) e atualmente existem formulações em gel de ADP de liberação prolongada que são constituídas por microesferas como, por exemplo, a formulação da Glenmark, o Deriva ® Micro Gel.

Como a pele é um órgão que possui propriedades de barreiras que inibe o transporte passivo de substâncias aplicadas topicamente (RAMEZANLI; ZHANG; MICHNIAK-KOHN, 2016), diferentes formulações de ADP foram estudadas por indústrias de medicamentos com o objetivo de otimizar a dose, eficácia e segurança (ANVISA, 2017).

Desse modo, será de grande importância um estudo comparativo de uma formulação em gel com micropartículas de ADP e uma formulação em gel com o ADP livre (sem as micropartículas) para verificar o perfil de penetração folicular do fármaco.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Material

O ADP (99%) utilizado para a validação do método por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e para o preparo das curvas de calibração foi obtido de uma farmácia de manipulação local. O etanol e acetonitrila, ambos de grau HPLC, foram obtidos da J.T. Baker (Philisburg, EUA) e o ácido fosfórico da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). A água utilizada em todas as análises foi a água tipo Milli-Q (Millipore, França). A técnica de *tape stripping* diferencial foi realizada utilizando-se uma cola de cianoacrilato e fitas adesivas da Scotch Book Tape (3M, Alemanha).

A pele usada neste trabalho foi proveniente das orelhas de suínos logo após o abate da indústria Bonasa Alimentos (São Sebastião, DF, Brasil), que gentilmente cedeu este material. A realização dos experimentos contendo a pele suína não necessita de nenhuma autorização dos conselhos de ética, devido ao fato de ser um material liberado para consumo. As orelhas foram lavadas com água tipo Milli-Q e fixadas com alfinetes em um isopor recoberto por papel alumínio. Em seguida, com a utilização de um bisturi, a pele foi separada da cartilagem. O tecido adiposo foi retirado com uma tesoura e após esse procedimento de limpeza, a pele foi recortada em formato esférico e armazenada a uma temperatura de -4°C por um período de no máximo dois meses antes do uso.

### 4.2 Formulações

As formulações que foram adquiridas em drogarias do Distrito Federal. As formulações contendo ADP foram as seguintes:

- ✓ DERIVA<sup>®</sup> MICRO bisnaga de 30 mg de gel dermatológico de liberação prolongada contendo 1mg/g de microesferas contendo ADP - Glenmark Farmacêutica Ltda;
- ✓ DIFFERIN<sup>®</sup> bisnaga de 30 mg de gel dermatológico contendo 3mg/g de ADP – Galderma.

### 4.3 Método Analítico para quantificação de ADP

As análises de doseamento dos géis contendo ADP foram realizadas utilizando o método de CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) com um equipamento da marca Shimadzu, modelo LC 20-AD. O equipamento era composto por duas bombas (modelo LC 20-AT), um injetor automático (modelo 9SIL-20AD) e forno (modelo CTO-20AS), acoplados a um detector espectrofotométrico (modelo SPD-M20A) e a um

computador equipado com o programa de análise cromatográfica Shimadzu LC. A coluna utilizada foi uma coluna C8 da Shimadzu e fase móvel composta por acetonitrila e água acidificada com ácido fosfórico 0,01M com pH ajustado para 2,5 (80:20). A vazão da fase móvel foi de 1,4 mL/min, volume de injeção das amostras foi de 20 µL, o forno foi utilizado em uma temperatura de 25°C e a detecção foi feita em comprimento de onda igual a 321 nm (MARTINS et al., 2011a).

#### 4.4 Validação do método analítico

A validação do método analítico foi realizada utilizando os parâmetros de seletividade, linearidade, limite de detecção e limite de quantificação. Os parâmetros foram realizados de acordo com as orientações do ICH (International Conference of Harmonisation) Q2B (1996), e Resolução - RE N° 899, de 29 de Maio de 2003 e RDC N° 166, de 24 de Julho de 2017, ambas emitidas pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária).

##### 4.4.1 Seletividade

A seletividade foi observada por meio da análise do estrato córneo, folículo piloso e pele remanescente separados da pele de suínos e contaminados com uma solução com concentração igual a 7 µg/mL de ADP. Os tempos de retenção e área do pico do ADP obtidos da corrida no HPLC foram comparados ao de uma solução simples de ADP a 7 µg/mL.

##### 4.4.2 Linearidade

Três soluções-mãe de ADP na concentração de 100 µg/mL foram preparadas em etanol grau HPLC partindo-se de pesagens independentes do fármaco e, a partir de cada uma delas, foram feitas sete diluições em etanol para obter amostras nas seguintes concentrações: 0,5; 2,0; 5,0; 7,0; 10,0; 15,0; 20,0 µg/mL. A curva analítica foi obtida relacionando-se a área do pico gerado pelo equipamento com a respectiva concentração de ADP. A análise estatística dos dados foi obtida utilizando-se o método de regressão linear, resultando em uma reta no formato  $y = ax + b$ , em que ( $a$ ) corresponde ao coeficiente angular e ( $b$ ) ao coeficiente linear. As faixas lineares foram calculadas utilizando-se o coeficiente de correlação linear ( $r$ ), de acordo com o parâmetro mínimo aceitável de  $r = 0,99$  (ANVISA, 2003).

#### 4.4.3 Limites de Detecção e Limites de Quantificação

Os valores de limite de detecção (LD) e de quantificação (LQ) são os menores valores de ADP que podem ser detectados e quantificados pelo método analítico desenvolvido. Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram determinados por meio das equações teóricas (ICH, 2005) descritas abaixo:

$$LD = \left( \frac{3 \times S}{S} \right) \quad (\text{Equação I})$$

$$LQ = \left( \frac{10 \times S}{S} \right) \quad (\text{Equação II})$$

onde: *LD* corresponde ao limite de detecção; *LQ* corresponde ao limite de quantificação; *s* é o desvio padrão dos valores de intercepção do eixo Y das curvas de calibração; e *S* corresponde ao coeficiente angular da curva de calibração.

#### 4.5 Características físico-químicas das formulações: análise de teor e pH

A análise do teor foi realizada com a preparação das formulações diluídas em etanol com uma concentração final de 15 µg/mL e o ADP foi quantificado em CLAE. O experimento foi realizado em triplicata para cada formulação.

O pH de cada formulação foi analisado em triplicata utilizando um potenciômetro equipado com eletrodo para formulações semissólidas (Digimed) pela simples inserção do eletrodo nas alíquotas das formulações.

##### 4.5.1 Potencial zeta

A análise do potencial zeta das micropartículas da formulação comercial Deriva® Micro foi realizada em um equipamento Zetasizer Nano (Malvern, EUA). Aproximadamente 5 mg da formulação foram suspensos em 1,5 mL de água destilada. Em seguida, 1mL da suspensão foi pipetada em uma cubeta de plástico do Zetasizer e a leitura foi realizada por meio da determinação da mobilidade eletroforética das partículas (OLIVEIRA, 2016).



4.6 Estudos de recuperação do ADP no estrato córneo (EC), no folículo piloso (FP) e na epiderme remanescente (EP).

A recuperação do ADP na pele de suínos foi realizada utilizando-se primeiramente a técnica de *differential tape stripping*, que permite a separação do estrato córneo (EC), folículo piloso (FP) e epiderme remanescente (EP) da amostra de pele. Fragmentos da pele suína previamente cuidados e armazenados foram esticados e fixados sobre um suporte de isopor recoberto com papel alumínio. Em seguida, para a remoção do EC foram utilizados 15 pedaços de fita adesiva. Posteriormente, foi aplicada 1 gota de cianoacrilato sobre o fragmento da pele, juntamente com um pedaço de fita adesiva que foi pressionada levemente durante 1 minuto e retirada em seguida para a remoção dos folículos pilosos (esse procedimento foi realizado 2 vezes para cada amostra de pele). Por último, a EP foi apenas recortada em pequenos pedaços. As fitas contendo o EC, FP e os pedaços da EP foram transferidos para frascos de vidro correspondente a cada camada da pele. Após esse procedimento, 350 µL de uma solução de ADP 100µg/mL em etanol foram adicionados aos recipientes de vidro e, em seguida, o solvente foi evaporado através de um fluxo de ar. Logo após, 5 mL de etanol foram adicionados aos frascos de vidro para extração do fármaco das camadas da pele e avaliação da recuperação. Os frascos contendo as camadas da pele e o solvente extrator ficaram por 24 h em repouso (sem agitação) e o conteúdo foi filtrado para *vials* com o auxílio de uma seringa de 1mL e de filtros em membrana hidrofóbicos de 0,22 µm. Por último, as análises foram feitas seguindo-se o método analítico validado para quantificar o ADP. Essa análise foi realizada em quintuplicata.

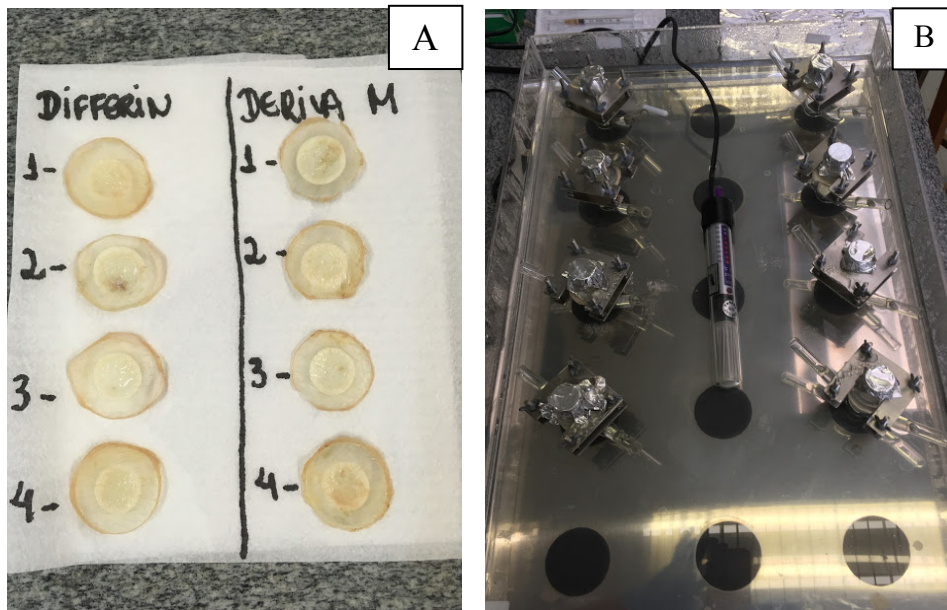
4.7 Estudo *in vitro* de permeação cutânea de ADP em pele de suínos

O estudo *in vitro* de permeação cutânea foi realizado utilizando células de difusão vertical do tipo Franz modificada (Figura 5). Esta célula possui dois compartimentos (doador e receptor) em que a pele suína era colocada entre os compartimentos com o EC voltado para cima. Foram inseridos 15 mL de uma solução no compartimento receptor composta por água e etanol em uma proporção de 50:50 (v/v). Esta solução foi mantida sob agitação e a aproximadamente 32° C durante todo o tempo experimental, que foi de 12 h. Ao compartimento doador, sobre a pele, foram aplicados 500 mg das formulações. Os experimentos foram realizados em quadruplicata para cada formulação analisada.



**Figura 5 .** Células de Franz modificadas (MATOS et al., 2015)

Após as 12 h de experimento de permeação cutânea *in vitro*, o fármaco foi recuperado das camadas da pele (EC, FP e EP) por meio da técnica de *differential tape stripping*, conforme foi explicado no tópico 4.6. As peles foram retiradas das células de Franz (Figura 6), esticadas e fixadas sobre um suporte de isopor recoberto por papel alumínio. Um molde de plástico com área de 1,0 cm<sup>2</sup> foi colocado sobre a pele, deixando apenas a área de transporte do fármaco livre. Em seguida, o EC foi retirado com a utilização de 15 fitas adesivas e o FP foi removido com a aplicação de 1 gota de cola de cianoacrilato e 1 fita adesiva pressionada levemente durante 1 minuto, com a retirada da fita apenas com um movimento único (procedimento realizado 2 vezes para cada pele. Por último, após a retirada do EC e do FP, a EP foi recortada em pequenos pedaços. As fitas adesivas do EC, do FP e a pele picotada da EP foram colocadas em frascos de vidro para extração do fármaco com 5 mL de etanol durante 24 h sem agitação e seu conteúdo foi retirado com uma seringa de 1 mL e filtrado com filtros de membrana hidrofóbicos com porosidade de 0,22 µm e transferidos para os *vials* para análise por CLAE para quantificação do ADP.



**Figura 6.** A) Peles de suínos após a permeação *in vitro* com as formulações comerciais de ADP: Differin® e Deriva® Micro. B) Células de Franz modificadas durante o estudo de permeação *in vitro*. Os ensaios foram realizados em quadruplicata.

#### 4.8 Análise Estatística dos dados

Os dados quantitativos foram representados nas Tabelas e Figuras como média  $\pm$  desvio padrão. As regressões lineares e equações de reta foram obtidas com a utilização do programa Microsoft Excel 2007. A análise estatística dos dados foi realizada com a utilização do programa GraphPad Prism v.3.00. As diferenças significativas entre conjunto de dados foram verificadas por análise de variância *one-way* ANOVA, seguido do teste de Tukey com comparação múltipla dos dados. O nível de significância estatística foi fixado como sendo  $p < 0,05$ .

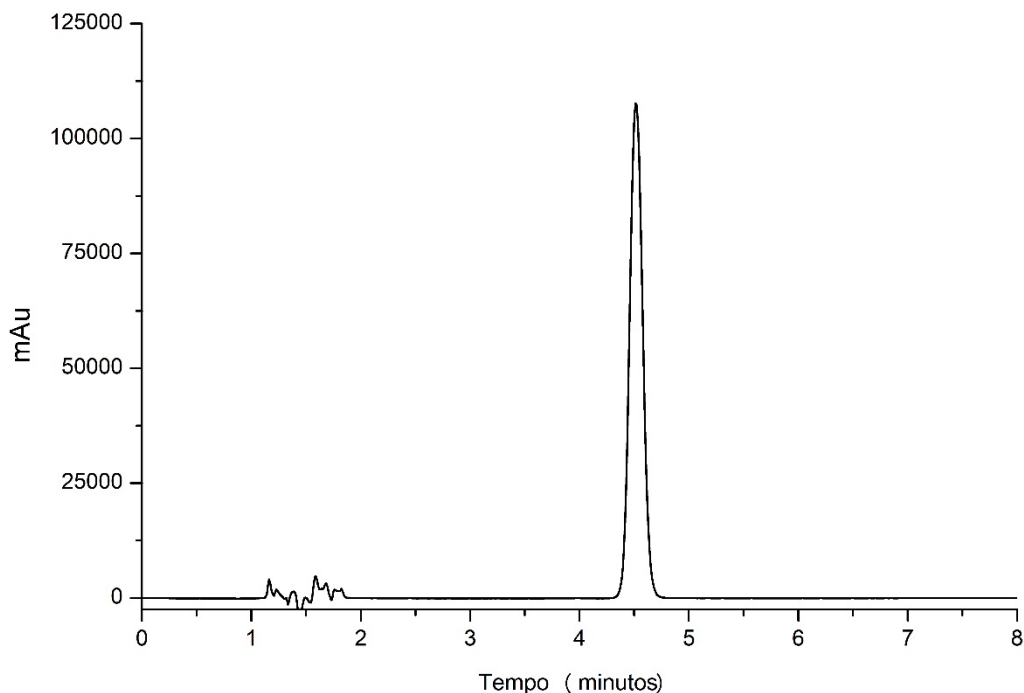
## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Validação do método analítico para quantificação de ADP

A legislação define que a validação tem a função de analisar se o método proposto para determinada análise é adequado para quantificação de um fármaco e outras substâncias. Dessa forma, a validação deve assegurar a confiabilidade dos resultados, cumprindo as exigências analíticas, o que inclui estudos de especificidade/seletividade, linearidade, intervalo, e sensibilidade (limites de detecção e de quantificação) (ANVISA, 2003).

Para a obtenção de um pico cromatográfico com características dentro das especificações de simetria e tempo de retenção foi utilizado como base o método descrito por (MARTINS et al., 2011a), com pequenas alterações, utilizando uma coluna C8 da Shimadzu. A fase móvel inicialmente foi composta por acetonitrila e água acidificada com ácido fosfórico em um pH 2,5 na proporção de 67:33 (v/v), respectivamente. No entanto, com essa proporção da fase móvel, o pico cromatográfico do fármaco não eluiu conforme o previsto. A combinação de acetonitrila e água acidificada com ácido fosfórico pH 2,5 foi então testada em uma proporção de 80:20 (v/v), o que resultou na presença de um pico mais adequado com um tempo de retenção mais próximo do proposto pelo artigo utilizado como referência.

Assim, as análises cromatográficas posteriores foram realizadas utilizando uma coluna C8, fase móvel composta de acetonitrila e água acidificada (pH 2,5) 80:20 (v/v), vazão de 1,4 mL/min, com um volume de injeção de 20  $\mu$ L e a detecção foi feita em 321 nm. O pico cromatográfico do ADP foi observado após 4,5 min de eluição (Figura 7).

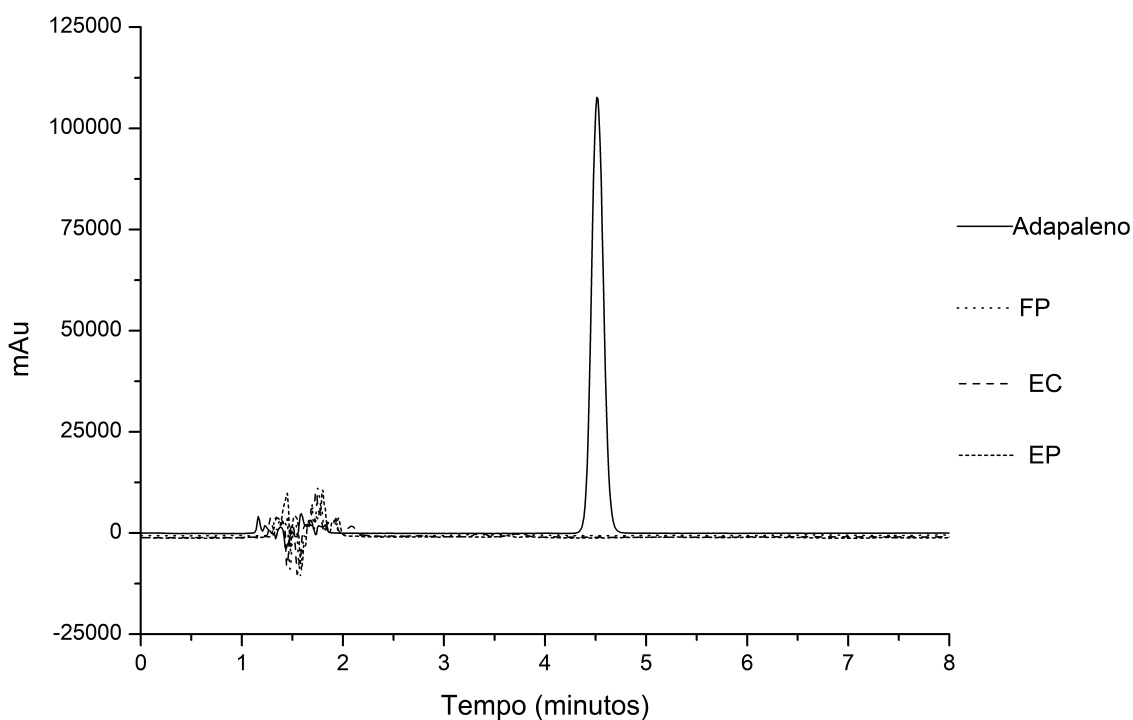


**Figura 7.** Imagem do pico cromatográfico do ADP (20 µg/mL) com eluição em 4,5 minutos.

### 5.1.1 Seletividade

A seletividade constitui em um parâmetro de extrema importância para a validação de um método analítico. Esse quesito garante que, durante a análise de uma amostra, o fármaco será identificado/quantificado de forma segura mesmo na presença de outros compostos ou substâncias como, por exemplo, impurezas, produtos de degradação, componentes de matriz e outros (ANVISA, 2017; ANVISA, 2003; ICH, 2005).

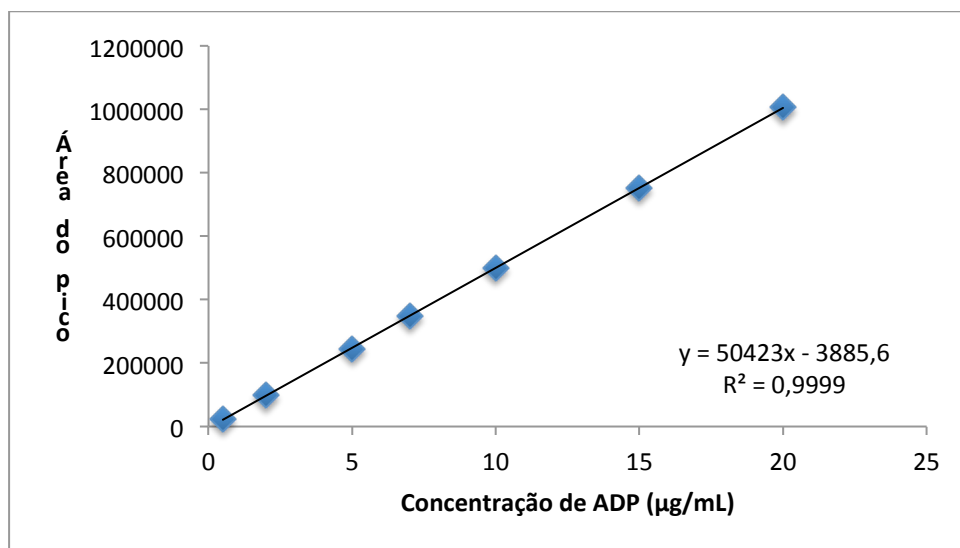
Pode-se verificar na Figura 8 que as diferentes camadas da pele (EC, FP e EP), o solvente utilizado (etanol) e os excipientes das formulações não causaram interferências nem no tempo de retenção, nem na magnitude do pico cromatográfico correspondente ao ADP. Logo, é possível concluir que a pele suína, etanol e os excipientes não causam interferência na quantificação de ADP, provando a seletividade do método para a determinação de ADP.



**Figura 8.** Padrão de ADP em uma concentração de  $7\mu\text{g/ml}$  e interferentes (EC, FP e EP).

### 5.1.2 Linearidade

A linearidade do método corresponde à sua habilidade em obter resultados que são diretamente proporcionais a concentração do analito, possibilitando determinar concentrações de amostras que estão presentes dentro de uma faixa de concentração conhecida de forma linear (GREEN, 1996). Dessa forma, uma curva de calibração foi construída para análise da quantificação de ADP. A equação da curva de calibração foi igual a  $y = 50423x - 38885,6$  e o gráfico está apresentado na Figura 9 abaixo.



**Figura 9.** Representação gráfica da curva analítica obtida por CLAE para soluções etanólicas de ADP na faixa de concentração entre 0,5 e 20,0 µg/mL. Equação da reta:  $y = 50423X - 3885,6$   $r^2 = 0,999$ .

A partir do cálculo da regressão linear, foi possível determinar o coeficiente de correlação linear ( $r$ ) que foi igual a 0,999, valor que está de acordo com o limite estabelecido pela RE nº 899 de 2003 e pela RE nº 166 de 2017, ambas da ANVISA. Logo, o método desenvolvido pode ser considerado linear para quantificação de ADP na faixa de concentração que vai de 0,5 µg/mL a 20 µg/mL.

### 5.1.3 Limites de Detecção e de Quantificação

O limite de detecção corresponde a menor quantidade de um analito (fármaco) que esteja presente em uma amostra e que pode ser detectado por um método instrumental ou não; no entanto, esse valor detectado não é quantificado de forma fidedigna. O limite de quantificação, por sua vez, é a menor concentração do analito que o método é capaz de identificar em uma amostra de forma precisa e exata (ANVISA, 2017; ICH, 2005).

Os limites de detecção e quantificação para o método, respectivamente, foram 0,096 µg/mL e 0,292 µg/mL. Dessa forma, o método é adequado para análise de ADP nas amostras a serem estudadas.

## 5.2 Características físico-químicas das formulações: análise de teor e pH

A formulação de ADP Deriva<sup>®</sup> Micro, segundo as informações do fabricante presente na respectiva bula, contém 1 mg de ADP e 1 mg de excipientes (microesferas – metacrilato, isobutilmetacrilato, etilenoglicolbismetacrilato-, edetato dissódico, carbômer 940, propilenoglicol, metilparabeno, poloxâmer, fenoxietanol, hidróxido de sódio, álcool isopropílico, diclorometano e água purificada). Já a Differin<sup>®</sup> contém 3 mg de ADP e 1 mg de excipientes (carbômer 940, edetato dissódico, metilparabeno, poloxâmer 124, propilenoglicol, hidróxido de sódio e/ou ácido clorídrico para ajuste de pH e água purificada).

A análise de teor teve como objetivo verificar a quantidade de ADP nas formulações para comparar com a concentração informada pelo fabricante e verificar se as quantidades estão dentro das especificações propostas pela legislação. A Farmacopeia Brasileira atual não apresenta a monografia do ADP; dessa forma, conforme a RDC N° 60 de 10 de outubro de 2014 (concessão e renovação de registro de medicamentos), na ausência da monografia na Farmacopeia Brasileira devem ser cumpridos os requisitos propostos em outros compêndios oficiais, normas ou regulamentos específicos aprovados pela ANVISA. Nesse sentido, o compêndio oficial utilizado para verificar a especificação proposta para o ADP foi a USP 40 - United States Pharmacopeia de 2017.

A formulação Deriva<sup>®</sup> Micro apresentou um teor de 108,6% ( $\pm 7,89$ ) de ADP e a Differin<sup>®</sup> apresentou um teor de 97,2% ( $\pm 2,80$ ) de ADP. Considerando-se as especificação da USP- 40, ambas as formulações apresentaram valores fora das especificações de teor, que estariam entre 98 e 102%, apesar de estarem muito próximas. Uma possível explicação para a pequena discrepância de valores está no fato de que o método farmacopeico utilizado pela USP para a dosagem do fármaco na formulação é diferente do utilizado no trabalho.

As formulações Deriva<sup>®</sup> Micro e Differin<sup>®</sup> apresentaram os seguintes valores de pH, respectivamente,  $5,1 \pm 0,03$  e  $5,0 \pm 0,036$ , respectivamente, mostrando-se praticamente iguais e compatíveis com o pH cutâneo (4,6 – 5,8) (LEONARDI; GASPAR; CAMPOS, 2002).



### 5.2.1 Potencial Zeta

O potencial zeta das micropartículas da formulação Deriva® Micro apresentaram um valor de  $-41,31 \pm 1,12$  mV. O potencial negativo pode ser explicado devido à carga residual dos polímeros que compõem as microesferas, os quais são os polímeros derivados do ácido metacrílico e ácido acrílico, que são usados como moduladores de liberação e como agentes bioadesivos, respectivamente (VILLANOVA; ORÉFICE; CUNHA, 2010). Este potencial zeta negativo e superior a 30 mV é indicativo de estabilidade física das microesferas dispersas no gel hidrofílico.

### 5.3 Estudos de recuperação do ADP no estrato córneo (EC), no folículo piloso (FP) e na epiderme remanescente (EP)

Os testes de recuperação de ADP das camadas da pele foram realizados com o objetivo de validar o processo de extração do fármaco após os experimentos de permeação. O método utilizado foi baseado no método de recuperação para o minoxidil proposto por Matos et al. (2015).

A extração do ADP das camadas da pele apresentou eficiência dentro da linearidade do método analítico previamente validado por CLAE. A porcentagem do fármaco recuperado no EC, FP e EP foram  $63,8\% \pm 7,5$ ,  $70,8\% \pm 2,5$  e  $61,3\% \pm 3,6$ , respectivamente. Apesar de a recuperação estar abaixo do limite de 85% proposto para métodos bioanalíticos (CAUSON, 1997), está dentro do que se espera para um método que trabalha com um fármaco extremamente lipofílico como é o ADP. Outros estudos de recuperação para fármacos lipofílicos apresentaram também porcentagens de recuperação pouco acima de 50% (CAMPOS et al., 2015).

### 5.4 Determinação da permeação cutânea *in vitro* de ADP em pele de suínos a partir das formulações

Os estudos de permeação cutânea possuem o objetivo de avaliar a difusão do fármaco nas camadas da pele. A difusão do fármaco ocorre de forma passiva, em que as moléculas passam de uma região do sistema para outra por gradiente de concentração, com as moléculas atravessando uma membrana a partir do lado mais concentrado. As moléculas que atravessam o meio receptor podem ser determinadas analiticamente ao

longo do tempo e, dessa forma, é possível se determinar a quantidade de fármaco permeado (AULTON, 2007; OYAFUSO, 2012; PRAÇA, 2010).

A importância dos estudos de permeação consiste na possibilidade de observar as interações das formulações com a pele, analisando a segurança e eficácia das formulações para uso tópico (OYAFULSO, 2012; TOIGO, 2015).

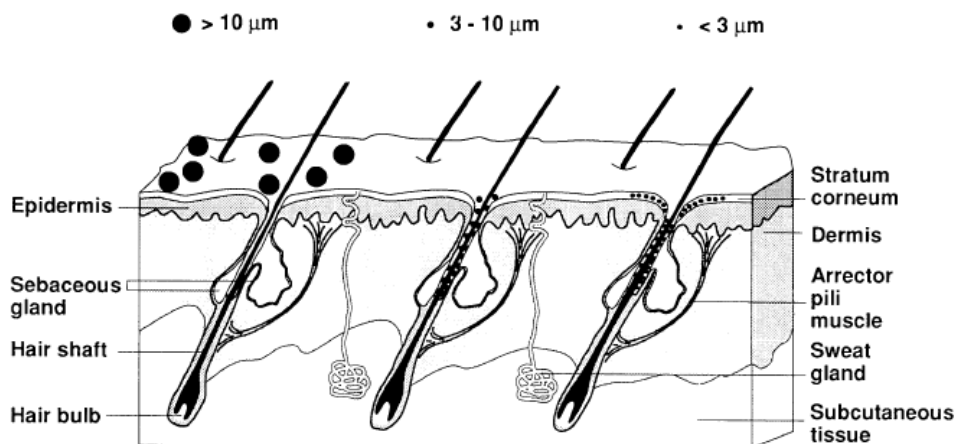
Na terapia dermatológica da *acne vulgaris*, a formulação de ADP é aplicada sobre as lesões causadas pela doença e o efeito do fármaco deve acontecer diretamente no local de aplicação. Dessa forma, após a aplicação da formulação, o fármaco deve atravessar o EC, que atua como um fator limitante na liberação transdérmica de fármacos, uma vez que é relativamente impermeável, contribuindo para a absorção de substâncias lipossolúveis e dificultando a absorção de substâncias insolúveis nos lipídeos presentes nessa camada (ANSEL, 2007; AUTON, 2005; MATOS, 2014).

A permeação no EC pode acontecer por diversas vias como foi explicado anteriormente, como por exemplo, as vias intercelular e transcelular (intracelular), as quais são bem descritas na literatura. No entanto, a via apendicular tem sido muito importante na absorção percutânea de fármacos aplicados por via tópica e aumentar o direcionamento de fármacos para os FP para tratamentos de patologias associadas às estruturas pilosebáceas, como a acne e alopecia, torna-se extremamente relevante (BHATIA; ZHOU; BANGA, 2013; ILLEL, 1997; MOSER, 2001; ROLLAND et al., 1993).

Os FP são invaginações da epiderme que se estendem até a derme, possibilitando uma área de superfície adequada para absorção, visto que é uma estrutura cercada por capilares sanguíneos. No entanto, é importante distinguir o uso dos FP como alvo para liberação sistêmica de fármacos e como alvo para uma terapia farmacológica tópica (BHATIA; ZHOU; BANGA, 2013; MEIDAN; BONNER; MICHNIAK, 2005).

A utilização de formulações tópicas com sistemas de liberação de fármacos nanoparticulados e microparticulados tem sido amplamente estudada com o objetivo de direcionar a liberação passiva de fármacos para a via transfolicular devido ao tamanho das partículas obtidas por esses sistemas. Alguns estudos demonstraram o impacto do tamanho das partículas na penetração dos FP, constatando que micropartículas possuindo um diâmetro de 3 a 10  $\mu\text{m}$  conseguem penetrar de forma seletiva nos ductos

foliculares, enquanto partículas maiores que 10  $\mu\text{m}$  ficam retidas na superfície da pele e micropartículas menores que 3  $\mu\text{m}$  são distribuídas aleatoriamente nos FP e EC conforme apresentado na Figura 10 (ROLLAND et al., 1993).



**Figura 10.** Influência do tamanho das partículas na penetração folicular (ROLLAND et al., 1993).

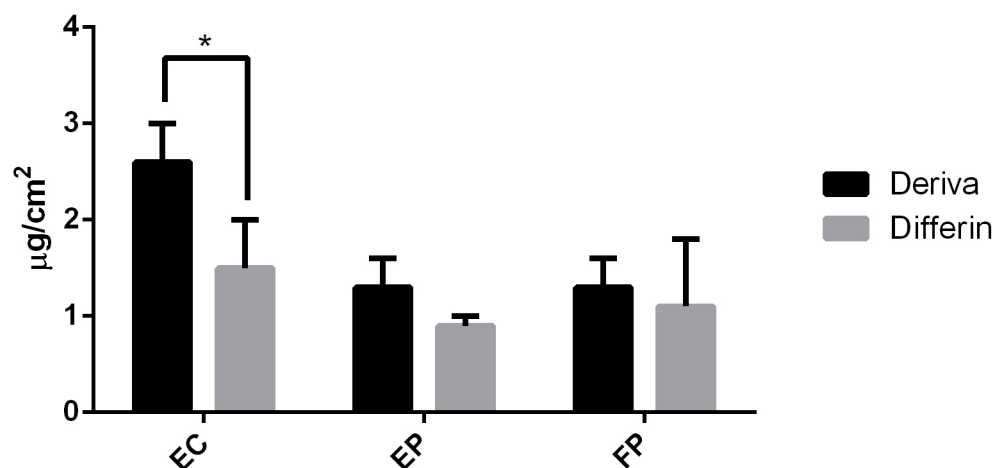
De acordo com o que foi abordado anteriormente, o objetivo dos estudos de permeação *in vitro* neste trabalho foi comparar o perfil de permeação do ADP nas diferentes formulações comerciais com intuito de verificar se as formulações são equivalentes ou não, considerando possuírem tecnologias diferentes.

Os estudos de permeação foram realizados durante 12 h de experimento e após esse período alíquotas de 1mL foram coletadas do compartimento receptor. O fármaco, porém, não foi detectado e nem quantificado durante o experimento. Bathia, Zhou e Banga (2013) descreveram estudos de permeação *in vitro* de microemulsões de ADP utilizando como meio na solução receptora um tampão fosfato salino (PBS) em um pH 7,4 com temperatura constante de 37°C e também não detectaram o ADP nessas condições, visto que as condições não foram otimizadas para que as *sink conditions* fossem cumpridas, além de que o fármaco possui um  $\log P = 8,0$ , dificultando ainda mais a permeação.

Toigo (2015) em estudos com suas nanopartículas de ADP também não encontrou nenhuma quantidade do fármaco em seus estudos de permeação *in vitro* durante 8 h de experimento. A autora ressalta com esses resultados a importância de

evitar a absorção sistêmica de fármacos utilizados no tratamento da acne por via tópica, devendo o fármaco alcançar as camadas mais externas da pele.

Por outro lado, houve penetração de ADP em todas as camadas da pele (EC, FP e EP) para as duas formulações avaliadas, segundo dados mostrados na Figura 11.



**Figura 11.** Quantidade de ADP retido no estrato córneo (EC), folículo piloso (FP) e epiderme (EP) nas diferentes formulações. As barras representam a média  $\pm$  desvio padrão da média.

Como pode ser observado na Figura acima, houve diferença significativa estatisticamente ( $p < 0,05$ ) entre as duas formulações apenas para a quantidade de fármaco retido no EC, e para o FP e EP não houve diferença. As quantidades de ADP encontradas no EC, FP e EP para a Differin<sup>®</sup> foram  $1,5 \pm 0,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ,  $1,1 \pm 0,7 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  e  $0,9 \pm 0,1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ , respectivamente. Já a Deriva<sup>®</sup> Micro apresentou valores de  $2,6 \pm 0,4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ,  $1,3 \pm 0,3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  e  $1,3 \pm 0,3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  para o EC, FP e EP, respectivamente. Dessa forma, é possível observar que maiores quantidades do fármaco foram encontradas no EC em ambas as formulações, o que pode ser explicado devido à característica lipofílica do fármaco. No entanto a Deriva<sup>®</sup> Micro promoveu penetração de ADP em quantidades maiores do que a Differin no EC devido, provavelmente, ao tamanho das micropartículas que permite uma distribuição aleatória no EC (ROLLAND et al., 1993).

É interessante notar que mesmo a Differin<sup>®</sup> contendo concentração três vezes maior que a Deriva<sup>®</sup> Micro em sua composição ( $3\text{mg}/\text{g}$  versus  $1 \text{mg}/\text{g}$  de ADP na formulação, respectivamente), ambas as formulações apresentaram semelhanças nas quantidades de fármaco retidas no FP e na EP. O exposto mostra que a tecnologia de

microencapsulação resultou em um aumento significativo na quantidade do fármaco retido no EC, além disso, não foi capaz de reduzir a dose de fármaco no medicamento mantendo o comportamento semelhante ao da formulação mais simples no FP e na EP.

O presente estudo aponta para a necessidade em se criar legislações mais rigorosas para se colocar medicamentos tópicos no mercado, além da necessidade de legislações específicas para produtos que envolvem tecnologias de micro e nanoencapsulação.

A RDC nº 31/08/2010 define como equivalentes farmacêuticos aqueles medicamentos que apresentam a mesma forma farmacêutica, via de administração, mesma quantidade da substância ativa e os excipientes podem ou não serem idênticos, desde que seja bem estabelecida a função destinada. E formas farmacêuticas de liberação modificada podem conter ou não a mesma quantidade da substância ativa, contanto que liberem quantidades idênticas da mesma substância ativa durante um mesmo intervalo posológico. Enquanto a bioequivalência está relacionada com a biodisponibilidade equivalente entre produtos de acordo com um mesmo desenho experimental (ANVISA, 2010; ANVISA, 2014).

No entanto, a RDC nº 37/08/2011 propõe a bioisenção de estudos de bioequivalência para medicamentos de uso tópico. Sendo assim, a eficácia e segurança desses medicamentos não são comprovadas por estudos de bioequivalência e apenas os estudos de equivalência são analisados para fins de registro de medicamentos de uso tópico no Brasil (SOARES et al., 2015).

Soares et al (2015) desenvolveram um trabalho fazendo um levantamento de todos os medicamentos tópicos que possuem registro no Brasil até o ano de 2013 comparando com a forma que esses medicamentos são registrados internacionalmente em termos de estudos que são necessários para concessão de registro. Os autores concluíram a existência de uma flexibilização das exigências propostas pelas agências reguladoras no Brasil em relação aos estudos necessários para o registro desses medicamentos de forma que não há garantia em relação à bioequivalência das diferentes formulações. Nesse sentido, vale ressaltar a importância que os estudos *in vitro* de permeação possuem para verificar possíveis modificações nas formulações, determinação de biodisponibilidade e bioequivalência de produtos tópicos (LEAL et al., 2017).

## 6. CONCLUSÕES

Os estudos de permeação *in vitro* das formulações comerciais de ADP Deriva<sup>®</sup> Micro e Differin<sup>®</sup> mostraram que as formulações apresentaram diferenças significativas estatisticamente entre si ( $p < 0,05$ ) entre as quantidades de fármaco retidas no EC, enquanto para a retenção de ADP no FP e EP não houve diferença significativa entre elas, mesmo partindo-se de dosagens e tecnologias de produção diferentes. As análises de teor das formulações apresentaram valores muito próximos dos propostos pela especificação da USP-40 para as duas formulações e a diferença dos valores obtidos no trabalho em relação aos valores exigidos na especificação provavelmente deve-se ao fato do método utilizado no trabalho ser diferente do método usado pela farmacopeia americana. As duas formulações apresentaram valores de pH (5,1 para a Deriva<sup>®</sup> Micro e 5,0 para a Differin) compatíveis com pH cutâneo.

O trabalho também apontou para a importância de estudos de permeação cutânea de fármaco em medicamentos tópicos, tanto na parte de desenvolvimento, quanto no controle de qualidade. Ainda, mostrou a lacuna de legislação que existe para esse tipo de produto e, principalmente para aqueles que se utilizam de tecnologia de encapsulação de fármaco.

## 7. REFERÊNCIAS

ANVISA. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), RE N° 899, 2003.

ANVISA. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), RDC N° 166, 2017.

ANVISA. Dispõe sobre os critérios para a concessão e renovação do registro de medicamentos com princípios ativos sintéticos e semissintéticos, classificados como novos, genéricos e similares, e dá outras providências. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), RDC N° 60, 2014.

ANVISA. Guia para isenção e substituição de estudos de biodisponibilidade relativa/bioequivalência. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), RDC N° 37, 2011.

ANVISA. Dispõe sobre a realização dos estudos de equivalência farmacêutica e de perfil de dissolução comparativo. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), RDC N°31, 2010.

ANVISA. BULA DERIVA<sup>®</sup>MICRO Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila\\_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=16961622017&pIdAnexo=8805870](http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=16961622017&pIdAnexo=8805870)>. Acesso em: 14 nov., 2017.

AKHAVAN, A.; BERSHAD, S. Topical Acne Drugs: Review of Clinical Properties, Systemic Exposure, and Safety. **American Journal of Clinical Dermatology**, v. 4, n. 7, p. 473–492, 2003.

BAGATIN, E. et al. Acne vulgaris: prevalence and clinical forms in adolescents from São Paulo, Brazil. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 89, n. 3, p. 428–435, jun. 2014.

BARBERO, A. M.; FRASCH, H. F. Effect of stratum corneum heterogeneity, anisotropy, asymmetry and follicular pathway on transdermal penetration. **Journal of Controlled Release**, v. 260, p. 234–246, ago. 2017.

BETTONI, C. C. Avaliação da penetração cutânea de nanocápsulas de isotretinoína por tape stripping in vitro em pele humana e suína. 2009.

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

BUCHANAN, P. J.; GILMAN, R. H. Retinoids: Literature Review and Suggested Algorithm for Use Prior to Facial Resurfacing Procedures. **Journal of Cutaneous and Aesthetic Surgery**, v. 9, n. 3, p. 139–144, set. 2016.

CARR, D. R.; TREVINO, J. J.; DONNELLY, H. B. Retinoids for chemoprophylaxis of nonmelanoma skin cancer. **Dermatologic Surgery: Official Publication for American Society for Dermatologic Surgery [et Al.]**, v. 37, n. 2, p. 129–145, fev. 2011.

CHEN, Y.-C. et al. Optimization and Validation of High-Performance Chromatographic Condition for Simultaneous Determination of Adapalene and Benzoyl Peroxide by Response Surface Methodology. **PLOS ONE**, v. 10, n. 3, p. e0120171, 20 mar. 2015.

CZERNIELEWSKI, J. et al. Adapalene biochemistry and the evolution of a new topical retinoid for treatment of acne. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology: JEADV**, v. 15 Suppl 3, p. 5–12, 2001.

ELSAIE, M. Hormonal treatment of acne vulgaris: an update. **Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology**, v. Volume 9, p. 241–248, set. 2016.

FDA, F. AND D. A. Guidance for Industry: SUPAC-SS Nonsterile Semisolid Dosage Forms. Scale-up and Post approval changes: Chemistry, manufacturing and controls: in vitro release testing and in vivo Bioequivalence Documentation. maio 1997.

GELFUSO, G. M. et al. Iontophoresis of minoxidil sulphate loaded microparticles, a strategy for follicular drug targeting? **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 134, p. 408–412, out. 2015.

GREEN, J. M. Peer Reviewed: A Practical Guide to Analytical Method Validation. **Analytical Chemistry**, v. 68, n. 9, p. 305A–309A, maio 1996.

GUPTA, M. A.; GUPTA, A. K. Depression and suicidal ideation in dermatology patients with acne, alopecia areata, atopic dermatitis and psoriasis. **The British Journal of Dermatology**, v. 139, n. 5, p. 846–850, nov. 1998.

ILLEL, B. Formulation for transfollicular drug administration: some recent advances. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 14, n. 3, p. 207–219, 1997.

IRBY, C. E.; YENTZER, B. A.; FELDMAN, S. R. A Review of Adapalene in the Treatment of Acne Vulgaris. **Journal of Adolescent Health**, v. 43, n. 5, p. 421–424, nov. 2008.

JAPPE, U. Pathological mechanisms of acne with special emphasis on Propionibacterium acnes and related therapy. **Acta Dermato-Venereologica**, v. 83, n. 4, p. 241–248, 2003.

JUNQUEIRA & CARNEIRO, L. C. U. **Histologia Básica, Texto e Atlas**. Guanabara Koogan, 2013.

KILFOYLE, B. E. et al. Development of paclitaxel-TyroSpheres for topical skin treatment. **Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society**, v. 163, n. 1, p. 18–24, 10 out. 2012.

KUMAR, B. et al. New insights into acne pathogenesis: Exploring the role of acne-associated microbial populations. **Dermatologica Sinica**, v. 34, n. 2, p. 67–73, jun. 2016.

LAI-CHEONG, J. E.; MCGRATH, J. A. Structure and function of skin, hair and nails. **Medicine**, v. 41, n. 6, p. 317–320, jun. 2013.



LEAL, L. B. et al. Registro de medicamentos genéricos tópicos dermatológicos: cenário brasileiro e estudos para demonstração de bioequivalência. **Vigilância Sanitária em Debate**, v. 5, n. 2, p. 3, 31 maio 2017.

LEONARDI, G. R.; GASPAR, L. R.; CAMPOS, P. M. B. G. M. Estudo da variação do pH da pele humana exposta à formulação cosmética acrescida ou não das vitaminas A, E ou de ceramida, por metodologia não invasiva. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 77, n. 5, p. 563–569, out. 2002.

LEYDEN, J.; STEIN-GOLD, L.; WEISS, J. Why Topical Retinoids Are Mainstay of Therapy for Acne. **Dermatology and Therapy**, v. 7, n. 3, p. 293–304, set. 2017.

MARTINS, L. A. et al. A Simple HPLC-DAD Method for Determination of Adapalene in Topical Gel Formulation. **Journal of Chromatographic Science**, v. 49, n. 10, p. 796–800, 1 nov. 2011a.

MATOS, B. N. Desenvolvimento de uma formulação tópica contendo nanopartículas de quitosana como estratégia para aumentar a penetração folicular do minoxidil sulfato no tratamento da alopecia androgênica. 23 maio 2014.

MATOS, B. N. et al. Chitosan nanoparticles for targeting and sustaining minoxidil sulphate delivery to hair follicles. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 75, p. 225–229, abr. 2015.

MEIDAN, V. M.; BONNER, M. C.; MICHNIAK, B. B. Transfollicular drug delivery—Is it a reality? **International Journal of Pharmaceutics**, v. 306, n. 1–2, p. 1–14, dez. 2005.

MICHEL, S.; JOMARD, A.; DÉMARCHEZ, M. Pharmacology of adapalene. **The British Journal of Dermatology**, v. 139 Suppl 52, p. 3–7, out. 1998.

**Moreira Jr Editora | RBM Revista Brasileira de Medicina**. Disponível em: <[http://www.moreirajr.com.br/revistas.asp?id\\_materia=2366&fase=imprime](http://www.moreirajr.com.br/revistas.asp?id_materia=2366&fase=imprime)>. Acesso em: 18 out. 2016.

MOSER, K. Passive skin penetration enhancement and its quantification in vitro. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 52, n. 2, p. 103–112, set. 2001.

NASTITI, C. et al. Topical Nano and Microemulsions for Skin Delivery. **Pharmaceutics**, v. 9, n. 4, p. 37, 21 set. 2017.

OLIVEIRA, P. M. DE. Desenvolvimento e caracterização de micropartículas de quitosana para administração pulmonar de isoniazida. 27 out. 2016.

OYAFUSO, M. H. [UNESP. Desenvolvimento e caracterização de sistemas micro e nanoestruturados para a administração cutânea de acetato de dexametasona. **Aleph**, p. 87 f. : il., graf.,, 26 jun. 2012.

PICARDO, M.; EICHENFIELD, L. F.; TAN, J. Acne and Rosacea. **Dermatology and Therapy**, v. 7, n. S1, p. 43–52, jan. 2017.

PITAKSUTEEPONG, T.; SOMSIRI, A.; WARANUCH, N. Targeted transfollicular delivery of artocarpin extract from *Artocarpus incisus* by means of microparticles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 67, n. 3, p. 639–645, nov. 2007.

POUILLOT, A. et al. The stratum corneum: a double paradox. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 7, n. 2, p. 143–148, jun. 2008.

RAMEZANLI, T.; ZHANG, Z.; MICHNIAK-KOHN, B. B. Development and Characterization of Polymeric Nanoparticle-Based Formulation of Adapalene for Topical Acne Therapy. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, ago. 2016.

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

RIVITTI, E. A. **Manual de dermatologia clínica de Sampaio e Rivitti**. [s.l.] Editora Artes Médicas, 2014., [s.d.].

ROLLAND, A. et al. Site-specific drug delivery to pilosebaceous structures using polymeric microspheres. **Pharmaceutical Research**, v. 10, n. 12, p. 1738–1744, dez. 1993.

ROY, C. Validated Stability-Indicating RP-HPLC Method for Estimation of Degradation Behaviour of Organic Peroxide and Third Generation Synthetic Retinoids in Topical Pharmaceutical Dosage Formulation. **Scientia Pharmaceutica**, v. 83, n. 2, p. 321–338, 2015.

RUSSELL, J. J. Topical therapy for acne. **American Family Physician**, v. 61, n. 2, p. 357–366, 15 jan. 2000.

SILVA, C. et al. Administração oral de peptídeos e proteínas: II. Aplicação de métodos de microencapsulação. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 39, n. 1, p. 1–20, mar. 2003.

SOARES, K. C. C. et al. Bioequivalência de medicamentos tópicos dermatológicos: o cenário brasileiro e os desafios para a vigilância sanitária. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 20, n. 11, p. 3599–3608, nov. 2015.

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

SUH, D. H.; KWON, H. H. What's new in the physiopathology of acne? **British Journal of Dermatology**, v. 172, p. 13–19, jul. 2015.

TOIGO, R. L. P. **Desenvolvimento tecnológico e controle de qualidade de nanopartículas contendo adapaleno e dapsona para aplicação cutânea**. [s.l.] Universidade do Rio Grande do Sul, 2015.

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

USP - 40. United States Pharmacopeial. Agosto,2017.

VILLANOVA, J. C. O.; ORÉFICE, R. L.; CUNHA, A. S. Aplicações farmacêuticas de polímeros. **Polímeros**, v. 20, n. 1, p. 51–64, 2010.

WILLIAMS, H. C.; DELLAVALLE, R. P.; GARNER, S. Acne vulgaris. **The Lancet**, v. 379, n. 9813, p. 361–372, jan. 2012.