

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

**Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto**

**Desenvolvimento e avaliação de  
micropartículas de quitosana para a veiculação  
de dimetilaminoetanol (DMAE) na pele**

**Vilma Antonia Lourenço**

**Ribeirão Preto**

**- 2006 -**

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

**Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto**

**Desenvolvimento e avaliação de  
micropartículas de quitosana para a veiculação  
de dimetilaminoetanol (DMAE) na pele**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos

Orientada: Vilma Antonia Lourenço

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Juliana Maldonado Marchetti

**RIBEIRÃO PRETO**

**- 2006 -**

Lourenço, Vilma Antonia

Desenvolvimento e avaliação de micropartículas de quitosana para a veiculação de dimetiletanol (DMAE) na pele  
Ribeirão Preto, 2006.

117 p. : il. ; 30cm.

Dissertação (Mestrado- Programa de Pós- Graduação em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos)- Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Área de concentração: Fármacos e Medicamentos.

Orientadora: Marchetti, Juliana Maldonado.

1. quitosana 2. DMAE 3. micropartículas 4. pele

Vilma Antonia Lourenço

Desenvolvimento e avaliação de micropartículas de quitosana para a veiculação de dimetilaminoetanol (DMAE) na pele

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos

Banca Examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Ribeirão Preto, de de 2006.

*A Deus,  
por ter-me dado o dom da vida*

*Aos meus pais, Oswaldo e Maria do Carmo Geraldês Lourenço,  
por todo amor, carinho e dedicação*

*Ao meu marido, Sérgio,  
pelo apoio, compreensão  
e companheirismo*

*Aos meus filhos Rafael e Gabriel pela compreensão nos momentos de  
ausência, pela luz e alegria que me dão por suas existências*

*As minhas tias Magdalena e Maria José pelo apoio e constantes orações*

*A Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Juliana M. Marchetti,  
pelo apoio, amizade, dedicação e orientação deste trabalho*

## Agradecimentos

*Ao Prof Dr Roberto Santana da Silva,  
pelos ensinamentos, atenção e colaboração*

*A Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Zenis Novaes da Rocha, pela amizade e valiosa  
contribuição no desenvolvimento deste trabalho*

*As pós-doutorandas Fabiana de Souza Oliveira e Renata Galvão  
pela amizade, companheirismo e colaboração*

*Ao pós-graduando Mário Sérgio Marchesi pela  
colaboração nos experimentos*

*Aos graduandos Maria Cândida Duarte Vila e Wagner Bueno Vieira, pela ajuda e  
dedicação nos experimentos*

*Aos colegas e técnicos do laboratório,  
pela amizade e apoio nas dificuldades*

*A todos aqueles que estiveram ao meu lado e colaboraram para o meu  
crescimento humano e profissional...*

**Obrigada!**

*Que os nossos esforços  
desafiem as impossibilidades.*

*Lembrai-vos de que as  
grandes proezas da História  
foram conquistas daquilo  
que parecia impossível.*

*Charles Chaplin*

## Sumário

<b>Abreviaturas</b> .....	<b>i</b>
<b>Lista de Figuras</b> .....	<b>iii</b>
<b>Lista de Tabelas</b> .....	<b>vi</b>
<b>Resumo</b> .....	<b>vii</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>viii</b>
<b>1 Introdução e Revisão da Literatura</b> .....	<b>1</b>
1.1 A pele.....	2
1.1.1 Histologia da pele.....	2
1.1.2 Função barreira da pele .....	4
1.1.2.1 O folículo piloso como sítio de ação de fármacos .....	6
1.1.2.1.1 Sítios específicos no folículo piloso humano .....	7
1.2 Novos sistemas de liberação .....	9
1.2.1 Sistemas de liberação de substâncias ativas para administração tópica .....	10
1.2.1.1 Sistemas para veiculação de fármacos pela via folicular .....	11
1.2.2 Micro e nanopartículas poliméricas .....	13
1.2.2.1 Propriedades do polímero utilizado no preparo das micropartículas.....	15
1.2.2.2 Estratégias para a encapsulação de substâncias ativas.....	17
1.2.2.3 Micropartículas de quitosana .....	18
1.2.2.3.1 Emulsão “cross-linking” .....	19
1.2.2.3.2 Coacervação simples.....	19
1.2.2.3.3 Coacervação complexa .....	20
1.2.2.3.4 Spray-drying.....	20
1.2.2.3.5 Emulsão/Evaporação do solvente.....	21
1.3 Ativos e sistemas de liberação utilizados na terapia de rejuvenescimento .....	21
1.3.1 Dimetilaminoetanol (DMAE) .....	22
1.3.1.1 Mecanismos de ação do DMAE (uso tópico).....	24
<b>2 Objetivos</b> .....	<b>26</b>
2.1 Objetivo geral .....	27
2.2 Objetivos específicos .....	27

<b>3 Material e métodos</b> .....	<b>28</b>
3.1 Materiais.....	29
3.1.1 Reagentes e solventes .....	29
3.1.2 Fármaco e polímero.....	29
3.1.3 Equipamentos e acessórios .....	30
3.2 Métodos .....	31
3.2.1 Desenvolvimento do método de obtenção das micropartículas de quitosana.....	31
3.2.1.1 Curva de precipitação do polímero pelo sulfato de sódio .....	32
3.2.1.2 Preparo das micropartículas inertes .....	32
3.2.1.3 Preparo das micropartículas contendo DMAE (como bitartarato) .....	34
3.2.1.4 Preparo das micropartículas contendo DMAE base livre .....	34
3.2.2 Caracterização das micropartículas .....	35
3.2.2.1 Microscopia óptica .....	35
3.2.2.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	36
3.2.2.3 Análise da distribuição do tamanho de partículas por espalhamento de luz.....	36
3.2.3 Desenvolvimento da metodologia analítica para a quantificação do DMAE.....	37
3.2.3.1 Estudo eletroquímico .....	37
3.2.3.2 Oxidação do DMAE através da reação com permanganato de potássio e separação.....	37
3.2.3.2.1 Determinação das condições de reação.....	37
3.2.3.2.2 Preparo das colunas de troca iônica .....	38
3.2.3.2.3 Oxidação do DMAE base livre por reação com permanganato de potássio e separação das amostras .....	38
3.2.3.2.4 Oxidação do DMAE (como bitartarato) por reação com permanganato de potássio e separação das amostras .....	39
3.2.3.2.5 Análise do DMAE (como bitartarato) utilizando espectrofotometria na região do ultravioleta .....	40
3.2.3.3 Oxidação do DMAE base livre através da reação do cloro e separação das amostras .....	41
3.2.3.3.1 Determinação das condições de reação.....	41
3.2.3.3.2 Preparo das colunas de troca iônica .....	42
3.2.3.3.3 Oxidação do DMAE base livre por reação do cloro.....	42
3.2.3.3.4 Separação das amostras .....	43
3.2.3.4 Eletrólise a potencial controlado .....	45
3.2.4 Desenvolvimento e validação da metodologia analítica por cromatografia	

líquida de alta eficiência (CLAE) para quantificação do DMAE.....	46
3.2.4.1 Estabelecimento dos parâmetros cromatográficos.....	46
3.2.4.2 Análise cromatográfica do DMAE oxidada através de reação com o cloro .....	47
3.2.4.3 Validação do método .....	48
3.2.4.4 Soluções-padrão.....	48
3.2.4.5 Calibração e linearidade .....	48
3.2.4.6 Precisão e exatidão.....	49
3.2.4.7 Limite de quantificação .....	50
3.2.5 Eficiência de encapsulação .....	50
<b>4 Resultados e Discussão.....</b>	<b>52</b>
4.1 Curva de precipitação do polímero pelo sulfato de sódio.....	53
4.2 Desenvolvimento do método de obtenção das micropartículas de quitosana contendo DMAE .....	53
4.3 Caracterização morfológica das micropartículas contendo DMAE por microscopia óptica.....	54
4.3.1 Micropartículas contendo DMAE (como bitartarato).....	54
4.3.2 Micropartículas contendo DMAE base livre.....	55
4.4 Caracterização morfológica das micropartículas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) .....	56
4.4.1 Micropartículas inertes .....	57
4.4.2 Micropartículas contendo DMAE base livre.....	58
4.5 Análise da distribuição do tamanho das partículas por espalhamento de luz.....	59
4.5.1 Partículas inertes .....	59
4.5.2 Partículas contendo DMAE base livre .....	61
4.6 Desenvolvimento da metodologia analítica para quantificação do DMAE .....	62
4.6.1 Estudo eletroquímico do DMAE.....	62
4.6.2 Oxidação do DMAE por reação com permanganato de potássio e separação das amostras .....	64
4.6.2.1 Espectrofotometria da amostra referente ao DMAE base livre na região do ultravioleta-visível, após oxidação com permanganato de potássio e separação das amostras .....	64
4.6.2.2 Curva analítica referente as amostras de DMAE (como bitartarato) após oxidação e separação.....	65
4.6.3 Oxidação do DMAE base livre através de reação com cloro .....	65
4.6.3.1 Voltametria de pulso diferencial.....	65

4.6.3.2 Espectrofotometria da amostra referente ao DMAE base livre na região do ultravioleta-visível, após oxidação com cloro e separação das amostras.....	68
4.6.4 Eletrólise a potencial controlado .....	69
4.6.4.1 Espectrofotometria da amostra referente ao DMAE base livre na região do ultravioleta-visível, após eletrólise .....	69
4.6.4.2 Gráfico de controle do processo de eletrólise.....	70
4.6.5 Desenvolvimento de validação da metodologia analítica por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para quantificação do DMAE.....	71
4.6.5.1 Análise cromatográfica do DMAE base livre oxidado através de reação com o cloro .....	71
4.6.5.2 Validação do método .....	73
4.6.5.2.1 Gráfico de calibração e linearidade.....	73
4.6.5.2.2 Precisão e exatidão .....	75
4.6.5.2.2.1 Precisão e exatidão intra e inter ensaios.....	75
4.6.5.2.3 Limite de quantificação .....	77
4.7 Eficiência de encapsulação.....	79
<b>5 Conclusões .....</b>	<b>80</b>
<b>Referências.....</b>	<b>82</b>

## Abreviaturas

Ach	Acetilcolina
C	Coulomb
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CV	Coefficiente de variação
DMAE	Dimetilaminoetanol
E	Potencial elétrico
E %	Exatidão
EE	Eficiência de encapsulação
F	Faraday
K	Constante de Boltzmann
LQ	Limite de quantificação
M	Massa
MDS	Sistema de liberação de microesponjas
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
$\eta$	Viscosidade do meio
PCS	Espectroscopia de correlação de fótons
PGA	Ácido poli-glicólico
PLA	Ácido poli-lático
PLGA	Ácido poli-(D,L lático-co-glicólico)
Q	Carga elétrica
r	Coefficiente de correlação linear
S	Estimativa do desvio padrão
T	Temperatura absoluta
UV	Ultravioleta

UVA	Ultravioleta A
UVB	Ultravioleta B
VPD	Voltametria de pulso diferencial
$\bar{X}$	Média dos valores obtidos

## Lista de Figuras

<b>Figura 1-</b>	Representação esquemática da estrutura da pele.....	4
<b>Figura 2-</b>	Representação esquemática dos mecanismos de penetração de substâncias (via transepidérmica e via apêndice) através da pele humana.....	5
<b>Figura 3-</b>	Representação esquemática dos sítios alvos de ação de fármacos nos folículos pilosos terminal e velus.....	9
<b>Figura 4-</b>	Representação esquemática da entrada seletiva de micropartículas para o interior do folículo piloso.....	13
<b>Figura 5-</b>	Formação de quitosana a partir da desacetilação parcial da quitina...	17
<b>Figura 6-</b>	Estrutura química do DMAE.....	24
<b>Figura 7-</b>	Representação esquemática do possível mecanismo de ação do DMAE.....	25
<b>Figura 08-</b>	Esquema do processo de obtenção das micropartículas de quitosana contendo DMAE pelo método de coacervação simples.....	35
<b>Figura 09-</b>	Reação de redução do permanganato em meio ácido.....	38
<b>Figura 10-</b>	Reação de oxidação do DMAE.....	39
<b>Figura 11-</b>	Representação esquemática do processo de oxidação do DMAE por reação com permanganato de potássio e separação da amostra.....	40
<b>Figura 12-</b>	Aparato montado para a oxidação do DMAE através da reação com cloro.....	44
<b>Figura 13-</b>	Sistema utilizado para separação do DMAE.....	44
<b>Figura 14-</b>	Aparelho utilizado para eletrólise.....	45
<b>Figura 15-</b>	Equação de eletrólise do DMAE base livre.....	46
<b>Figura 16-</b>	Curva turbidimétrica do sulfato de sódio.....	53
<b>Figura 17-</b>	Fotografia das micropartículas contendo DMAE (como bitartarato). Aumento de 320X.....	55
<b>Figura 18-</b>	Fotografia das micropartículas contendo DMAE base livre. Aumento de 320X.....	56
<b>Figura 19-</b>	Fotomicrografia da micropartícula inerte de quitosana, referente a amostra "A" . Aumento de 25000X.....	57
<b>Figura 20-</b>	Fotomicrografia das micropartículas de quitosana contendo DMAE base livre. Aumento de 15000X.....	58

<b>Figura 21-</b>	Fotomicrografia das micropartículas de quitosana contendo DMAE base livre. Aumento de 100000X.....	59
<b>Figura 22-</b>	Gráfico representativo da distribuição do tamanho de partículas referente à amostra A.....	60
<b>Figura 23-</b>	Gráfico representativo da distribuição do tamanho de partículas referente à amostra C.....	60
<b>Figura 24-</b>	Gráfico representativo da distribuição do tamanho de partículas referente à amostra preparada com DMAE base livre.....	61
<b>Figura 25-</b>	Oxidação do DMAE .....	63
<b>Figura 26-</b>	Registro da pulso - amperometria do DMAE base livre.....	63
<b>Figura 27-</b>	Espectro de absorção do DMAE base livre na região do ultravioleta-visível após oxidação com permanganato de potássio.....	64
<b>Figura 28-</b>	Curva analítica referente às amostras de DMAE (como bitartarato) após oxidação com permanganato de potássio e separação.....	65
<b>Figura 29-</b>	Voltamograma de pulso do DMAE base livre em tampão fosfato pH 7,4.....	66
<b>Figura 30-</b>	Voltamograma de pulso do DMAE base livre em tampão fosfato pH 7,4 após eletrólise parcial.....	67
<b>Figura 31-</b>	Voltamograma de pulso do DMAE base livre em tampão fosfato pH 7,4 após eletrólise total.....	67
<b>Figura 32-</b>	Potencial de redução do cloro.....	68
<b>Figura 33-</b>	Reação de transferência de elétrons entre o Cl <sub>2</sub> e o DMAE base livre..	68
<b>Figura 34-</b>	Espectro de absorção do DMAE base livre (1,0x10 <sup>5</sup> mol.L <sup>-1</sup> ) na região do ultravioleta-visível após oxidação com cloro e separação da amostra.....	68
<b>Figura 35-</b>	Espectro de absorção do DMAE base livre na região do ultravioleta após eletrólise.....	69
<b>Figura 36-</b>	Gráfico de controle do processo de eletrólise do DMAE base livre nas concentrações de 1,5 e 2,5x10 <sup>-5</sup> mol.L <sup>-1</sup> .....	70
<b>Figura 37-</b>	Curva analítica referente às amostras de DMAE base livre após oxidação por cloro e separação.....	71
<b>Figura 38-</b>	Cromatograma referente à amostra de DMAE base livre após oxidação com cloro e separação.....	73

<b>Figura 39-</b>	Gráfico de linearidade para análise do DMAE base livre após oxidação por eletrólise no intervalo de concentrações de $1,5 - 6,0 \times 10$ mol.L .....	74
<b>Figura 40-</b>	Gráfico de controle do processo de eletrólise das amostras de DMAE base livre na concentração de $1,5 \times 10$ mol.L <sup>1</sup> , durante intraensaio....	76
<b>Figura 41-</b>	Cromatograma referente à amostra de DMAE base livre após oxidação por eletrólise.....	78

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1-</b>	Protocolo experimental para a obtenção da curva de precipitação do polímero pelo sulfato de sódio.....	32
<b>Tabela 2-</b>	Tamanho das partículas (nm) e distribuição granulométrica (%) referente às amostras A e C.....	60
<b>Tabela 3-</b>	Tamanho das partículas (nm) e distribuição granulométrica (%) referente à amostra preparada com DMAE base livre.....	61
<b>Tabela 4-</b>	Avaliação da precisão e exatidão do método para análise do DMAE.....	77
<b>Tabela 5-</b>	Avaliação do limite de quantificação do método para análise do DMAE.....	78
<b>Tabela 6-</b>	Avaliação da eficiência de encapsulação.....	79

## RESUMO

LOURENÇO, V.A. Desenvolvimento e avaliação de micropartículas de quitosana para a veiculação de dimetilmetilaminoetanol (DMAE) na pele. 2006. 117 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

Micropartículas de quitosana contendo DMAE foram preparadas utilizando o método de coacervação simples. A morfologia das partículas foi observada utilizando um Microscópio Eletrônico de Varredura. O tamanho das partículas foi medido por técnica de espalhamento de luz. As partículas obtidas possuem forma esférica e superfície irregular. Apresentaram uma distribuição de tamanho entre 419 e 528 nm. O pequeno índice de polidispersividade sugere que a distribuição do tamanho de partícula é homogêneo. O rendimento do processo e eficiência de encapsulação foram de 90% e 63%, respectivamente. O desenvolvimento de um novo sistema de liberação requer uma metodologia analítica para a identificação e quantificação do fármaco. Neste trabalho um método simples por cromatografia de fase reversa desenvolvido para a análise do DMAE é apresentado. O DMAE foi analisado utilizando-se uma coluna Merck RP 18 column 5  $\mu\text{m}$  (125 x 4 mm D.I.). A fase móvel foi tampão fosfato pH 7,4; acetonitrila (99,5:0,5 v/v) a um fluxo de 0,5 mL.min<sup>-1</sup>. O comprimento de onda de detecção foi de 208nm à temperatura ambiente (25°C). Linearidade foi obtida para uma faixa de  $1,5 \times 10^{-4}$  a  $6,0 \times 10^{-4}$  mol.L<sup>-1</sup>. Para os ensaios intra e inter dia o coeficiente de variação foi menor que 10%. Este novo método desenvolvido para a quantificação do DMAE apresentou sensibilidade e seletividade, demonstrando ser um método vantajoso e confiável para a realização dos estudos propostos. O método de encapsulação mostrou-se adequado para a preparação de micropartículas de quitosana contendo DMAE, porque apresentou alto rendimento e excelente eficiência de encapsulação.

**Key words:** DMAE, micropartículas, CLAE

**ABSTRACT**

LOURENÇO, V.A. Development and evaluation of chitosan microparticles containing dimethylaminoethanol (DMAE) for skin vehiculation. 2006. 117 f. Dissertation - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

Chitosan microparticles containing DMAE were prepared by using the simple coacervation method. A scanning electron microscopy (SEM) was used to observe microparticles morphology. Particle size was measured by laser light scattering. Particles presented spherical shape, irregular surface and size distribution between 419 and 528 nm. The small polydispersity index suggested that size distribution is homogeneous. Process yield and encapsulation efficiency were 90% and 63%, respectively. The development of a new drug delivery system requires analytical methods for identification and quantification of this drug. In the present study a simple reversed-phase high performance liquid chromatography developed for *DMAE* assay is presented. The DMAE was analyzed using/by means of a 5  $\mu\text{m}$  Merck RP 18 column (125 x 4 mm I.D.). The mobile phase was phosphate buffer pH 7,4; acetonitrile (99,5:0,5 v/v) at a flow rate of 0,5 mL.min<sup>-1</sup>. Detection was carried out at 208nm at room temperature (25°C). Linearity was obtained from  $1,5 \times 10^{-4}$  to  $6,0 \times 10^{-4}$  mol.L<sup>-1</sup>. Intra and inter- assay coefficient of variation was less than 10 %. This new method developed to assay DMAE presented sensibility and selectivity, providing a useful and reliable means to perform the proposed studies. The encapsulation method was proven suitable to the preparation of chitosan microparticles containing DMAE because it presented high yields and excellent encapsulation efficiency.

**Key words:** DMAE, microparticles, HPLC

## 1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

## 1.1 A pele

### 1.1.1 Histologia da pele

A pele é o manto que reveste todo o organismo, indispensável à vida e que isola os componentes orgânicos do meio exterior. É composta de uma estrutura complexa de tecidos de naturezas variadas, dispostos e interrelacionados de modo a adequar-se de maneira harmônica ao desempenho de suas funções.

A pele representa ao mesmo tempo uma barreira protetora e o principal órgão de comunicação com o exterior. Esta barreira biológica é composta de três camadas: a epiderme, a derme e o tecido subcutâneo.

A epiderme é essencialmente dividida em duas partes: a parte mais interna, que corresponde à epiderme viável (150 $\mu$ m) (HOUK; GUY, 1988) e o estrato córneo, que constitui a parte mais externa. A epiderme viável é subdividida em quatro subcamadas: estrato lúcido, estrato granuloso, estrato espinoso e estrato germinativo, sendo responsável pela multiplicação e diferenciação de células, que dão origem às células do estrato córneo. O estrato córneo é a camada mais superficial da epiderme (5 a 8  $\mu$ m, chegando excepcionalmente a 20 $\mu$ m). Mais de 90% de suas células são corneócitos (CEVC, 2004). Os corneócitos são células achatadas, anucleadas e preenchidas com queratina. Nos mamíferos esses corneócitos estão distribuídos em aproximadamente quinze camadas (CEVC, 2004) e encontram-se associados com numerosos desmossomas. Entre os corneócitos há uma grande quantidade de material lipídico, altamente organizado, que funciona como um "cimento" extracelular, vedando os espaços entre as células. Esses lipídeos compreendem ácidos graxos livres, colesterol, ésteres de colesterol e ceramidas (CEVC et al., 1996). A qualidade, a

quantidade e a cristalinidade dos lipídeos do estrato córneo determinam a perfeição da barreira da pele (CEVC, 2004). A camada córnea constitui a principal barreira para a passagem de solutos (ABRAHAM et al., 1995) e, juntamente com a matriz lipídica, possui grande importância nos estudos de permeabilidade da pele.

A derme (2mm) é um tecido conectivo composto de fibras colágenas, elásticas, reticulina e da substância fundamental, que dá suporte aos vasos sanguíneos, linfáticos e às células nervosas.

Os apêndices cutâneos (os folículos pilosos, as glândulas sebáceas e as glândulas sudoríparas) originam-se na derme e estendem-se até a superfície da pele. Na derme estão presentes também os fibroblastos (células responsáveis pela produção da substância fundamental e pelas fibras) e as células de defesa. O transporte de solutos nesta área é rápido, podendo atingir a circulação sistêmica, através dos vasos sanguíneos.

O tecido subcutâneo está localizado abaixo da derme e constitui-se num tecido fibrilar, contendo células adiposas que desempenham papel de proteção mecânica, de conservação da temperatura corporal e de reserva de calorías. Não possui um papel na absorção percutânea, porque se situa abaixo do sistema vascular, localizado na derme (SINGH; SINGH, 1993). A estrutura anatômica da pele está representada na

**Figura 01.**

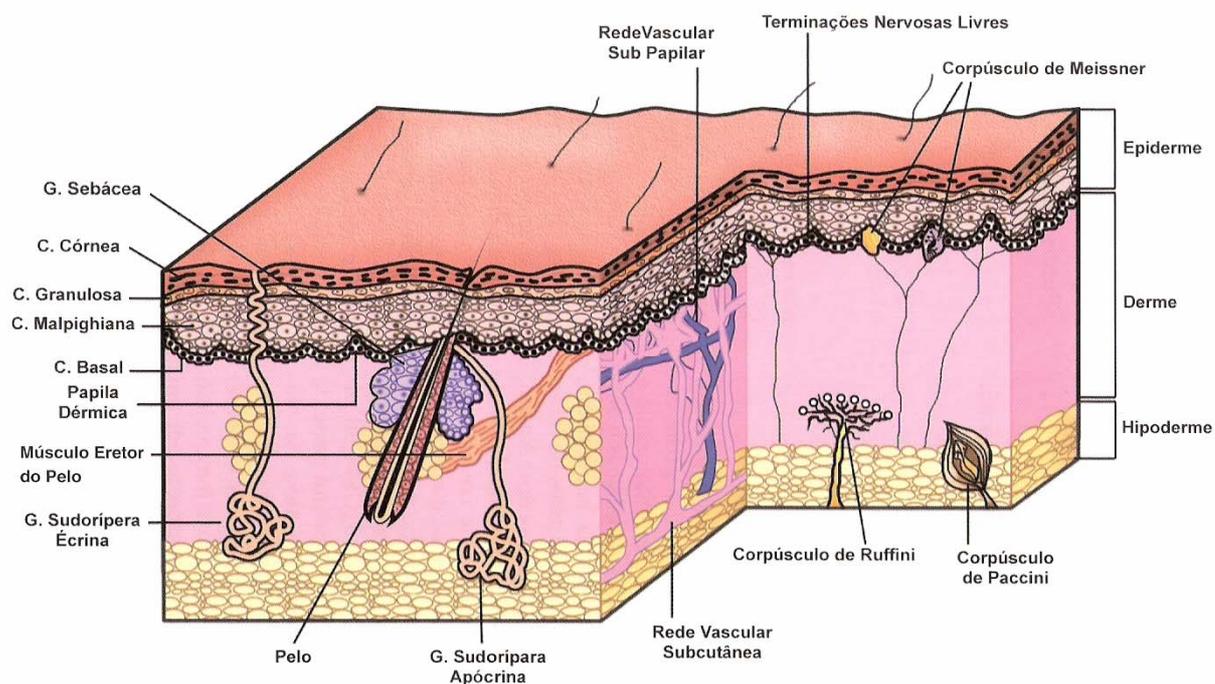


Figura 01- Representação esquemática da estrutura da pele (SAMPAIO; RIVITTI, 2001)

### 1.1.2 Função barreira da pele

A pele constitui uma barreira à penetração de fármacos, devido a estrutura da epiderme. Para que um fármaco seja absorvido através da pele, deve romper a barreira imposta pelo estrato córneo e também as camadas subsequentes da epiderme para atingir a derme, podendo eventualmente passar para a corrente sanguínea e ter uma ação sistêmica. Os produtos cosméticos não visam uma ação sistêmica, mas na sua grande maioria, devem proporcionar uma melhor penetração entre as camadas da epiderme.

Três mecanismos têm sido sugeridos para a penetração de solutos através do estrato córneo (i) permeação transfolicular (através dos folículos pilosos) e pelos ductos sudoríparos. Várias investigações, têm estabelecido que a rota transfolicular é

bastante significativa como via de penetração para muitos compostos (GUPCHUP; ZATZ, 1997), (ii) permeação transcelular: os solutos passam diretamente através das células cornoas e da matriz lipídica intercelular e (iii) permeação intercelular: os solutos difundem-se ao redor das células cornoas de uma maneira tortuosa, permanecendo constantemente dentro da matriz lipídica (ABRAHAM et al., 1995). Os mecanismos de penetração de substâncias através da pele estão representados na **Figura 02**.

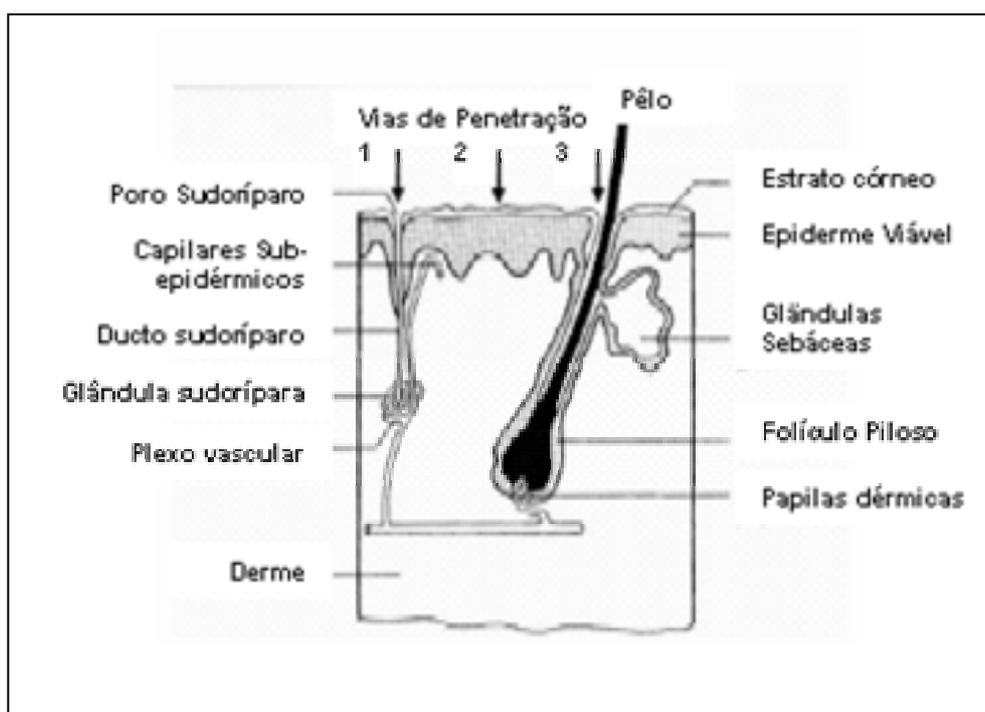


Figura 02- Representação esquemática dos mecanismos de penetração de substâncias (via transepidérmica e via apêndice) através da pele humana, 1 = Glândula sebácea, 2 = Via transepidérmica e 3 = Folículo piloso (adaptado de BARRY, 2002).

É muito difícil a permeação de moléculas com tamanho superior a 200-350 Daltons na pele intacta (CEVC et al., 1996), podendo-se dizer que o tamanho máximo a ser considerado é de 400 Daltons. A maioria de pequenas moléculas solúveis em água, não eletrólitos, difundem até a circulação sistêmica até mil vezes mais rápido quando a camada córnea está ausente. Assim, para maximizar o fluxo de substâncias,

tentamos reduzir este obstáculo, embora algumas vezes a via folicular possa ser importante (BARRY, 2001).

Do ponto de vista da penetração, a pele age como uma barreira mecânica nano-porosa, perfurada por um grande número de canais ou caminhos quase semi-circulares. A maioria das publicações estimam que esses “poros” hidrofílicos possuam um diâmetro médio que varia entre 0,4 a 36,0 nm. Como a maioria das moléculas passíveis de permear, atravessam a pele por esses “microcanais” intercelulares, muitas técnicas têm sido propostas para melhorar esse percurso e transpor a arquitetura molecular representada pelos corneócitos e pelas múltiplas camadas de lipídeos intercelulares (BARRY, 2001).

#### **1.1.2.1 O folículo piloso como sítio de ação de fármacos**

As unidades pilosebáceas têm um importante papel nos processos de permeação e penetração de compostos aplicados topicamente. O folículo piloso humano não constitui somente um reservatório, mas também um ponto de entrada para substâncias aplicadas topicamente e contribui significativamente para o transporte de fármacos para o interior da pele (VOGT et al., 2005).

Sistemas de liberação de fármacos e formulações destinadas a ter o folículo piloso humano como alvo seletivo, podem permitir o envio de doses efetivas de compostos ativos para o interior do ducto folicular. Possíveis aplicações incluem o tratamento de anormalidades do crescimento dos pêlos, bem como o tratamento de doenças associadas ao folículo piloso e de desordens gerais da pele (VOGT et al., 2005).

### **1.1.2.1.1 Sítios específicos no folículo piloso humano**

#### **Infundíbulo folicular**

Nas regiões inferiores do infundíbulo folicular, poucos corneócitos diferenciados permanecem e a epiderme pode ser considerada altamente permeável. Devido a este aumento na permeabilidade do epitélio folicular, células epiteliais e outras populações de células presentes constitui um caminho para aplicação tópica de compostos (VOGT et al., 2005).

#### **Glândula sebácea**

A glândula sebácea é interconectada com o folículo piloso humano através do ducto sebáceo, o qual se abre para o interior do canal folicular na região mais baixa do infundíbulo, estando localizado a aproximadamente 100-500 $\mu$ m abaixo da superfície da pele (VIRAGH; MEULI, 1995). Portanto, o folículo piloso pode ser uma promissora via para a terapia tópica do acne (VOGT et al., 2005).

#### **Istmo**

O istmo consiste de uma discreta coleção de células da bainha radicular externa, localizada próxima a inserção do músculo eretor do pêlo (COTSARELIS et al., 1990), 500-800 $\mu$ m abaixo da superfície da pele (VOGT et al., 2005). A região do istmo contém células precursoras foliculares, além de regular o crescimento do pêlo; juntamente com a papila dérmica, constituem as células germinativas precursoras (JAHODA; REYNOLDAS, 1996). Recentemente foi demonstrado que células precursoras

de melanócitos também estão situadas na região do istmo e subistmo (NISHIMURA et al., 2002; SHAROV et al., 2003).

### **Tipos de folículos pilosos**

O pêlo humano pode ser dividido em dois principais tipos: os pêlos terminais e os velus. Pêlos terminais são macroscopicamente longos (> 2 cm), possuem uma espessura maior que 0,03 mm, são pigmentados e contêm uma cavidade medular (SILVER,1975; WHITING et al., 2000). Pêlos velus não são pigmentados, são mais finos do que 30  $\mu\text{m}$ , sedosos e não crescem mais do que 2 cm.

A duração da fase anágena (de crescimento) e telógena (de queda) do folículo piloso e a porcentagem de pêlos nas diferentes fases de crescimento diferem significativamente entre os pêlos velus e terminais e em diferentes regiões do corpo, contribuindo para as diferenças entre o comprimento e a espessura entre os folículos pilosos (RICHARDA; MEHARG, 1995).

O infundíbulo, a glândula sebácea e o istmo são sítios de ação importantes em ambos folículos, terminal e velus. A **Figura 03** ilustra os sítios alvos, dos dois tipos de folículos pilosos, que podem ser utilizados como uma via para a penetração de ativos.

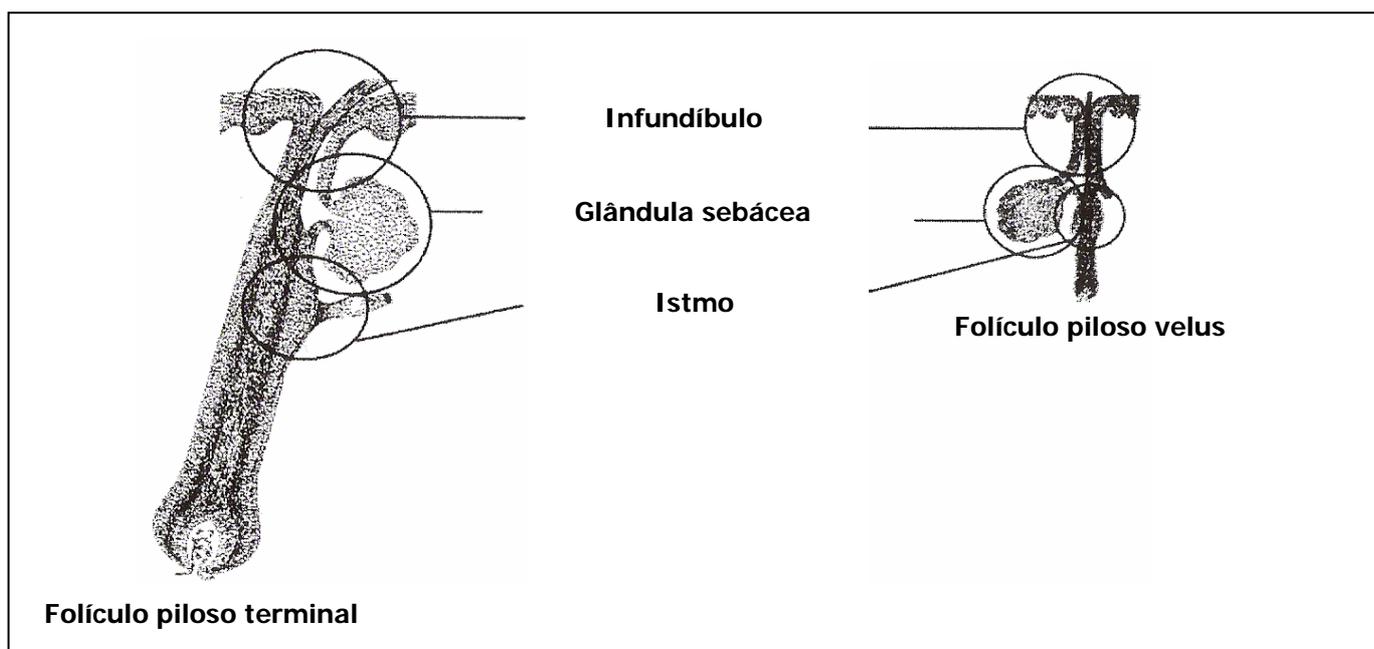


Figura 03- Representação esquemática dos sítios alvos de ação de fármacos nos folículos pilosos terminal e velus (adaptado de VOGT et al., 2005)

O tipo do folículo piloso pode afetar a penetração de fármacos pela diferença no diâmetro folicular. Assim, folículos pilosos terminais podem mostrar um maior grau de penetração do que os velus (TOLL et al., 2004). Além dessas características anatômicas, um grande número de fatores, incluindo os sistemas de liberação de fármacos, a formulação, a temperatura, a umidade e as técnicas de pré-tratamento da pele, influenciam o grau de deposição do fármaco na unidade pilosebácea (VOGT et al., 2005).

## 1.2 Novos sistemas de liberação

**O**s novos sistemas são capazes de modificar a liberação de fármacos, disponibilizando-os na quantidade adequada e em um determinado sítio de absorção. Estes sistemas podem ter diferentes formas: lipossomos, microemulsões, micro e nanopartículas e outros (QUINTANAR-GUERRERO et

al., 1998).

### **1.2.1 Sistemas de liberação de substâncias ativas para administração tópica**

**E**m bora o conceito de sistema de liberação de fármacos não seja novo, grande progresso têm sido feito recentemente com a sua utilização no tratamento de uma variedade de patologias (KUMAR; KUMAR, 2001) .

O desenvolvimento de sistemas de liberação para veiculação de substâncias ativas na epiderme, com manutenção das mesmas no local de ação, constitui uma nova área de pesquisa. Em alguns casos, há uma necessidade de maximizar o tempo de permanência do composto na pele, minimizando sua absorção transdérmica (EMBRIL; NACHT, 1996; ROGERS, 1999).

As diferentes propriedades dos sistemas de liberação modificada trouxeram vários benefícios para os produtos farmacêuticos e cosméticos, sendo que estes são dependentes não somente dos princípios ativos, mas também do sistema de liberação no qual são veiculados. Esses sistemas podem liberar o princípio ativo em áreas específicas (ROGERS, 1999), bem como prever a taxa de liberação destes na pele (NACHT, 1995).

Os sistemas de liberação facilitam a veiculação de compostos lábeis, aumentando a eficácia da formulação e melhorando a estética do produto final (NACHT, 1995).

Os lipossomas e os niossomas, as ciclodextrinas, as micropartículas (microcápsulas, microesferas) e as nanopartículas (nanocápsulas e nanoesferas) constituem alguns tipos de sistemas de liberação utilizados para veiculação de substâncias ativas para administração tópica (MAGDASSI, 1997; ROGERS, 1999; LOPEZ et al., 2000; PIERRE et al., 2001; MORGANTI et al., 2001; ALENCASTRE, 2002).

Ainda podemos ressaltar o sistema baseado em gel fase cúbico, que mostrou-se como um potencial sistema de liberação de pró-fármacos e fotossensibilizadores na terapia fotodinâmica de doenças cutâneas (TURCHIELLO, et al., 2003). Dentre estes, as micropartículas apresentam-se como sistemas promissores, visto que não possuem limitação tecnológica, possuem maior estabilidade físico-química e permitem a incorporação em diferentes formulações. Os sistemas microparticulados podem ser utilizados como veículos para liberação modificada de uma grande variedade de ativos (SOPPIMATH, 2001; SINHA, 2004).

#### **1.2.1.1 Sistemas para veiculação de fármacos pela via folicular**

Dentre os sistemas freqüentemente estudados para terapia tópica, destacam-se as micropartículas, por apresentarem boa estabilidade e por permitir uma liberação modificada de compostos ativos. Estudos recentes mostraram que a penetração das micropartículas através dos apêndices cutâneos é proporcional ao seu tamanho (TOLL et al., 2004). Nenhuma micropartícula maior que 10 $\mu$ m penetra pelos orifícios foliculares ou pela camada córnea, enquanto que as partículas com diâmetro entre 9 e 10 $\mu$ m concentram-se em torno da abertura do folículo sem qualquer penetração. Micropartículas com 7 $\mu$ m podem ser freqüentemente observadas nas regiões mais profundas do canal folicular, mas raramente penetram no estrato córneo. Micropartículas com 5 $\mu$ m mostram uma alta concentração no ducto folicular, mas também não podem penetrar através do estrato córneo (TOLL et al., 2004). Entretanto, micropartículas menores que 3 $\mu$ m, estudadas por Rolland et al (1993), penetraram bem no interior desse apêndice cutâneo e foram observadas também nas camadas superficiais do estrato córneo, porém nunca na epiderme viável.

Vários estudos têm explorado o uso de micropartículas para aplicação tópica de diversos compostos. Rolland et al (1993) relataram que o adapaleno microencapsulado (microesferas com diâmetro médio de  $5\mu\text{m}$ ) foi observado no ducto folicular, mas não penetrou no estrato córneo. Jennings et al (2000), demonstraram que nanopartículas sólidas lipídicas contendo vitamina A, liberaram efetivamente a vitamina para as camadas superficiais da pele, mas não parecem aumentar a concentração desta nas camadas mais profundas da pele. Um grupo de pesquisadores da Universidade de Berlim, apresentou uma série de investigações do perfil de penetração de micropartículas com tamanhos entre  $0,75\mu\text{m}$  até  $6,0\mu\text{m}$ , no couro cabeludo humano. Partículas com  $6,0\mu\text{m}$  agregaram-se na região infundibular dos folículos pilosos terminais e penetraram aproximadamente  $500\mu\text{m}$  abaixo da superfície da pele, o qual corresponde aproximadamente ao nível de entrada do ducto sebáceo (TOLL et al., 2004). Partículas menores, com um diâmetro de  $1,5$  ou  $0,75\mu\text{m}$ , penetraram mais profundamente, sendo localizadas abaixo da região do istmo, à aproximadamente  $800\mu\text{m}$  da superfície da pele, em 40,0% dos folículos pilosos terminais. Esses dados sugerem que micropartículas de diferentes tamanhos podem atingir alvos seletivos dentro dos folículos pilosos humanos, principalmente o infundíbulo e a região do istmo (VOGT et al., 2005). A **Figura 04** representa a entrada seletiva de micropartículas para o interior do folículo piloso.

Diversos estudos têm comprovado que o uso de sistemas micro e nanoparticulados melhoram a permanência do fármaco na pele, sem aumentar o transporte transdermal (ALVAREZ-ROMÁN et al., 2004).

Em vista do exposto, a via folicular oferece extraordinária oportunidade para a veiculação de fármacos para a terapia dermatológica e para os cosméticos funcionais.

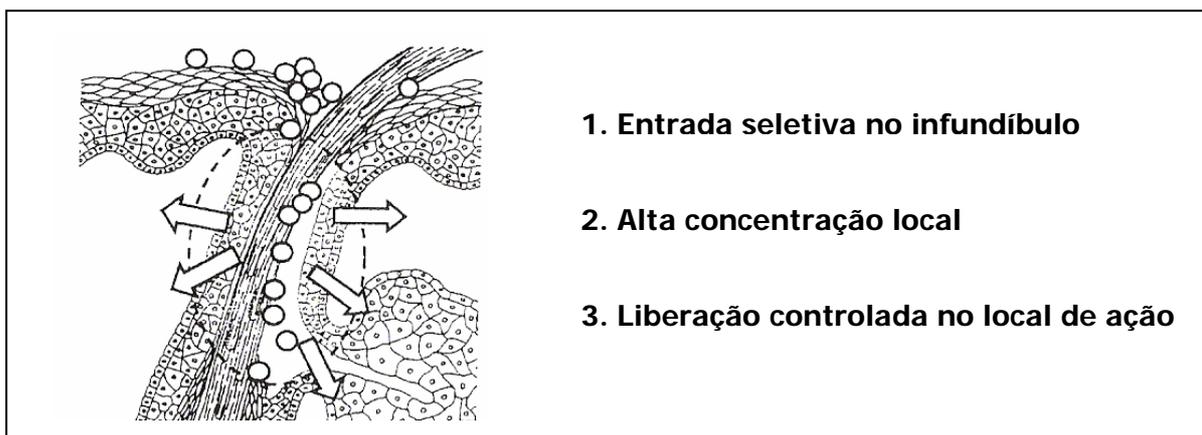


Figura 04- Representação esquemática da entrada seletiva de micropartículas para o interior do folículo piloso (adaptado de VOGT et al., 2005)

### 1.2.2 Micro e nanopartículas poliméricas

**M**icro e nanopartículas poliméricas estão sendo cada vez mais investigadas por suas propriedades de liberação sustentada e por alcançar sítios específicos de ação de fármacos (FREITAS; MARCHETTI, 2005).

O termo micro/nanopartículas é genérico, sendo utilizado de acordo com o tamanho da partícula a que se está referindo. Partículas com diâmetro menor que 1  $\mu\text{m}$  são considerados nanopartículas, enquanto que partículas cujo diâmetro é maior ou igual a 1  $\mu\text{m}$  são denominadas micropartículas. O termo micro/nanopartículas refere-se também a dois tipos de estruturas diferentes: micro/nanoesferas e micro/nanocápsulas. Denominam-se esferas os sistemas em que a substância ativa encontra-se homoganeamente dispersa no interior da matriz polimérica (COUVREUR et al., 1996). Micro/nanocápsulas constituem sistemas reservatórios, onde é possível identificar-se o núcleo diferenciado, que pode ser sólido ou líquido (ANDRÉO-FILHO; OLIVEIRA, 1999).

As micro/nanocápsulas são pequenas partículas compostas por uma cavidade central denominada núcleo, que contém a substância ativa e um material de parede ou

revestimento, que circunda a região central. O tamanho das microcápsulas pode variar de alguns nm até 1000  $\mu\text{m}$ . O material do núcleo pode ser um líquido ou um material sólido. O material de revestimento pode ser composto de polímeros orgânicos, de gorduras, de proteínas, de polisacarídeos, entre outros. De acordo com Finch (1990) as microcápsulas podem ser produzidas por mais de 200 métodos. Dependendo dos processos e materiais utilizados na produção dos sistemas microparticulados, a liberação do conteúdo encapsulado pode ocorrer por um processo de ruptura mecânica da parede, bioerosão ou difusão da substância ativa.

As micro/nanoesferas diferem das micro/nanocápsulas por constituírem sistemas de matrizes sólidas onde um material polimerizado forma uma rede tridimensional, na qual a substância ativa pode ser adsorvida, incorporada ou ligada covalentemente na superfície da partícula, formando sistemas de dissolução, dispersão, ou sistemas porosos (OLIVEIRA et al., 1992). Estes sistemas podem ser formados utilizando-se uma variedade de polímeros, tais como: gelatina, alginato, albumina, polisiloxanos, copolímeros de estireno, acrilatos, ácido láctico e glicólico, entre outros.

Um exemplo típico da utilização de microesferas em formulações de uso tópico é o sistema de liberação de microesponjas (MDS), patenteado pela Advanced Polymer Systems. Este sistema polimérico é constituído de microesferas porosas que podem liberar uma grande variedade de ativos, tais como emolientes, fragrâncias, óleos essenciais, filtros solares, antibacterianos, antifúngicos e antiinflamatórios. As microesponjas podem ser estruturas rígidas ou macias, dependendo da composição polimérica, do grau de ligação cruzada ("crosslinking") e dos parâmetros necessários para se alcançar a taxa de liberação desejada de ativos através dos poros. A liberação do conteúdo pode ser iniciada por pressão, por alterações de temperatura, de solubilidade e de difusão da substância ativa (EMBRIL; NACHT, 1996).

### 1.2.2.1 Propriedades do polímero utilizado no preparo das micropartículas

Muitos materiais podem ser utilizados para a obtenção de micropartículas: polímeros naturais como a gelatina, a goma arábica, a quitosana e os derivados celulósicos, polímeros biodegradáveis sintéticos, polietilenoglicol, compostos vinílicos, entre outros. Dentre os polímeros biodegradáveis sintéticos, ressaltamos os poli(ésteres) alifáticos como o ácido láctico (PLA), o ácido glicólico (PGA) e seu copolímero ácido láctico-co-glicólico (PLGA) que têm sido alvo de muitos estudos.

A utilização de polímeros naturais tem grande interesse por serem biocompatíveis e biodegradáveis. Dentre os polímeros naturais, a quitosana destaca-se por ser um polímero hidrofílico, biocompatível, biodegradável e de baixa toxicidade (SINHA et al., 2004; AGNIHOTRI et al., 2004).

A quitosana é um polissacarídeo constituído de copolímeros de glicosamina e N-acetilglicosamina e pode ser obtido por deacetilação da quitina de cascas de crustáceos. Ocorre naturalmente em alguns microrganismos. Devido à presença de amino grupos primários na sua estrutura (**Figura 05**), a quitosana apresenta propriedades interessantes para utilização na área farmacêutica. Comparada a muitos outros polímeros naturais, a quitosana tem a vantagem de possuir carga positiva, o que confere à mesma propriedade de mucoadesividade (AGNIHOTRI et al., 2004).

A quitosana disponível comercialmente possui massa molecular média entre 3800 e 20000 Daltons e grau de deacetilação de 66 a 95% (AGNIHOTRI et al., 2004). Por tratar-se de um polímero catiônico, em condições de pH neutro e alcalino, apresenta grupamentos amino livres sendo, desta forma, insolúvel em água. Em pH ácido, os grupamentos amino podem ser protonados, tornando o polissacarídeo solúvel. Usualmente soluções aquosas de ácido acético entre 1 a 3% são utilizadas para solubilizar a quitosana. Os sais de quitosana são solúveis em água e esta

solubilidade depende do grau de deacetilação e do pH (ILLUM, 1998). O polímero é biocompatível visto que não causa reações alérgicas ou problemas de rejeição degradando-se lentamente a amino açúcares, que são completamente absorvidos pelo organismo. Possui propriedades antimicrobiana e absorvedora de metais pesados, como mercúrio, cádmio, chumbo e outros, além de possuir boa adesividade e apresentar atividade de imunoestimulação (AGNIHOTRI et al., 2004). Devido às propriedades mencionadas, a quitosana tem sido extensivamente utilizada no desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos.

Na área farmacêutica, a quitosana tem sido usada como um diluente para compressão direta (NAGAI et al., 1984), como um veículo para liberação sustentada de fármacos (HOU et al., 1985; KAWASHIMA et al., 1985; INOUYE et al., 1988) e também para aumentar o grau de dissolução e a biodisponibilidade de fármacos insolúveis em água (NAGAI et al., 1984).

No contexto de liberação de fármacos a quitosana vêm sendo utilizada como um excipiente para modificar a liberação de fármacos em formulações de administração oral (IMAI et al., 1991; KRISTL et al., 1993), nasal (ASPDEN et al., 1996), transdérmica (THACHARODI; PANDURANGA RAO, 1995) e tópica (PERUGINI et al., 2000) e na obtenção de nanopartículas para veiculação de proteínas, vacinas (CALVIO et al., 1996) e DNA (CUI; MUMPER, 2001). Ainda como sistema de liberação de fármacos, as microesferas de quitosana, têm sido utilizadas com sucesso para fármacos como por exemplo, fosfato sódico de prednisolona (BERTHOLD et al., 1996), indometacina (ORIENT et al., 1996), oxitetraciclina (MI et al., 1997), progesterona (JAMEELA et al., 1998), amoxicilina e metronidazol (SHAH et al., 1999), ácido glicólico (PERUGINI et al., 2000), tetraciclina (HEJAZI; AMIJI, 2002) e doxorubicina (JANES et al., 2001).

No desenvolvimento de micro/nanopartículas, a quitosana apresenta muitas vantagens, dentre elas podemos citar: a habilidade de modificar a liberação de substâncias ativas; a possibilidade de utilização de técnicas de obtenção que não envolvam solventes orgânicos e a propriedade de mucoadesividade, que aumenta o tempo de permanência no sítio de absorção.

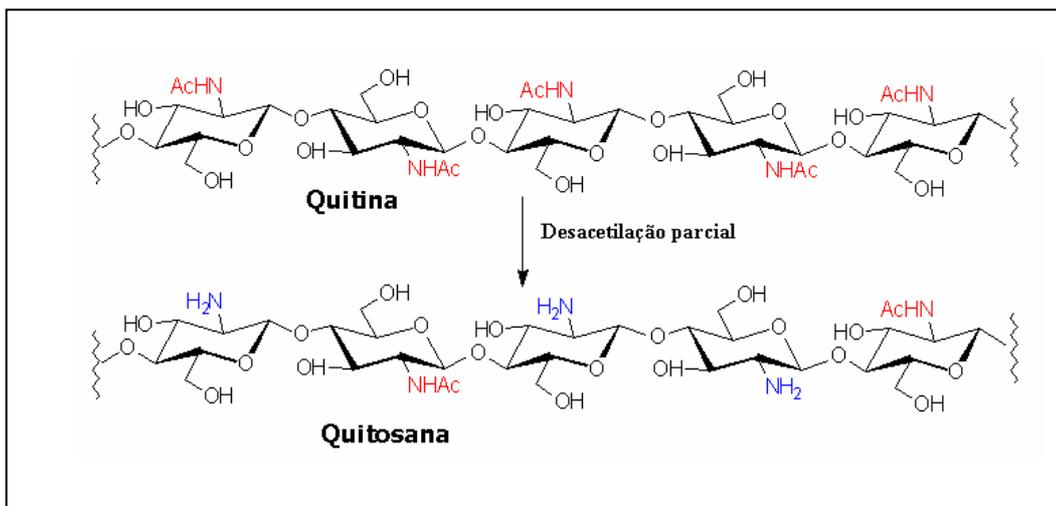


Figura 05- Formação de quitosana a partir da desacetilação parcial da quitina.

A indústria cosmética também têm explorado o uso de quitosana (LANG; CLAUSEN, 1989; NAIDOO, 1992; ILLUM, 1998).

Assim, as micropartículas de quitosana parecem constituir sistemas promissores para veiculação de ativos na pele.

### 1.2.2.2 Estratégias para a encapsulação de substâncias ativas

**A** microencapsulação é o processo de envolver substâncias ativas ou outros compostos em um filme polimérico. Na maioria das aplicações científicas as partículas produzidas apresentam diâmetro médio que pode variar de 1 a 500  $\mu\text{m}$  (MAGILL, 1990).

O que torna o processo de microencapsulação único é o tamanho reduzido das partículas e a sua versatilidade e adaptação a uma grande variedade de formas farmacêuticas. Na escolha do método de microencapsulação é importante conhecer as características físico-químicas e químicas do fármaco e do polímero. Quanto ao fármaco, devemos conhecer a polaridade, a solubilidade e a estabilidade (luz, oxigênio, calor) e, com relação aos polímeros, devemos conhecer a polaridade, a solubilidade, a taxa de degradação, a estabilidade e o ponto de fusão. Essas características auxiliam na escolha do método de encapsulação.

Os processos de obtenção de sistemas microparticulados envolvem métodos químicos e físicos. Os métodos químicos mais utilizados compreendem: a coacervação simples, a coacervação complexa, a emulsão e evaporação do solvente, a emulsão e difusão do solvente e a polimerização interfacial.

Dentre os processos mecânicos podemos citar: o spray drying, o revestimento em leito fluidizado, a deposição eletrostática, entre outros (THIES, 1996; KAS, 1997).

Muitos métodos de preparação de partículas são descritos na literatura, mas, o método apropriado é determinado pela solubilidade do polímero e do fármaco e pelo tamanho da partícula desejada.

### **1.2.2.3 Micropartículas de quitosana**

**D**iferentes métodos têm sido usados para o preparo de micro/nanopartículas de quitosana. A seleção do método depende de vários fatores, tais como tamanho de partícula desejado; tipo da molécula da substância ativa, bem como sua estabilidade térmica e química; reprodutibilidade do perfil cinético de liberação; estabilidade do produto final e toxicidade residual associada com o produto

final (AGNIHOTRI et al., 2004). Passaremos a descrever alguns dos métodos mais utilizados.

#### **1.2.2.3.1 Emulsão “cross-linking”**

**E**ste método utiliza o reativo grupo funcional amina da quitosana para fazer um cross-linking (reação cruzada) com grupos aldeído dos agentes utilizados para esse fim. Neste método, uma emulsão água em óleo (A/O) é preparada por emulsificação da solução aquosa de quitosana na fase oleosa, utilizando como estabilizante, um tensoativo adequado. A emulsão estável reage com um agente apropriado, tal como o glutaraldeído para enrijecimento das partículas. As microesferas são filtradas e lavadas repetidamente com n-hexano, seguido por álcool e então secas. Nishioka et al (1990) produziram microesferas de quitosana (agente de “cross-linking”: glutaraldeído) contendo cisplatina. Vários outros fármacos foram encapsulados em microesferas de quitosana, preparadas por este método, entre eles: diclofenaco sódico (KUMBAR et al., 2002), teofilina (KAWASHIMA et al., 1985), 5-fluoracil (DENKBAS et al., 1998), entre outros.

#### **1.2.2.3.2 Coacervação simples**

**N**a encapsulação por coacervação simples, a quitosana é solubilizada em água, por acidificação do meio. Mediante alteração da solubilidade da quitosana, por alteração do pH ou adição de determinados ânions, como sulfato, fosfato e polifosfato (BERTHOLD et al., 1996), ocorre a formação e a precipitação das partículas. A separação das mesmas é realizada por filtração/centrifugação seguida por sucessivas lavagens com água. Berthold et al

(1996), produziram micropartículas de prednisolona, utilizando esse método. A interleucina-2 (OZBAS-TURAN et al., 2002) constitui outro fármaco encapsulado em micropartículas de quitosana utilizando a técnica de coacervação simples.

#### **1.2.2.3.3 Coacervação complexa**

**A** coacervação complexa resulta da neutralização mútua de dois polímeros carregados com cargas opostas (FINCH, 1990; FAIRHURST; MITCHNICK, 1995). A quitosana sendo um polímero catiônico pode interagir com uma série de polímeros aniônicos sintéticos ou naturais (Ex: goma arábica), para formar coacervatos para microencapsulação. Foram obtidas por essa técnica nanopartículas de quitosana contendo DNA e doxorubicina (MITRA et al., 2001).

#### **1.2.2.3.4 Spray-drying**

**E**ste método é baseado na secagem de partículas atomizadas em um leito de ar quente. Neste processo, primeiramente a quitosana é solubilizada em meio aquoso contendo ácido acético. O fármaco é solubilizado ou disperso nesta solução e então um agente de "crosslink" é adicionado. Em seguida esta solução ou dispersão é atomizada em um leito de ar quente. A atomização leva à formação de pequenas gotas que, com a evaporação instantânea do solvente, originam as partículas. Através desse método foram obtidas micropartículas de quitosana contendo cimetidina, famotidina e nizatidina (HE et al., 1999).

### 1.2.2.3.5 Emulsão/Evaporação do solvente

O processo de evaporação do solvente consiste na solidificação da fase interna de uma emulsão, dando origem as micropartículas. A substância ativa pode ser dissolvida ou suspensa na dispersão polimérica (material de parede ou de revestimento) em solvente orgânico volátil. Esta fase é então emulsionada num meio dispersante aquoso, que contém um tensoativo, responsável pela dispersão das microcápsulas, evitando a sua aglomeração. O solvente é evaporado à baixa temperatura e pressão reduzida. A solubilidade do polímero diminui com a evaporação do solvente, formando as microcápsulas, que são separadas por filtração ou por centrifugação (OLIVEIRA et al., 1992). Microesferas de quitosana contendo cetoprofeno foram preparadas pelo método de emulsão/evaporação do solvente (GENTA et al., 1997).

### 1.3 Ativos e sistemas de liberação utilizados na terapia de rejuvenescimento

Os ativos para uso tópico que estão sendo empregados atualmente na prevenção e no tratamento do envelhecimento cutâneo, estão distribuídos nos seguintes grupos: hidratantes; anti-radicais livres (anti-oxidantes); citoestimulantes (agem estimulando a proliferação de fibroblastos ou aumentando sua atividade, resultando numa redensificação da pele); substâncias que apresentam efeito tensor; moduladores da contração facial; neurocosméticos e fotoprotetores.

Dentre as substâncias com ação anti-radicais livres, podemos citar as vitaminas A, C e E, bioflavonóides extraídos do *Ginkgo biloba* e da casca da maçã e os silícios orgânicos. Como redensificadores os penta e hexapeptídeos têm sido normalmente empregados. Um dos grupos de maior destaque é o das substâncias que apresentam

efeito tensor. Dentre elas podemos citar as proteínas extraídas do trigo e, principalmente, o DMAE.

### 1.3.1 Dimetilaminoetanol (DMAE)

O envelhecimento cutâneo é um fenômeno fisiológico evolutivo e inevitável. Constitui num reflexo da idade biológica do indivíduo e, nem sempre, corresponde à idade cronológica.

O envelhecimento celular é acelerado pela influência do meio ambiente. A exposição à radiações solares UVA e UVB é o principal fator externo que contribui para o envelhecimento precoce. O envelhecimento provocado pela exposição ao sol é chamado de fotoenvelhecimento. Os raios solares agem tanto em nível intracelular quanto extracelular.

As principais alterações que ocorrem na estrutura da pele com o envelhecimento são a diminuição da espessura da epiderme devido ao aplainamento dos cones interpilares e a diminuição do número e do volume das células. As fibras colágenas e elásticas, fundamentais na manutenção do turgor e da estrutura da camada dérmica, sofrem modificações estruturais que se refletem na superfície da pele, com aparecimento de rugas. Nas regiões freqüentemente expostas à radiação solar, a superfície da pele torna-se irregular com o aparecimento de uma coloração amarelada e a evidênciação de pequenos vasos (telangectasia), caracterizando a chamada elastose solar.

Atualmente, existem várias técnicas eficazes para o tratamento e a prevenção do envelhecimento cutâneo, dentre elas podemos citar o tratamento clínico com substâncias anti-oxidantes, a utilização de ácidos e de substâncias precursoras de colágeno, entre outras; a implantação de substâncias para preenchimento na correção

de rugas e de sulcos (ex. colágeno, ácido hialurônico) e a injeção local de toxina botulínica. Dentre as substâncias tópicas mais utilizadas recentemente destaca-se o dimetilaminoetanol (DMAE).

O DMAE é uma substância naturalmente encontrada em peixes marinhos, tais como a sardinha e o salmão (PERRICONE, 2001). Trata-se de um análogo da colina e precursor da acetilcolina (Ach). Sua estrutura química está apresentada na **Figura 06**.

Desde 1970, vários autores têm estudado o efeito do DMAE na melhora da cognição e da memória em pacientes saudáveis e em pacientes com síndromes como o autismo e o mal de Alzheimer (CAI, 1985; GEORGE et al., 1981; LAMBERT et al., 1978; FERRIS et al, 1977; RUGGINENTI, 1974). Atualmente, a terapia oral com o DMAE está incluída em protocolos clínicos para pacientes pediátricos com hiperatividade. Essa substância pode ser utilizada na forma de diversos sais, incluindo o acetamidobenzoato, o bitartarato, o hemisuccinato e o aceglutamato (MARTINDALE, 1999). Entretanto, as preparações comerciais disponíveis para uso interno e para uso tópico expressam sua dosagem ou concentração em relação ao DMAE base livre.

O advento do uso do DMAE em cosmetologia ocorreu quando alguns médicos, que prescreviam essa substância para o tratamento das patologias já citadas, observaram um efeito não esperado nos pacientes: o enrijecimento da musculatura do pescoço. A partir dessa observação, o DMAE passou a ser utilizado também na forma tópica como ativo antienvelhecimento, estando inscrito no “Internacional Cosmetic Ingredient Dictionary and Handbook” (1977), com o nome de Dimethyl MEA.

O DMAE têm sido utilizado como um ativo cosmético em preparações tópicas por demonstrar propriedades de elevação do seu tônus com efeito imediato e a longo prazo, sendo considerado um ativo eficaz no tratamento do envelhecimento cutâneo (WALLO et al., 2002).

Perricone (2001) demonstrou em seu trabalho que o DMAE apresenta propriedade antioxidante, protegendo a pele dos danos causados pelos radicais livres, além de estabilizar a membrana plasmática, conferindo uma maior resistência ao stress.

Estudos recentes demonstraram que o DMAE promove o levantamento natural das pálpebras (COLE; GISOLDI, 2002; WALLO et al., 2002), aumenta o tônus da área ao redor dos lábios, melhora as linhas de expressão na testa e apresenta um efeito tensor na região das bochechas (COLE; GISOLDI, 2002). Segundo UHODA et al (2002), o DMAE aumenta o tônus da pele resultando em um rosto mais firme.

O uso tópico de DMAE demonstrou ser seguro em aplicações faciais a longo prazo (GROSSMAN et al., 2002). O produto apresentou boa tolerância, com nenhuma reação de irritação significativa ou efeitos adversos durante todo o período de teste (COLE; GISOLDI, 2002; GROSSMAN et al., 2002).

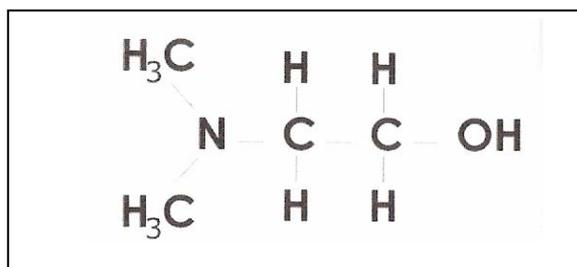


Figura 06- Estrutura química do DMAE

### 1.3.1.1 Mecanismos de ação do DMAE (uso tópico)

O provável mecanismo de ação do DMAE é o aumento da síntese da acetilcolina (neurotransmissor responsável pela contração muscular) que leva a potencialização de seu efeito, pois os níveis de acetilcolinesterase

(enzima que degrada a acetilcolina) continuam em níveis fisiológicos. A hipertonicidade muscular leva ao efeito “lifting” não cirúrgico e residual (PERRICONE, 2001). O mecanismo de ação do DMAE está representado de forma esquemática na **Figura 07**.

Haubrich et al (1981) em estudos realizados em ratos, demonstraram que o DMAE inibe o metabolismo de colina nos tecidos periféricos, aumentando os níveis de colina disponíveis. Desta forma, sugere-se que o DMAE possa agir também diretamente sobre a síntese de colágeno na derme, que possui também receptores colinérgicos, não restringindo sua ação exclusivamente sobre a placa motora.

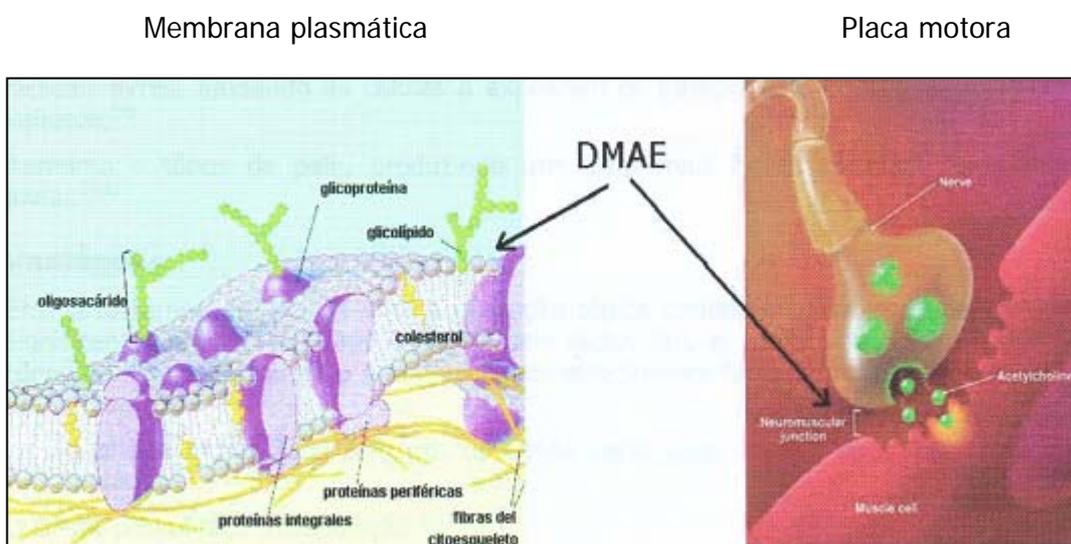


Figura 07- Representação esquemática do possível mecanismo de ação do DMAE

## 2. OBJETIVOS

## **2.1 Objetivo geral**

Face ao exposto, o presente trabalho tem por objetivo obter e caracterizar micropartículas de quitosana contendo DMAE para o tratamento antienvhecimento.

## **2.2 Objetivos específicos**

- Encapsular o DMAE em micropartículas de quitosana pelo método de coacervação simples e determinar o rendimento do processo.
  
- Caracterizar físico-quimicamente as partículas, efetuando-se a análise morfológica por MEV e a determinação do tamanho e da distribuição do tamanho das partículas pela técnica de espalhamento de luz.
  
- Desenvolver e padronizar a metodologia analítica para a quantificação do DMAE.
  
- Determinar a eficiência de encapsulação.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 Materiais

#### 3.1.1 Reagentes e solventes

- Acetonitrila (grau cromatográfico, Merck; lote 023353.
- Ácido acético glacial P.A., teor 99,7%, Merck; lote 110077.
- Ácido clorídrico P.A., teor 36,5-38,0%, Synth.
- Ácido sulfúrico concentrado P.A., Synth.
- Álcool metílico (grau cromatográfico), J.T.Baker.
- Fosfato de sódio bibásico anidro P.A., teor min. 99,0%, Merck; lote 1065860500;
- Fosfato de sódio monobásico monohidratado P.A., teor 98,6-102,0%, Synth; lote 55952.
- Hidróxido de sódio P.A., teor min. 97,00%, Synth; lote 61041.
- Permanganato de potássio P.A., teor min. 99,0%, Synth; lote 85957.
- Polissorbato 80 (Tween 80), grau farmacêutico, Synth; lote 50925.
- Resina aniônica DOWEX Basic Anion 1x2-400, Sigma Aldrich; lote 08513MB.
- Resina aniônica DOWEX Basic Anion 1x2-400, Sigma Aldrich; lote 07513DC.
- Resina catiônica DOWEX 50WX2-400, Sigma Aldrich; lotes #06923BD e #14809KA.
- Sulfato de sódio P.A., teor min. 99,0%, Synth.

A água utilizada nos experimentos foi obtida em um sistema de filtração Milli Q da Millipore.

#### 3.1.2 Fármaco e polímero

- Dimetilaminoetanol L-bitartarato monohidratado (DMAE bitartarato), Viafarma; lote H080701 E.

- Dimetilaminoetanol base livre (DMAE base livre), DEG; lote 9954-998R4
- Quitosana pó (Hydagen HCMF), Cognis Brasil Ltda; massa molecular 50000 – 1000000, grau de deacetilação de no mínimo 80%; lote 1317880.

### **3.1.3 Equipamentos e acessórios**

- Agitador de tubos IKA, modelo MS1
- Agitador mecânico Heidolph, modelo RZR1, Alemanha.
- Analizador de imagens por dispersão de luz, modelo Autosizer 4700, da marca Malvern, EUA.
- Balança analítica, capacidade 110 g, precisão  $\pm 0,0001$ , Acculab.
- Banho de ultra-som, modelo T-14 (THORTON)
- Centrífuga Hettich Zentrifungen, modelo Rodofix 32.
- Coluna cromatográfica LichroCART RP-18 (5 $\mu$ m), 125mm x 4mm , Merck.
- Cromatógrafo a líquido marca SHIMADZU modelo SCL 10 A; detector ultravioleta com comprimento de onda variável, modelo SPD 10 AV, Integrador C-R 8 A, bombas LC 10 AT.
- Espectrofotômetro UV-visível modelo NIR Hitachi.
- Liofilizador – Virts.
- Microscópio eletrônico de varredura marca Leica, modelo Stereoscan 440, Alemanha.
- Microscópio óptico marca Zeiss, modelo Axioplan 2.
- Potenciostato/ galvanostato Altolab, modelo 30.
- Pré coluna RP-18 (5 $\mu$ m), 4mm X 4mm, Merck.
- Sonicador de ponta de titânio.

## **3.2 Métodos**

### **3.2.1 Desenvolvimento do método de obtenção das micropartículas de quitosana**

As partículas foram obtidas pelo método de coacervação simples.

As condições iniciais de preparo das micropartículas de quitosana contendo DMAE foram baseadas no método proposto por Berthold et al (1996).

Por esta técnica, partículas são obtidas mediante a solubilização do polímero seguida da adição de um agente capaz de precipitar o mesmo originando derivados insolúveis, resultando na formação das partículas.

O polímero utilizado foi a quitosana, que foi solubilizada em solução de pH ácido e adicionada de uma solução de sulfato de sódio, como agente precipitante.

Algumas variáveis podem afetar esse processo, tais como o tipo e a quantidade do agente precipitante, a massa molecular e a proporção da quitosana, além da velocidade de adição do agente precipitante.

O tipo e a porcentagem de quitosana empregados, bem como a escolha do agente precipitante e a velocidade do fluxo de adição do mesmo, foram baseados nos estudos preliminares de Berthold et al (1995).

Alguns destes parâmetros foram testados para adequação das condições para o preparo das partículas com as características desejadas, o tipo e a velocidade de agitação e a quantidade do agente precipitante (sulfato de sódio) a ser utilizado.

Inicialmente alguns ensaios foram realizados com o intuito de se determinar o ponto de precipitação do polímero para que se estabelecesse a quantidade de sulfato de sódio a ser utilizada.

### 3.2.1.1 Curva de precipitação do polímero pelo sulfato de sódio

Para determinar a quantidade de sulfato de sódio necessária utilizou-se a técnica da turbidimetria. Em 50 mL de uma solução de quitosana 0,25% (m/v) foram adicionados volumes crescentes de uma solução de sulfato de sódio 20% (m/v), conforme protocolo apresentado na Tabela 01. Em seguida efetuou-se a leitura das amostras em 500 nm. Os dados obtidos foram relacionados em um gráfico da porcentagem de sulfato de sódio e da absorvância lida (nm).

Tabela 01- Protocolo experimental para a obtenção da curva de precipitação do polímero pelo sulfato de sódio.

<b>volume adicionado de solução de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 20,0% (mL)</b>	<b>% de sulfato de sódio na solução de quitosana (m/v)</b>
0	0
0,25	0,1
0,5	0,2
0,75	0,3
0,875	0,35
1,0	0,4
1,25	0,5
1,5	0,6
2,0	0,8
5,0	2,0
8,0	3,2

\* Para 50 mL de solução de quitosana 0,25% (m/v)

### 3.2.1.2 Preparo das micropartículas inertes

Inicialmente foram obtidas partículas inertes de quitosana. Foi dissolvido 0,125g de

quitosana em 50 mL de uma solução aquosa contendo 2% de ácido acético (v/v) e 1% de polissorbato 80 (m/v). 2 mL de uma solução de sulfato de sódio 20% (m/v), foi gotejada sobre a solução de quitosana (fluxo 5mL/min) sob agitação mecânica à velocidade constante de 400 rpm e banho de ultra-som. Após a adição do sulfato de sódio, a agitação e banho de ultra-som foram mantidos por 1 hora.

A separação das micropartículas foi realizada por centrifugação a 3000 rpm por 30 minutos. Após a separação, as partículas obtidas foram lavadas com água para retirada do tensoativo e centrifugadas novamente, por 10 minutos. Este procedimento foi repetido duas vezes. Em seguida a amostra foi congelada (**amostra A**)

O preparo das micropartículas foi repetido, variando-se a velocidade e o tipo de agitação. Foram preparadas mais duas soluções de quitosana, conforme descrito acima. Na primeira solução, adicionamos 2mL de solução de sulfato de sódio 20% (m/v), gota a gota, à um fluxo de 5mL/min, estando a solução submetida ao sonicador de ponta de titânio. Esta amostra foi denominada de **amostra B**. Na outra solução, adicionamos o mesmo volume da solução de sulfato de sódio, sendo utilizado o mesmo fluxo de adição, porém durante a adição a amostra foi mantida sob agitação mecânica à velocidade constante de 600 rpm e banho de ultra-som. Após a adição do sulfato de sódio, a agitação e banho de ultra-som foram mantidos durante 10 minutos e em seguida a amostra foi submetida ao sonicador de ponta de titânio por 4 minutos. Este último procedimento deu origem à **amostra C**. Nesses dois últimos processos, as amostras foram centrifugadas por 15 minutos, à velocidade de 3000 rpm. As partículas foram lavadas com água destilada e centrifugadas novamente por 15 minutos. Este procedimento foi repetido por duas vezes.

A influência das variáveis do processo sobre as características das partículas foi avaliada mediante a caracterização morfológica das mesmas.

Tendo sido padronizado o preparo das micropartículas inertes, o mesmo protocolo foi utilizado para a obtenção das micropartículas contendo DMAE.

### **3.2.1.3 Preparo das micropartículas contendo DMAE (como bitartarato)**

Foram preparados 100 mL de uma solução aquosa de quitosana 0,25% (m/v) em ácido acético 2% (v/v), contendo 1% (m/v) de polissorbato 80 e 0,025% de DMAE (como bitartarato). Foram adicionados sobre a solução de quitosana, 4 mL de solução de sulfato de sódio 20% (m/v), gota a gota, com um fluxo de 3 mL/min, sob agitação mecânica à velocidade constante de 400 rpm e banho de ultra-som. Após a adição de sulfato de sódio, foram mantidos a agitação e banho de ultra-som, durante 1 hora. A separação das micropartículas foi realizada por centrifugação a 3000 rpm por 30 minutos. As partículas separadas foram lavadas com água destilada, sendo centrifugadas novamente por 10 minutos. Este procedimento foi repetido duas vezes. Em seguida a amostra foi liofilizada.

### **3.2.1.4 Preparo das micropartículas contendo DMAE base livre**

Para o preparo da micropartículas de quitosana contendo DMAE base livre foi necessário primeiramente proceder a neutralização do DMAE base livre, que foi efetuada utilizando-se ácido clorídrico 6 N.

Foram preparados 100 mL de uma solução aquosa de quitosana 0,25% (m/v) em ácido acético 2% (v/v), contendo 1% (m/v) de polissorbato 80 e 0,025% de DMAE base livre, previamente neutralizado, sendo aplicado o devido fator de correção. Foram adicionados sobre a solução de quitosana, 4 mL de solução de sulfato de sódio 20% (m/v), gota a gota, com um fluxo de 3 mL/min, sob agitação mecânica à velocidade

constante de 400 rpm e banho de ultra-som. Após a adição de sulfato de sódio, manteve-se a agitação a 400 rpm e banho de ultra-som, durante 1 hora. Centrifugou-se a amostra, por 30 minutos, sob rotação de 3000 rpm. As partículas separadas foram lavadas com água destilada, centrifugando-se novamente por 10 minutos. Este procedimento foi repetido duas vezes. Em seguida a amostra foi liofilizada.

O preparo das micropartículas de quitosana contendo DMAE está representado de forma esquemática na **Figura 08**.

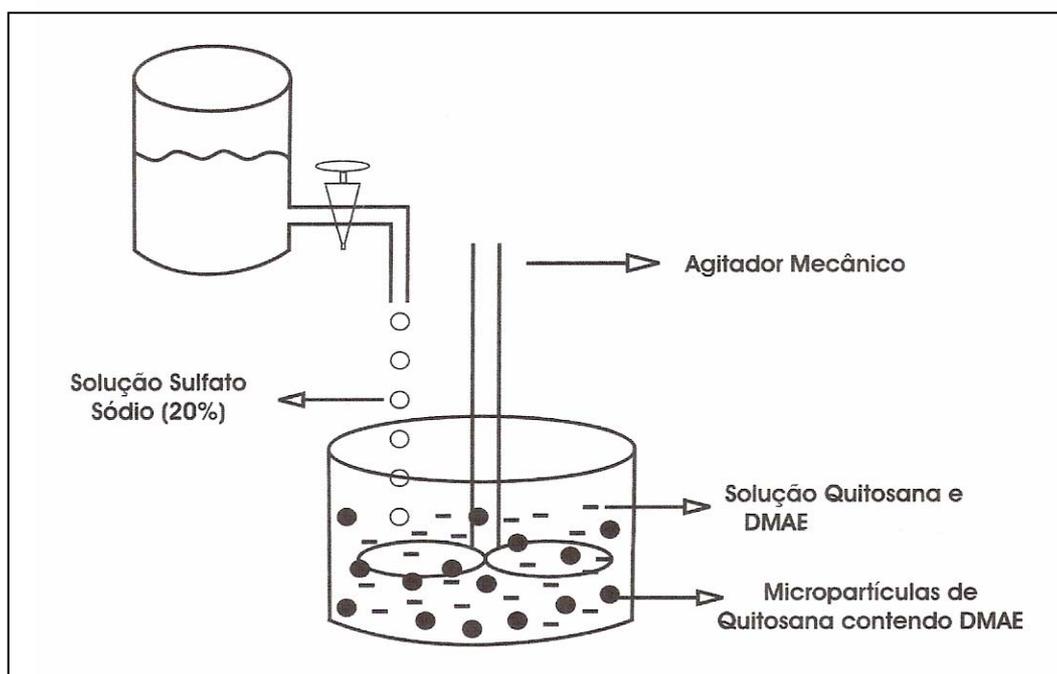


Figura 08- Esquema do processo de obtenção das micropartículas de quitosana contendo DMAE pelo método de coacervação simples.

### 3.2.2 Caracterização das micropartículas

#### 3.2.2.1 Microscopia óptica

A formação das partículas contendo DMAE foi acompanhada pela observação das amostras em microscópio óptico da marca Zeiss, modelo Axioplan 2, acoplado a

um analisador de imagens Axiovision 3.1.

As partículas foram colocadas sobre uma lâmina de vidro e examinadas, sendo utilizado um aumento de 360 vezes.

### **3.2.2.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

Os estudos da morfologia das partículas inertes e das partículas contendo DMAE base livre foram efetuados em microscópio eletrônico de varredura da marca Leica, modelo Stereoscan 440. As partículas foram fixadas sobre uma lâmina de vidro e recobertas com ouro, utilizando-se um Spulter Balzers SCD Coater antes da visualização. O aumento utilizado para os estudos das partículas inertes foi de 25000 X, a 20 Kv e para as partículas contendo DMAE base livre foi de 100000 X, a 20 Kv.

### **3.2.2.3 Análise da distribuição do tamanho de partículas por espalhamento de luz**

A análise do tamanho das partículas e da distribuição de tamanho foi efetuada por um equipamento de espalhamento de luz a laser (Zetasizer, Malvern, EUA). As amostras, suspensão de partículas, foram analisadas em uma cela de quartzo de 1 cm de caminho óptico com controle da temperatura que foi mantida em 28°C. As amostras foram preparadas em triplicata (n=3), e cada amostra foi analisada trinta vezes. A análise do tamanho das partículas foi efetuada pelo equipamento de 1 a 5000nm para obtenção do gráfico da distribuição de tamanho e cálculo do diâmetro médio das partículas.

### **3.2.3 Desenvolvimento da metodologia analítica para a quantificação do DMAE**

Foi realizada extensa revisão da literatura e verificou-se que não existem até o momento metodologias descritas para a quantificação do DMAE. Considerando a necessidade do doseamento do ativo nos estudos para a avaliação da eficiência de encapsulação e do comportamento de liberação *in vitro*, foram realizados vários ensaios laboratoriais visando o desenvolvimento de uma metodologia analítica adequada para a continuidade dos estudos.

#### **3.2.3.1 Estudo eletroquímico**

A análise para determinação do potencial eletroquímico do DMAE foi efetuada utilizando um Potenciostato / Galvanostato AUTOLAB GSTAT, modelo 30, partindo de um potencial negativo, -1,0 V, até um potencial positivo, 1,0 V. Utilizamos  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  de cloreto de potássio (KCl) como eletrólito suporte, eletrodo de carbono vítreo como eletrodo de trabalho, Ag/AgCl, como eletrodo de referência e um eletrodo auxiliar.

O estudo eletroquímico para o composto foi realizado em meio aquoso. Visando verificar se o DMAE tratava-se de uma espécie eletroativa, realizou-se uma varredura dentro do potencial do solvente.

#### **3.2.3.2 Oxidação do DMAE através da reação com permanganato de potássio e separação das amostras**

##### **3.2.3.2.1 Determinação das condições de reação**

A reação de oxidação do DMAE foi realizada utilizando como agente oxidante o permanganato de potássio na concentração correspondente à  $0,25 \text{ mol.L}^{-1}$ , em meio

ácido. O processo envolve uma reação de óxido-redução entre o DMAE e o permanganato. O permanganato em meio ácido sofre uma redução, conforme ilustrado na **Figura 09**, oxidando o DMAE. As amostras foram preparadas em tampão fosfato pH 7,4. O tempo de reação foi estipulado em 30 minutos, em temperatura ambiente controlada (25°C), sob agitação magnética.



Figura 09- Reação de redução do permanganato em meio ácido

### 3.2.3.2.2 Preparo das colunas de troca iônica

Para a separação do DMAE foram preparadas duas colunas de troca iônica, uma catiônica e outra aniônica, montadas em buretas de 25 mL, fixando-se um volume de 4 mL. A coluna catiônica foi trocada a cada duas amostras e, entre as amostras a coluna foi tratada com água destilada e solução de ácido clorídrico a 0,1 mol.L. A remoção do ácido clorídrico foi realizada mediante lavagem com água destilada (2 vezes). O tratamento da coluna aniônica foi realizado somente através de lavagem com água destilada, após a passagem de cada amostra de estudo.

### 3.2.3.2.3 Oxidação do DMAE base livre por reação com permanganato de potássio e separação das amostras

Para verificar a possibilidade de oxidação por esta via, foi induzida inicialmente a oxidação do DMAE base livre. Para tanto, foram preparadas duas amostras na concentração correspondente a  $1,0 \times 10^{-4}$  mol.L, uma em meio aquoso e outra em tampão fosfato pH 7,4. Uma alíquota de 10mL de cada solução, foi adicionada de 1 mL

de ácido sulfúrico concentrado e duas gotas da solução de permanganato de potássio a  $2,5 \times 10^{-4}$  mol.L<sup>-1</sup>, deixando reagir de acordo com as condições descritas anteriormente. A reação de oxidação do DMAE está apresentada na **Figura 10**. Em seguida as amostras foram separadas em coluna catiônica e submetidas a uma varredura na região do ultravioleta-visível (200- 700nm).

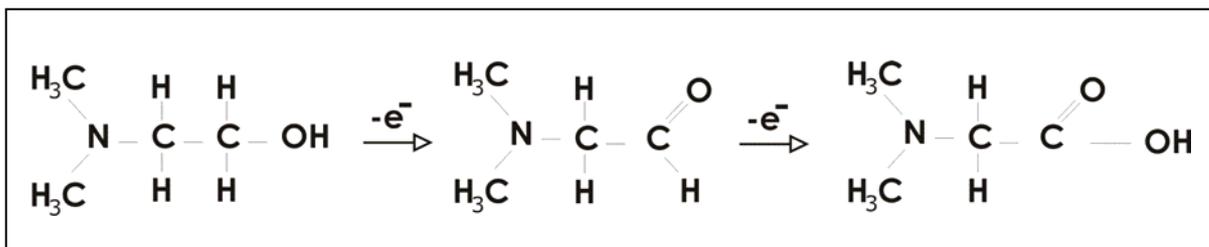


Figura 10- Reação de oxidação do DMAE

#### 3.2.3.2.4 Oxidação do DMAE (como bitartarato) por reação com permanganato de potássio e separação das amostras

10 mL de uma solução mãe de DMAE (como bitartarato) na concentração correspondente a  $1,0 \times 10^{-4}$  mol.L<sup>-1</sup> em tampão fosfato pH 7,4 foi preparada e diluída de modo a se obter soluções com concentrações correspondentes à  $6,0$ ,  $5,0$ ,  $2,5$  e  $1,0 \times 10^{-4}$  mol.L<sup>-1</sup>. Aliquotas de 10mL de cada amostra foram adicionadas de 1 mL de ácido sulfúrico concentrado e duas gotas de solução de permanganato de potássio a  $0,25$  mol.L<sup>-1</sup> (a quantidade empregada representa um excesso), deixando reagir conforme as condições já descritas. As amostras foram separadas utilizando coluna catiônica e aniônica. O procedimento de reação e separação está apresentado na **Figura 11**. As amostras obtidas após purificação foram analisadas no espectrofotômetro, na região do ultravioleta (220 nm).

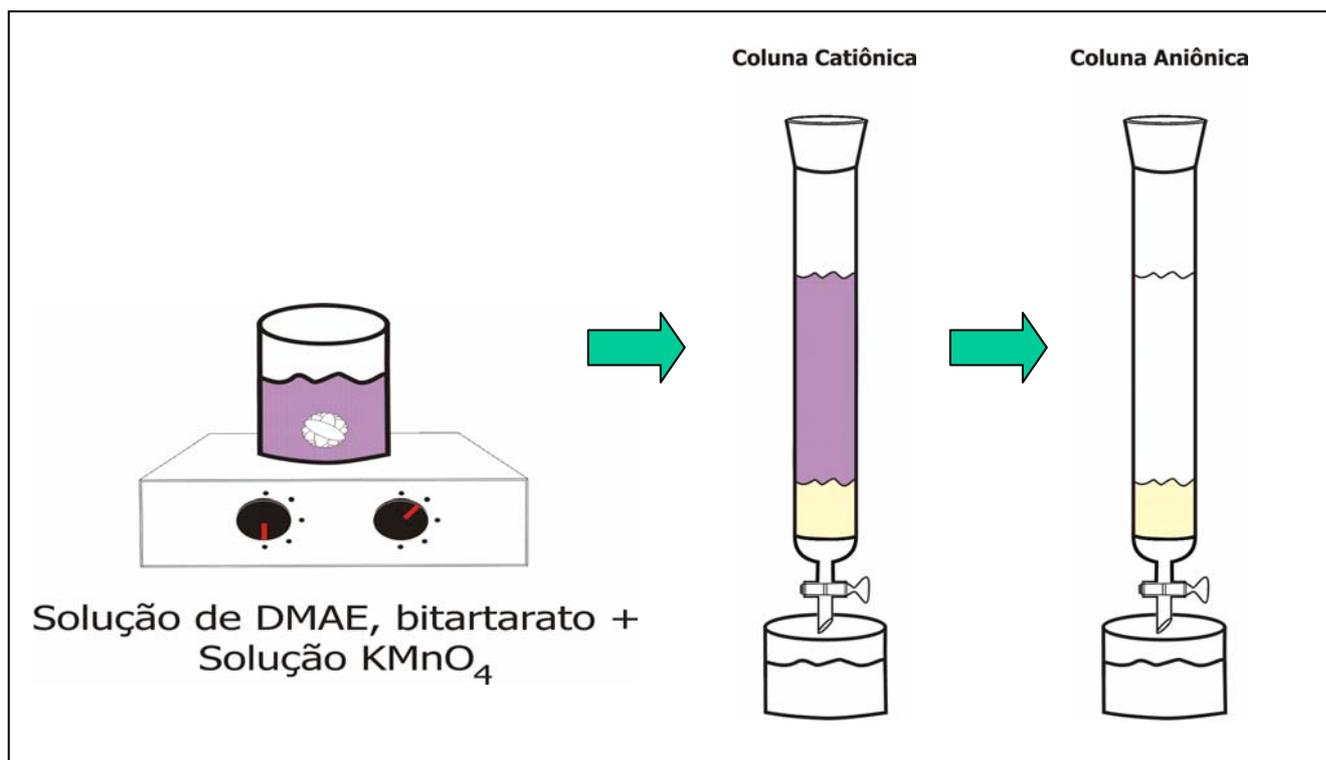


Figura 11- Representação esquemática do processo de oxidação do DMAE por reação com permanganato de potássio e separação da amostra

### 3.2.3.2.5 Análise do DMAE (como bitartarato) utilizando espectrofotometria na região do ultravioleta

As medidas de absorção foram efetuadas em um espectrofotômetro UV-visível-NIRHitachi modelo U-3501, utilizando cubeta de quartzo de 1,00 cm de caminho óptico, com leitura em 220 nm.

#### Curva analítica

Para a construção da curva analítica, foram utilizadas as soluções obtidas no processo de oxidação e separação do DMAE (como bitartarato), descrito

anteriormente. Estas soluções foram analisadas mediante leitura na região do UV em 220 nm e os resultados obtidos relacionados em um gráfico onde foram colocadas no eixo das abscissas as concentrações das soluções e no eixo das ordenadas os valores de absorvância.

### **3.2.3.3 Oxidação do DMAE base livre através da reação com cloro e separação das amostras**

#### **3.2.3.3.1 Determinação das condições de reação**

O método para a oxidação do DMAE envolve uma reação de transferência de elétron na qual o DMAE é oxidado. Como agente oxidante foi testado o cloro (Cl<sub>2</sub>). Inicialmente foi determinado o potencial de oxidação do DMAE, através da técnica de voltametria de pulso diferencial.

As medidas de voltametria de pulso diferencial (VPD) foram realizadas com uso de um potenciostato-galvanostato AUTOLAB PGSTAT, modelo 30, partindo de um potencial negativo, -1,0 V, até um potencial positivo, 1,5 V. A célula eletroquímica foi constituída de três eletrodos: o eletrodo de trabalho foi de carbono vítreo; eletrodo auxiliar de platina e como eletrodo de referência foi utilizado Ag/AgCl. Os complexos foram dissolvidos em solução fisiológica de Krebs modificada com a seguinte composição (em mmol.L<sup>-1</sup>): NaCl 130,0; KCl 4,7; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,18; MgSO<sub>4</sub> 1,2; CaCl<sub>2</sub> 1,6; NaHCO<sub>3</sub> 14,9; glicose 5,5 e EDTA 0,026 em pH = 7,4. Todas as medidas foram efetuadas em solução previamente desoxigenada com argônio.

As amostras foram preparadas em tampão fosfato pH 7,4. O tempo de reação com o cloro foi estipulado em 30 minutos. A reação foi realizada em temperatura ambiente controlada (25°C), sob agitação magnética. A obtenção do cloro (Cl<sub>2</sub>) foi

realizada mediante reação de permanganato de potássio com ácido clorídrico (HCl), sendo padronizado o uso de 1,5 g de permanganato e 30 mL de HCl 6 N. Para eliminar o excesso de cloro após reação, foi borbulhado argônio, por um tempo estipulado em 30 minutos, sob agitação magnética.

### **3.2.3.3.2 Preparo das colunas de troca iônica**

Para a separação do DMAE foram preparadas duas colunas de troca iônica, uma catiônica e outra aniônica. Foi utilizado somente um tipo de resina catiônica e dois tipos de resina aniônica, cujas fórmulas moleculares estão descritas abaixo:

Resina "A": C29H34CIN

Resina "B": C31H39CIN

Os primeiros ensaios foram efetuados utilizando-se resina catiônica e resina aniônica "A". As colunas foram montadas em buretas de 25 mL, com as respectivas resinas, fixando-se uma massa de 1,5 g. As colunas foram trocadas a cada amostra. Os ensaios posteriores foram efetuados com a resina aniônica "B". Nesta nova condição, foram efetuados vários ensaios, utilizando-se diferentes quantidades das resinas catiônica e aniônica.

### **3.2.3.3.3 Oxidação do DMAE base livre por reação com cloro**

100 mL de uma solução mãe de DMAE base livre na concentração correspondente a  $1,0 \times 10^{-3}$  mol.L em tampão fosfato pH 7,4 foi preparada e diluída de modo a se obter soluções em diversas concentrações, em uma faixa de  $1,0 \times 10^{-7}$  a  $7,0 \times 10^{-5}$  mol.L .

Alíquota de 10 mL de cada amostra, recebeu borbulhamento de cloro, obtido segundo procedimento descrito anteriormente, durante 5 minutos sob agitação, deixando reagir por mais 25 minutos, ainda sob agitação. Em seguida as amostras receberam borbulhamento de argônio, segundo procedimento já descrito e foram separadas mediante passagem das mesmas por coluna catiônica e aniônica.

#### **3.2.3.3.4 Separação das amostras**

Cada amostra obtida após oxidação foi passada primeiramente na coluna catiônica, sendo a amostra recolhida em um bequer e a coluna lavada com 5mL de água milliQ, recolhendo-se a água de lavagem no mesmo bequer. Em seguida a amostra foi passada na coluna aniônica, seguindo-se o mesmo procedimento descrito para a coluna catiônica. Cada amostra foi transferida para um balão volumétrica de 50 mL, completando-se o volume com água milliQ.

A amostra referente à concentração de  $1,0 \times 10^{-5}$  mol.L foi submetida a uma varredura na região do ultravioleta-visível (200–500 nm), para determinar o comprimento de onda de maior absorção. Para tanto, foram utilizados espectrofotômetro 800 XI da marca FEMTO e cubeta de quartzo de 1,00 cm de caminho óptico. Todas as amostras referentes às concentrações estudadas foram analisadas por CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência).

As **Figuras 12 e 13** mostram o aparato montado para a oxidação do DMAE através da reação com cloro e o processo de separação das amostras.



Figura 12- Aparato montado para a oxidação do DMAE através da reação com cloro

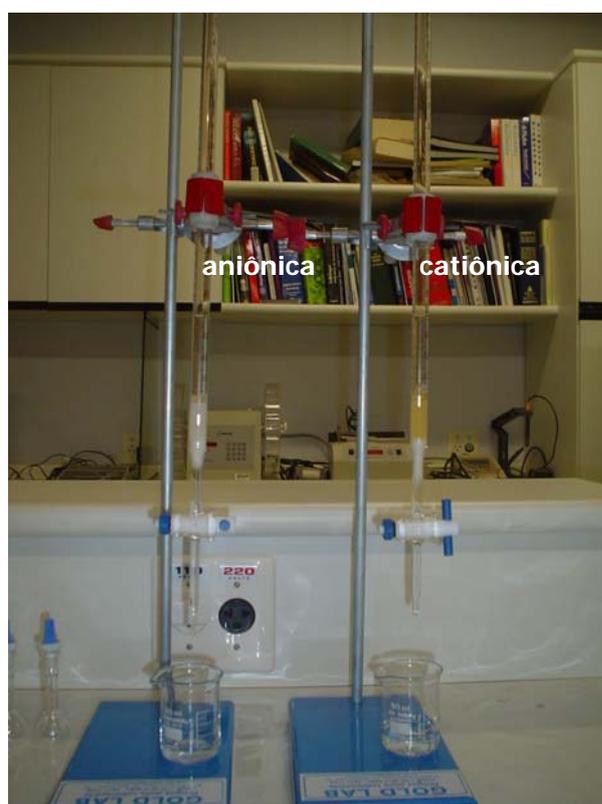


Figura 13- Sistema utilizado para separação do DMAE

### 3.2.3.4 Eletrólise à potencial controlado

A eletrólise à potencial controlado foi realizada com uso de um potentiostato-galvanostato AUTOLAB PGSTAT, modelo 30. A célula eletroquímica foi constituída de três eletrodos: o eletrodo de trabalho foi rede de platina; eletrodo auxiliar de platina e o Ag/AgCl foi utilizado como eletrodo de referência. Os complexos foram dissolvidos em solução fisiológica de Krebs modificada com a seguinte composição (em mmol.L ): NaCl 130,0; KCl 4,7; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,18; MgSO<sub>4</sub> 1,2; CaCl<sub>2</sub> 1,6; NaHCO<sub>3</sub> 14,9; glicose 5,5 e EDTA 0,026 em pH = 7,4. Todas as medidas foram efetuadas em solução previamente desoxigenada com argônio. O aparelho utilizado para a eletrólise está representado pela **Figura 14**.



Figura 14- Aparelho utilizado para eletrólise

A oxidação do DMAE base livre por eletrólise foi induzida inicialmente utilizando-se 10 mL de uma amostra concentrada de DMAE base livre (0,5 mol.L<sup>-1</sup>), previamente neutralizado com HCL 6 N, em meio tampão fosfato pH 7,4. Após eletrólise essa amostra foi diluída em tampão fosfato pH 7,4, na proporção de 1:9, sendo efetuada uma varredura na região do ultravioleta-visível (200–500 nm). Para esta análise foram

utilizados espectrofotômetro 800 XI da marca FEMTO e cubeta de quartzo de 1,00 cm de caminho óptico.

Posteriormente foi preparada uma solução estoque de DMAE base livre, previamente neutralizado, na concentração de  $1,0 \times 10^{-4}$  mol.L, em tampão fosfato pH 7,4. A partir desta solução foram preparadas amostras de 10 mL do composto nas concentrações correspondentes a  $1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 5,0$  e  $6,0 \times 10^{-4}$  mol.L em tampão fosfato pH 7,4. Essas amostras foram eletrolisadas, utilizando-se uma carga elétrica necessária para efetuar oxidação com envolvimento de 2 e<sup>-</sup>, calculada pela seguinte fórmula:

$$Q = n \text{ moles} \times F \times n \text{ e}^{-}, \text{ onde:}$$

$$Q = \text{carga elétrica}$$

$$F (\text{faraday}) = 96450C$$

Os processos de eletrólise das amostras foram controlados por gráficos, relacionando carga elétrica aplicada em coulomb (C) x tempo (s). A equação de eletrólise do DMAE base livre está apresentada na **Figura 15**.



Figura 15- Equação de eletrólise do DMAE base livre

### 3.2.4 Desenvolvimento e validação da metodologia analítica por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para quantificação do DMAE

#### 3.2.4.1 Estabelecimento dos parâmetros cromatográficos

Após estudos preliminares, foram determinadas as condições definitivas para a quantificação do DMAE por CLAE, que foram as seguintes:

- coluna cromatográfica LichroCART RP-18 (5  $\mu\text{m}$ ), 125mm X 4mm, Merck
- pré-coluna RP-18 (5  $\mu\text{m}$ ), 4mm X 4mm, Merck
- fase móvel composta por tampão fosfato pH 7,4: acetonitrila (99,5: 0,5 v/v)
- fluxo da fase móvel de 0,5 mL.min
- volume de injeção de 20  $\mu\text{L}$
- pressão de trabalho de 62 Kgf

#### **3.2.4.2 Análise cromatográfica do DMAE oxidado através de reação com o cloro**

No desenvolvimento desta metodologia, empregou-se a padronização externa, utilizando como padrão o DMAE base livre, previamente neutralizado e oxidado através de reação com o cloro. O comprimento de onda para detecção, determinado com base no espectro de absorção na região do UV foi 208 nm.

##### **Curva analítica**

Para a construção da curva analítica, foram utilizadas soluções de DMAE base livre na faixa de concentração de 2,0 a 4,0x10<sup>-5</sup> mol.L , obtidas após processo de oxidação e separação realizada com colunas catiônica e aniônica (montada com resina aniônica descrita anteriormente como resina "A"). Estas soluções foram analisadas por CLAE na região do UV à 208 nm e os resultados obtidos relacionados em um gráfico, onde foram colocadas, no eixo das abscissas as concentrações das soluções e no eixo das ordenadas as alturas dos picos obtidos.

### 3.2.4.3 Validação do método

Na validação da metodologia, empregou-se a padronização externa, utilizando como padrão o DMAE base livre oxidado previamente por eletrólise, conforme processo já descrito. O comprimento de onda utilizado para detecção, determinado com base no espectro de absorção na região do UV, foi 208 nm.

### 3.2.4.4 Soluções-padrão

Uma solução estoque do DMAE base livre, previamente neutralizado com HCl 6N, na concentração de  $1,0 \times 10^{-4}$  mol.L foi preparada em tampão fosfato pH 7,4. As demais soluções foram preparadas nas concentrações de 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0 e  $6,0 \times 10^{-4}$  mol.L, em tampão fosfato pH 7,4, através de diluições da solução estoque.

### 3.2.4.5 Calibração e linearidade

Através de diluições da solução estoque do DMAE base livre ( $1,0 \times 10^{-4}$  mol.L) foram preparadas soluções na faixa de concentração de  $1,5 - 3,5 \times 10^{-4}$  mol.L<sup>-1</sup>. 10 mL de cada amostra foi inicialmente eletrolisada, segundo procedimento já descrito, para então serem analisadas por CLAE.

O gráfico de calibração foi feito colocando-se no eixo das abscissas as concentrações das soluções de DMAE, previamente eletrolisadas e no eixo das ordenadas as alturas dos picos obtidos. A linearidade do método analítico foi avaliada de forma semelhante à descrita acima, expandindo-se a faixa de concentração das soluções do DMAE base livre ( $1,5 - 6,0 \times 10^{-4}$  mol.L<sup>-1</sup>). A proporcionalidade entre a

concentração e a resposta foi realizada mediante a obtenção de uma curva padrão, do cálculo do coeficiente de correlação (r) e da equação da reta.

#### 3.2.4.6. Precisão e exatidão

A precisão (CV%) e a exatidão (E%) do método analítico foram testadas por análises inter e intra-ensaios.

Para avaliar a precisão e exatidão inter e intra-ensaio foi feito um gráfico de calibração, no intervalo de concentração de  $1,5 \times 10^{-4}$  -  $3,5 \times 10^{-4}$  mol.L<sup>-1</sup>. Na precisão e exatidão intra-ensaio foram analisadas cinco amostras, no mesmo dia, nas concentrações de 1,5; 2,5 e  $3,5 \times 10^{-4}$  mol.L<sup>-1</sup>. A precisão e exatidão interensaios foram avaliadas em três dias consecutivos, nas mesmas concentrações das amostras descritas anteriormente. Este ensaio foi feito em duplicata. Todas as amostras envolvidas nos referidos ensaios foram primeiramente eletrolisadas, segundo procedimento já descrito, para em seguida serem analisadas por CLAE. Os cálculos para avaliar a precisão do método foram efetuados usando-se os gráficos de calibração e as dispersões em relação aos valores médios foram expressas como coeficiente de variação (CV):

$$CV = \frac{S}{\bar{X}} \times 100$$

onde: S = estimativa do desvio padrão

$\bar{X}$  = média dos valores obtidos

Para os cálculos da exatidão (E) foram utilizadas as médias das concentrações obtidas nos estudos intra e interensaios e a concentração real presente na amostra, segundo a fórmula:

$$E = \frac{\text{concentração obtida} - \text{concentração real}}{\text{concentração real}} \times 100$$

#### **3.2.4.7 Limite de quantificação**

O limite de quantificação (LQ) do método analítico foi testado, calculando-se os valores da precisão (CV%) e da exatidão (E%), referentes a menor concentração da curva analítica ( $1,5 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ ), através de análises intra-ensaio.

Para avaliar o limite de quantificação foi feito um gráfico de calibração, no intervalo de concentração de  $1,5 \times 10^{-4}$  -  $3,5 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ , sendo analisadas cinco amostras, no mesmo dia, na concentração de  $1,5 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ . Todas as amostras envolvidas nos referidos ensaios foram primeiramente eletrolisadas, segundo procedimento já descrito, para em seguida serem analisadas por CLAE.

#### **3.2.5 Eficiência de encapsulação**

Inicialmente foram pesados 12,24 mg de partículas liofilizadas de quitosana, contendo DMAE base livre. As partículas foram colocadas em um tubo de ensaio, sendo adicionadas de 2 mL de uma solução de ácido clorídrico 0,12 N. A amostra foi agitada, com o auxílio de um agitador de tubos, durante 5 minutos, a uma velocidade

de 1500 rpm. Em seguida a amostra foi colocada no banho de ultra-som por 30 minutos.

Após o rompimento das partículas, a amostra foi filtrada, através de um filtro para seringa sendo recolhida em um balão de 25 mL. O volume foi completado com solução tampão pH 7,4. Essa amostra corresponde a uma concentração teórica de DMAE base livre de  $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$  e foi denominada de amostra "a". Uma alíquota de 10 mL dessa solução foi eletrolisada, segundo os procedimentos já descritos e analisada por CLAE.

Uma segunda amostra foi preparada, da mesma maneira que a anterior, porém foram utilizados 8,6 mg de partículas liofilizadas de quitosana contendo DMAE base livre. Essa amostra corresponde a uma concentração teórica de DMAE base livre de  $3,5 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$  e foi denominada de amostra "b".

Para avaliar a eficiência de encapsulação foi feito um gráfico de calibração, no intervalo de concentração de  $1,5 \times 10^{-4}$  -  $3,5 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ . As duas amostras foram avaliadas no mesmo dia e os cálculos foram efetuados usando-se o gráfico de calibração.

$$EE = (M_1/M_2) \times 100,$$

onde: EE=eficiência de encapsulação,  $M_1$ =massa de DMAE encontrada nas micropartículas e  $M_2$ =massa de DMAE da formulação.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 4.1 Curva de precipitação do polímero pelo sulfato de sódio

Os dados obtidos nas análises por turbidimetria estão apresentados na **Figura 16**, e mostra a relação entre a absorvância e a concentração de sulfato de sódio utilizada.

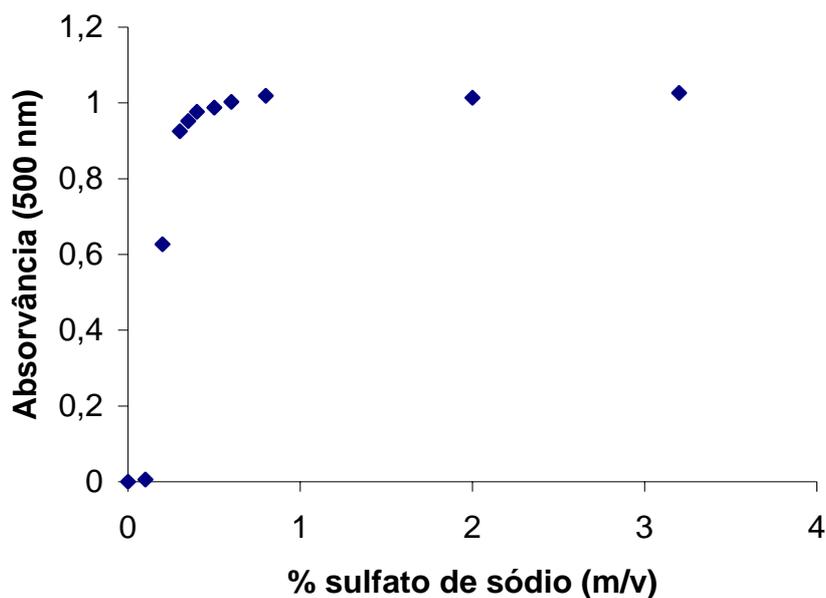


Figura 16- Curva turbidimétrica do sulfato de sódio

Os resultados permitiram estabelecer a concentração de solução de sulfato de sódio a ser utilizada para a precipitação do derivado do polímero, ficando estabelecida a porcentagem de 0,8.

#### 4.2 Desenvolvimento do método de obtenção das micropartículas de quitosana contendo DMAE

O processo de obtenção das micropartículas de quitosana foi baseado no comportamento desta em relação à solubilidade, sendo a mesma fracamente solúvel

em água. A adição de ácido acético, melhora a solubilidade como resultado da protonação do grupo amino. A solubilidade da quitosana é dependente também da presença de outros ânions em solução, que podem aumentar ou diminuir sua solubilidade. O ânion sulfato diminui sua solubilidade, sendo por esta razão, escolhido para a formação das micropartículas.

A quitosana foi empregada em uma concentração de 0,25% (m/v), sendo necessária a adição de 1% de polissorbato 80, para estabilizar a suspensão e evitar a formação de aglomerados. As partículas formadas foram separadas por centrifugação e liofilizadas.

A massa total de partículas após liofilização foi determinada para a realização do cálculo do rendimento do processo. O método desenvolvido apresentou um rendimento de 72% para o processo de obtenção das micropartículas a partir do DMAE (como bitartarato) e de 90% para o processo de obtenção das micropartículas a partir do DMAE base livre.

### **4.3 Caracterização morfológica das micropartículas contendo DMAE por microscopia óptica**

Durante o processo de obtenção dos sistemas, algumas lâminas foram obtidas e analisadas em microscópio óptico. Pode-se observar a formação de partículas, indicando que o método de coacervação simples possibilitou a formação dos sistemas.

#### **4.3.1 Micropartículas contendo DMAE (como bitartarato)**

A imagem dos sistemas obtidos está apresentada na **Figura 17**.

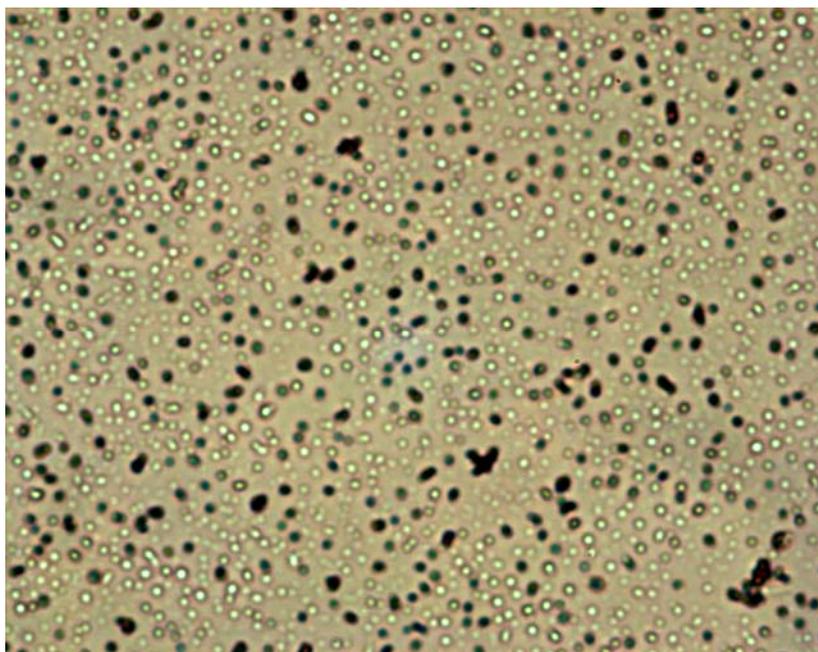


Figura 17- Fotografia das micropartículas contendo DMAE (como bitartrato). Aumento de 320X

A análise da Figura 17 permitiu observar que as partículas formadas possuem forma esférica, com uma distribuição de tamanho homogênea e ausência de agregados.

#### 4.3.2 Micropartículas contendo DMAE base livre

A imagem dos sistemas obtidos está apresentada na **Figura 18**.

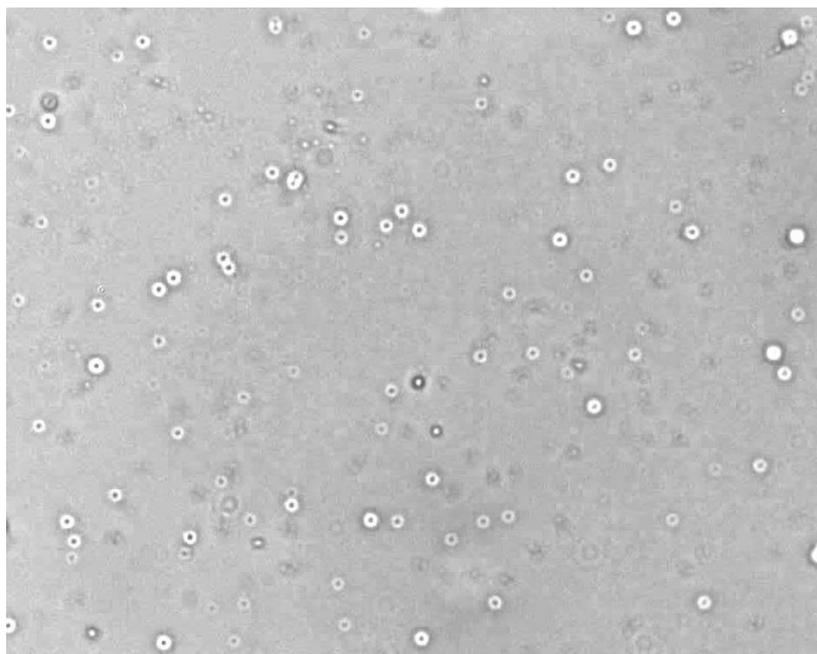


Figura 18- Fotografia das micropartículas contendo DMAE base livre. Aumento de 320X

A análise da Figura 18 permitiu observar que as partículas obtidas possuem forma esférica, distribuição de tamanho homogênea e ausência de agregados.

#### **4.4 Caracterização morfológica das micropartículas por microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

A análise do tamanho de partículas submicroscópicas é atualmente realizada através de espectroscopia de correlação de fótons (PCS).

Esta técnica é capaz de fornecer o raio hidrodinâmico de partículas coloidais, o qual pode ser calculado através da equação de Einsten-Stokes onde é determinado o coeficiente de difusão das partículas através da variação do espalhamento de luz causado pelo movimento Browniano das partículas.

$$D = \frac{KT}{6\pi\eta R_h}$$

onde K é a constante de Boltzmann, T a temperatura absoluta,  $\eta$  a viscosidade do meio e  $R_h$  o raio hidrodinâmico. Como  $R_h$  aumenta quando o coeficiente de difusão

diminui, é necessário realizar diluições das amostras a fim de que a concentração das partículas não interfira na difusão. Cuidado especial deve ser dado à temperatura e viscosidade uma vez que pequena variação destes parâmetros pode causar erro nas determinações de tamanho (HASKELL, 1998; NEW, 1990; FROKJAER et al., 1989).

A técnica de light scattering consiste em incidir sobre determinada amostra um feixe de luz laser de He-Ne de 10 mW (632 nm), de modo que as partículas espalhem luz. A luz espalhada é captada por uma célula fotomultiplicadora que transforma a luz captada em sinal, o qual é enviado ao correlator onde é feito o processamento dos dados. Estes são enviados para um computador onde um software realiza os cálculos fornecendo os valores de tamanho médio e índice de polidispersidade, entre outros (HASKELL, 1998; NEW, 1990; FROKJAER et al., 1989).

#### 4.4.1 Micropartículas inertes

A imagem do sistema obtido está apresentada na **Figura 19**.

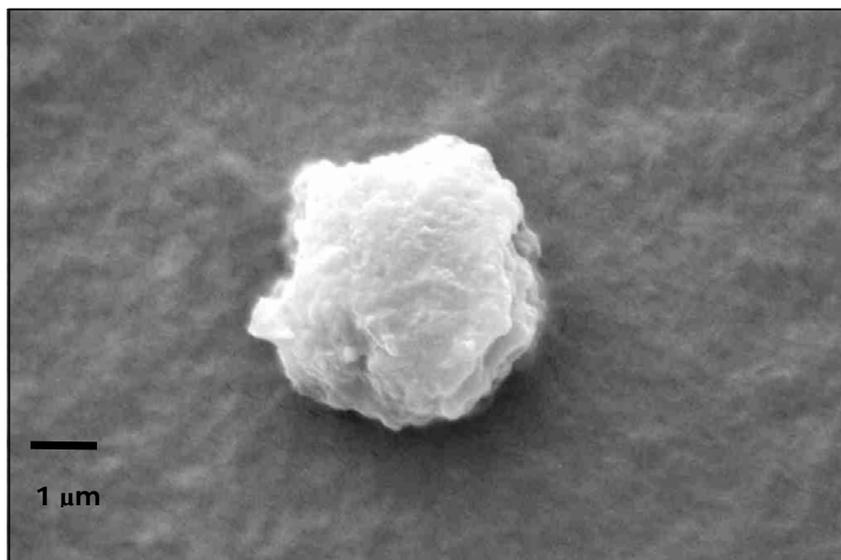


Figura 19- Fotomicrografia da micropartícula inerte de quitosana, referente a amostra "A" .

Aumento de 25000X

A análise da Figura 19 permitiu verificar que as partículas obtidas apresentam forma esférica com superfície irregular e ausência de agregados.

#### 4.4.2 Micropartículas contendo DMAE base livre

As imagens dos sistemas obtidos estão apresentadas nas **Figuras 20 e 21**.

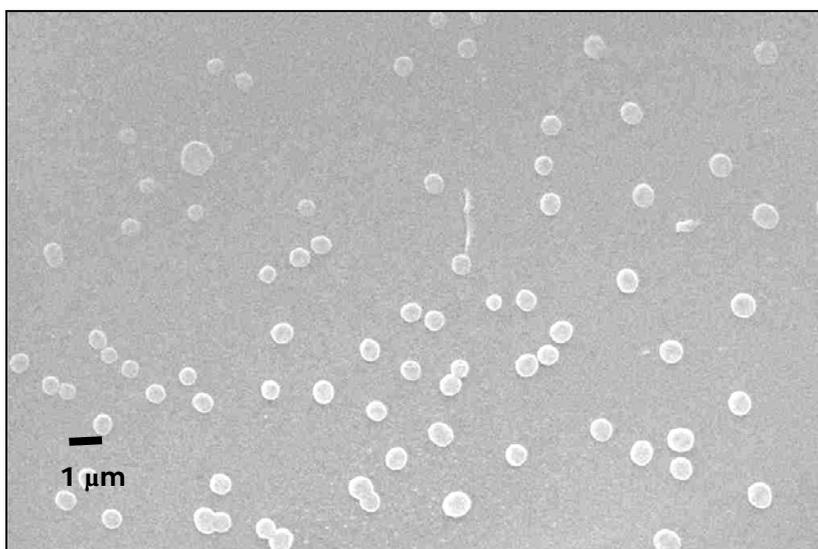


Figura 20- Fotomicrografia das micropartículas de quitosana contendo DMAE base livre.  
Aumento de 15000X

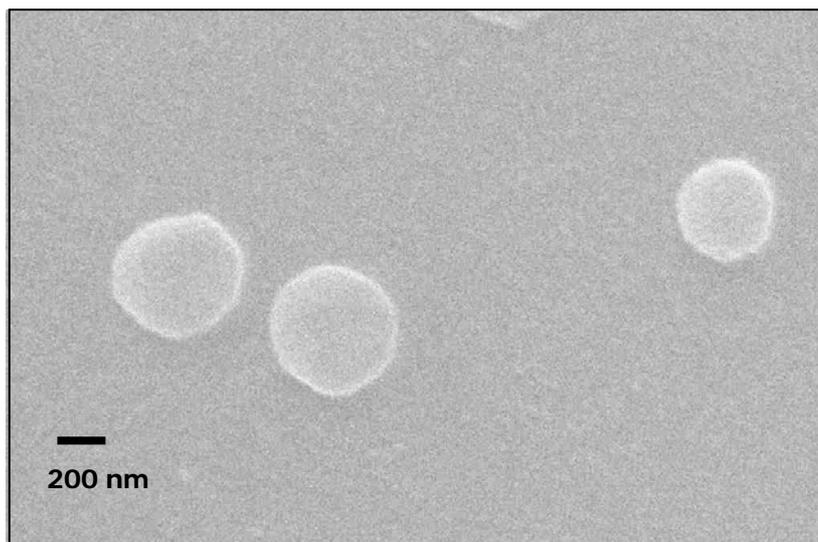


Figura 21- Fotomicrografia das micropartículas de quitosana contendo DMAE base livre. Aumento de 100000X

A análise das Figuras 20 e 21 permitiu verificar que as partículas obtidas apresentam forma esférica e ausência de agregados.

#### **4.5 Análise da distribuição do tamanho das partículas por espalhamento de luz**

A análise da distribuição do tamanho das partículas foi realizada através de espectroscopia de correlação de fótons (PCS).

##### **4.5.1 Partículas inertes**

Os resultados da distribuição do tamanho das partículas inertes por espalhamento de luz, referentes às amostras A e C, estão apresentados na Tabela 2 e nas **Figuras 22 e 23**.

Tabela 2- Tamanho das partículas (nm) e distribuição granulométrica (%) referente às amostras A e C

Amostras	Diâmetro (nm)	Distribuição granulométrica (%)
A	2187,8	91,7
	2754,5	8,3
C	961,8	64,0
	1211,0	28,6
	152,3	7,4

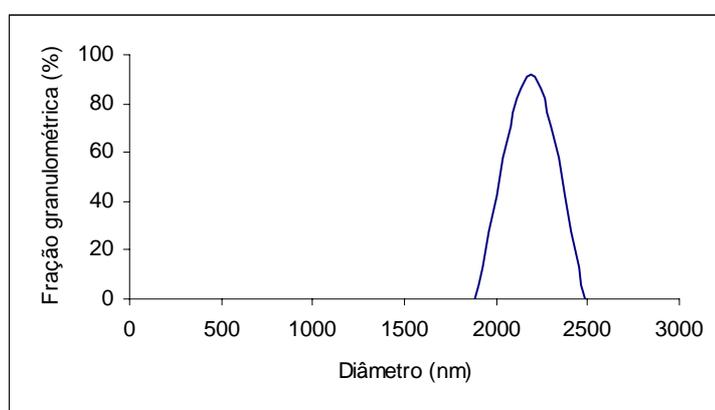


Figura 22- Gráfico representativo da distribuição do tamanho de partículas referente à amostra A

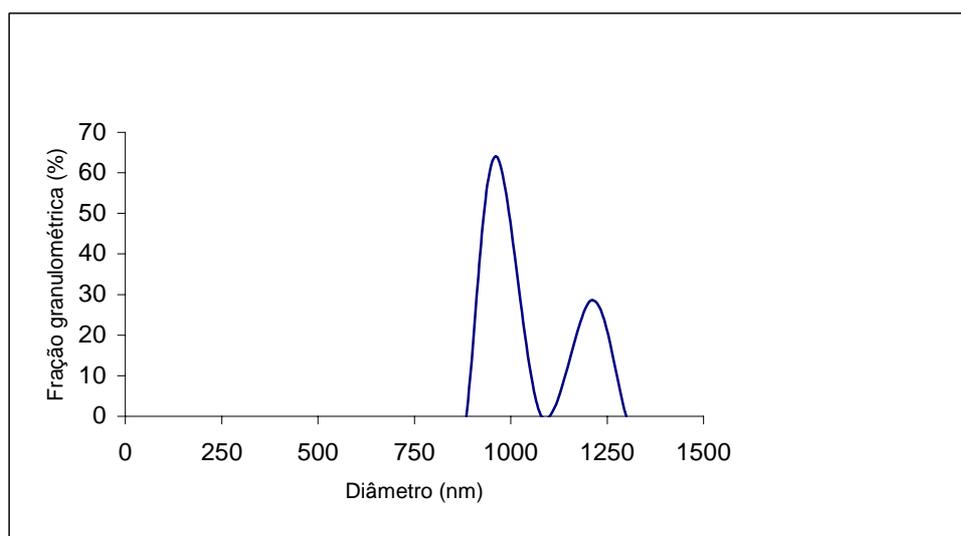


Figura 23- Gráfico representativo da distribuição do tamanho de partículas referente à amostra C

#### 4.5.2 Partículas contendo DMAE base livre

O resultado da distribuição do tamanho das partículas contendo DMAE base livre por espalhamento de luz, está apresentado na Tabela 3 e na **Figuras 24**.

Tabela 3- Tamanho das partículas (nm) e distribuição granulométrica (%) referente à amostra preparada com DMAE base livre

Amostra	Diâmetro (nm)	Distribuição granulométrica (%)
preparada com	419,5	78,4
DMAE base livre	528,2	21,6

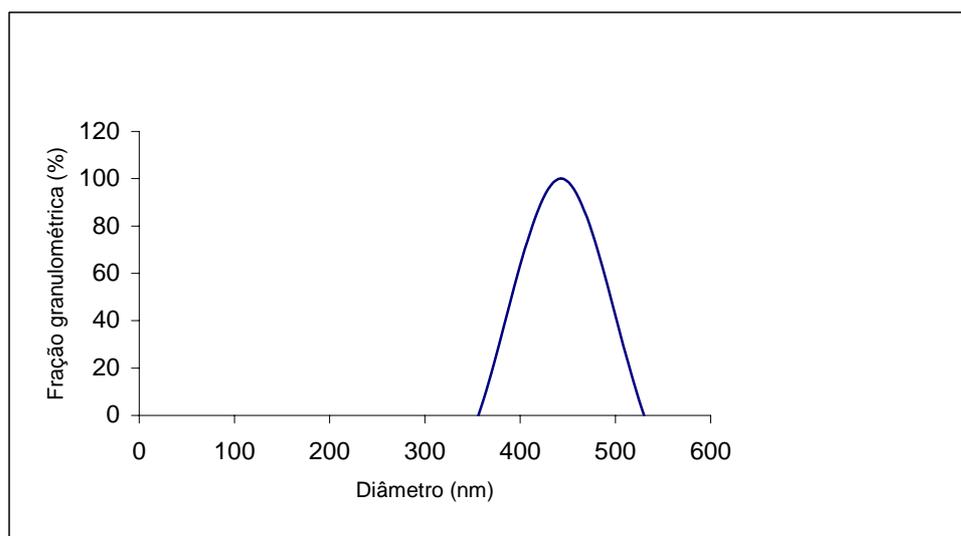


Figura 24- Gráfico representativo da distribuição do tamanho de partículas referente à amostra preparada com DMAE base livre

A análise dos resultados mostrou que as partículas referentes à amostra A, preparadas utilizando agitação mecânica, apresentaram uma distribuição de tamanho homogênea, sendo que 91,7% das mesmas apresentaram diâmetro médio de 2,2 $\mu$ m. Na amostra B, obtida utilizando-se sonicador de ponta de titânio durante adição do

agente precipitante, não foi verificada a formação de partículas ou estas romperam-se durante o processo. Na amostra C, preparada modificando-se o padrão de agitação descrito por Berthold et al (1996), a distribuição de tamanho não apresentou homogeneidade. Com relação à amostra preparada com DMAE base livre, com base no método proposto por Berthold et al (1996), as partículas apresentaram uma distribuição de tamanho homogênea, com diâmetro entre 419,0 e 528,0 nm. O padrão de distribuição é monomodal, perfil interessante para a veiculação de fármacos, considerando que a área é um fator importante no perfil de liberação dos mesmos.

#### **4.6 Desenvolvimento da metodologia analítica para a quantificação do DMAE**

##### **4.6.1 Estudo eletroquímico do DMAE**

O conceito de quantificação por método eletroquímico baseia-se numa reação de óxido – redução, fornecendo ou removendo elétrons de um condutor eletrônico (o eletrodo). A corrente resultante é proporcional à concentração do reagente e é convertida para uma voltagem e registrada convencionalmente. Uma das técnicas de utilização de corrente eletroquímica bastante utilizada é a Pulso - Amperometria, na qual o potencial é repetidamente pulsado entre dois valores. A corrente a cada potencial ou a diferença entre essas duas correntes (pulso diferencial amperométrico), pode ser utilizado com vantagens para um grande número de aplicações (KISSINGER; HEINEMAN, 1984).

Considerando a estrutura química do composto em questão, a quantificação do mesmo provavelmente poderia ser realizada mediante a utilização de um detector eletroquímico. O processo seria coerente com a oxidação da espécie para um derivado aldeídico ou ácido carboxílico, conforme ilustrado na **Figura 25**. Assim optamos pela

determinação do potencial eletroquímico do composto, utilizando a técnica de pulso diferencial.

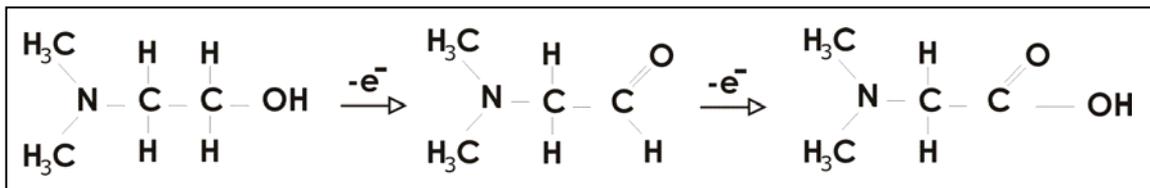


Figura 25- Oxidação do DMAE

No entanto, os resultados iniciais indicaram que a substância provavelmente não é eletroativa, conforme demonstrado na **Figura 26**.

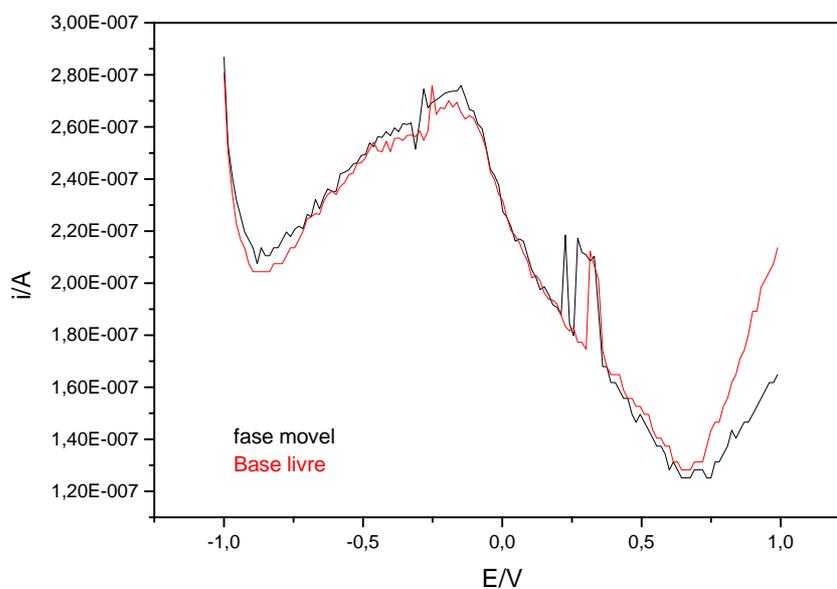


Figura 26- Registro da pulso - amperometria do DMAE base livre

Supostamente isto ocorreu devido ao fato da reação de oxidação do composto ser lenta e, em se tratando de uma análise onde a detecção ocorre mediante uma reação de superfície, envolvendo a troca entre o eletrodo e o composto, a reação entre as espécies envolvidas deve ser rápida para permitir a detecção.

#### 4.6.2 Oxidação do DMAE através da reação com permanganato de potássio e separação da amostra

##### 4.6.2.1 Espectrofotometria da amostra referente ao DMAE base livre na região do ultravioleta-visível, após oxidação com permanganato de potássio e separação da amostra

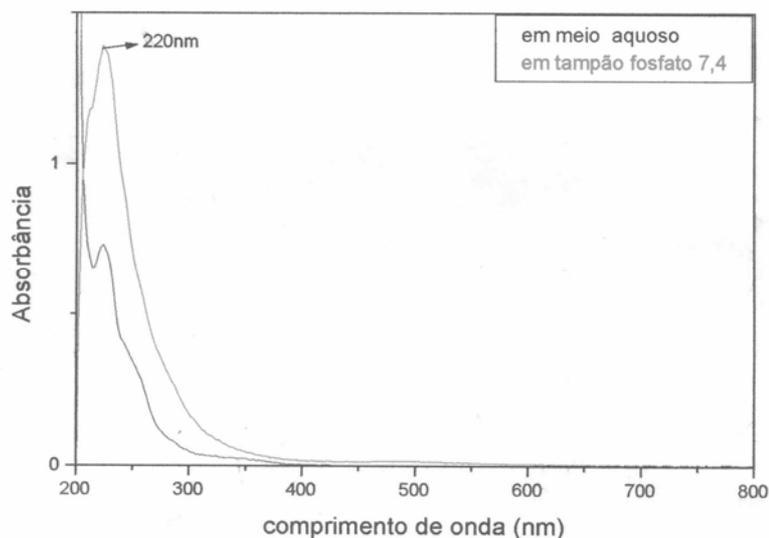


Figura 27- Espectro de absorção do DMAE base livre na região do ultravioleta-visível após oxidação com permanganato de potássio

A análise do espectro de absorção, apresentado na **Figura 27**, permitiu observar que o composto absorveu no comprimento de onda de 220 nm, coerente com grupo cromóforo apresentado após a oxidação do mesmo. Desta forma, verificamos que a indução da reação de oxidação do DMAE é viável dentro das condições estabelecidas. Notamos ainda que o processo de separação foi satisfatório, nestes estudos preliminares, considerando a remoção dos cátions e ânions que poderiam interferir na leitura.

Assim, com o objetivo de verificar a linearidade do método as amostras foram preparadas (oxidadas e separadas) em diferentes concentrações para a elaboração da curva analítica.

#### 4.6.2.2 Curva analítica referente às amostras de DMAE (como bitartarato) após oxidação e separação

A curva analítica está apresentada na **Figura 28**.

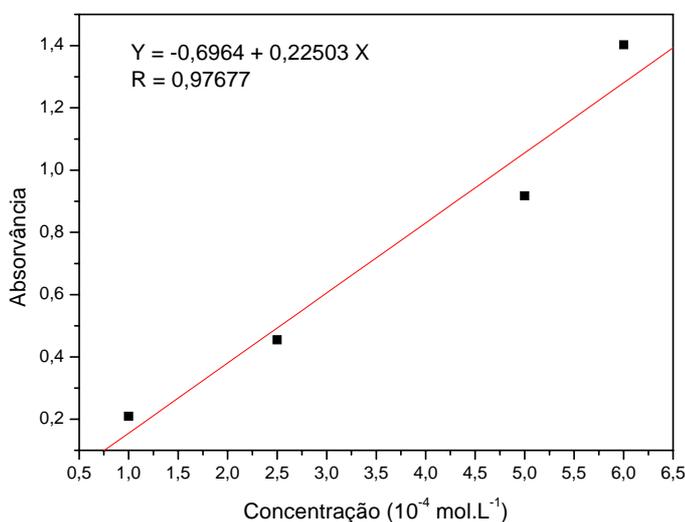


Figura 28- Curva analítica referente às amostras de DMAE (como bitartarato) após oxidação com permanganato de potássio e separação

A avaliação da linearidade do método foi obtida construindo-se a curva analítica e obtendo-se a equação da reta e o coeficiente de correlação linear ( $r$ ).

O valor do coeficiente de correlação encontrado foi de 0,97677, indicando que o método apresenta linearidade na faixa de concentração estudada.

Foram realizados estudos posteriores, em diversas concentrações, não sendo obtido reprodutibilidade nos experimentos, devido a dificuldade na separação do composto, principalmente pela saturação da resina pelo permanganato.

#### 4.6.3 Oxidação do DMAE base livre através de reação com cloro

##### 4.6.3.1 Voltametria de Pulso Diferencial

A **Figura 29** ilustra o perfil da curva corrente x potencial para o DMAE base

livre. Verifica-se a existência de um sinal anódico em 1 V vs Ag/AgCl, o qual é atribuído a oxidação do DMAE segundo a equação já mostrada na **Figura 15**. As **Figuras 30 e 31** mostram o decréscimo da corrente de pico anódico durante a eletrólise a potencial controlado a 1,1 V.

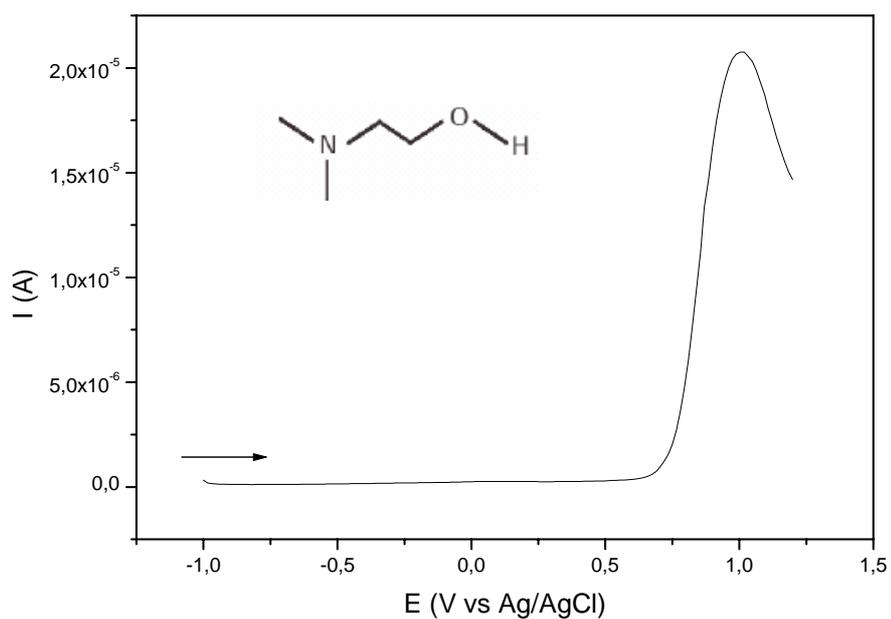


Figura 29- Voltamograma de pulso do DMAE base livre em tampão fosfato pH 7,4. Velocidade de varredura (v)= 150 mV.s .

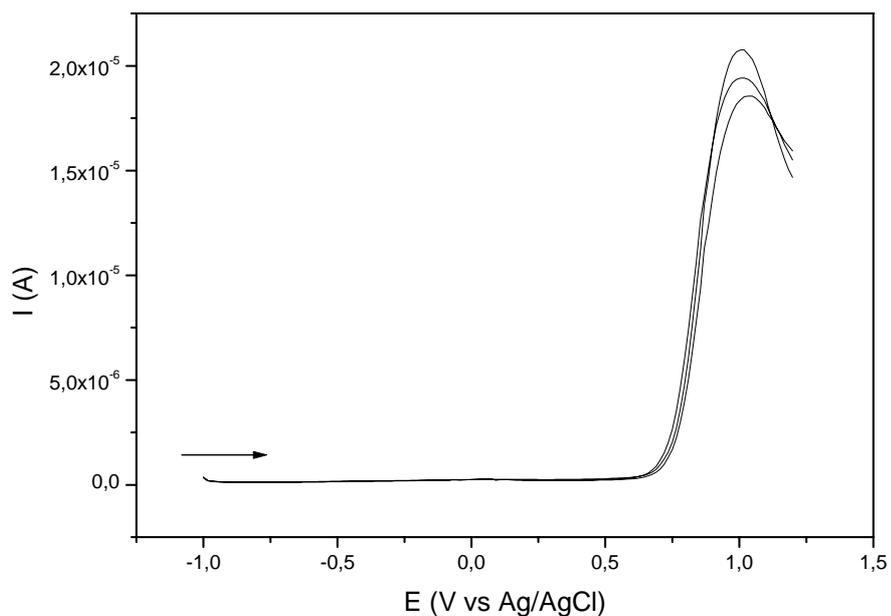


Figura 30- Voltamograma de pulso do DMAE base livre em tampão fosfato pH 7,4. Velocidade de varredura ( $v$ ) = 150 mV.s , após eletrólise parcial.  $E_{\text{aplicado}} = 1,1$  V.

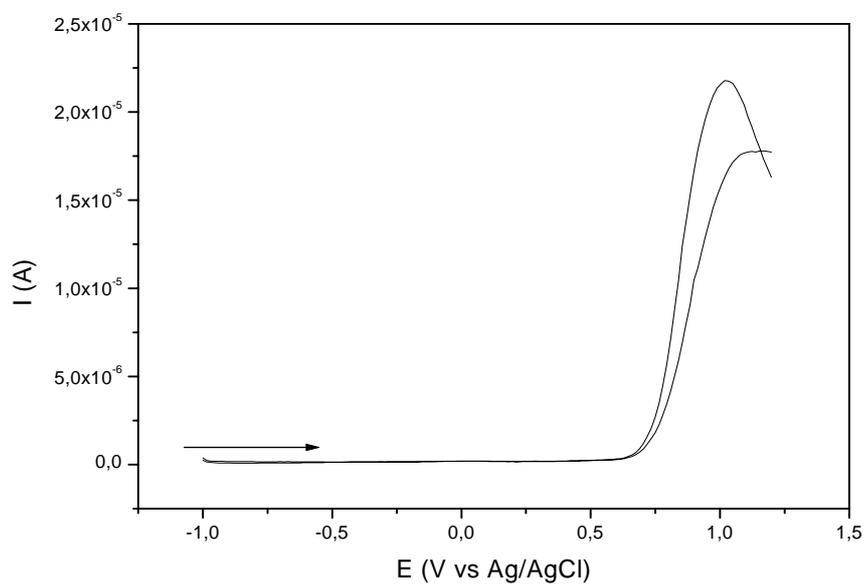


Figura 31- Voltamograma de pulso do DMAE base livre em tampão fosfato pH 7,4. Velocidade de varredura ( $v$ ) = 150 mV.s , após eletrólise total.  $E_{\text{aplicado}} = 1,1$  V.

Visto que o oxidante usado para a oxidação do DMAE foi o cloro (Cl), a viabilidade do processo é ratificada ao avaliar os potenciais de redução dessa espécie química, segundo equação apresentada na **Figura 32** (SHRIVER et al, 1994). A **Figura 33**, mostra a reação de transferência de elétrons entre o Cl e o DMAE.



Figura 32- Potencial de redução do cloro



Figura 33- Reação de transferência de elétrons entre o Cl<sub>2</sub> e o DMAE base livre

#### 4.6.3.2 Espectrofotometria da amostra referente ao DMAE base livre na região do ultravioleta-visível, após oxidação com cloro e separação da amostra

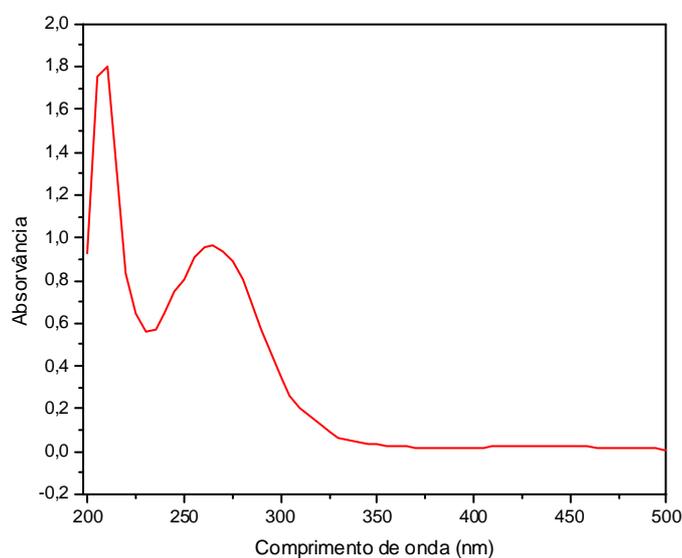


Figura 34- Espectro de absorção do DMAE base livre ( $1,0 \times 10^{-5}$  mol.L<sup>-1</sup>) na região do ultravioleta-visível após oxidação com cloro e separação da amostra

A análise do espectro de absorção (**Figura 34**), permitiu observar que os comprimentos de onda de maior absorvância foram entre 205 e 210nm, coerente com grupo cromóforo apresentado após a oxidação do mesmo. Desta forma, verificamos que a indução da reação de oxidação do DMAE através do cloro é viável dentro das condições estabelecidas, sendo definido o comprimento de onda de 208nm, para ser utilizado nos estudos subseqüentes com CLAE.

#### 4.6.4 Eletrólise à potencial controlado

##### 4.6.4.1 Espectrofotometria da amostra referente ao DMAE base livre na região do ultravioleta-visível, após eletrólise

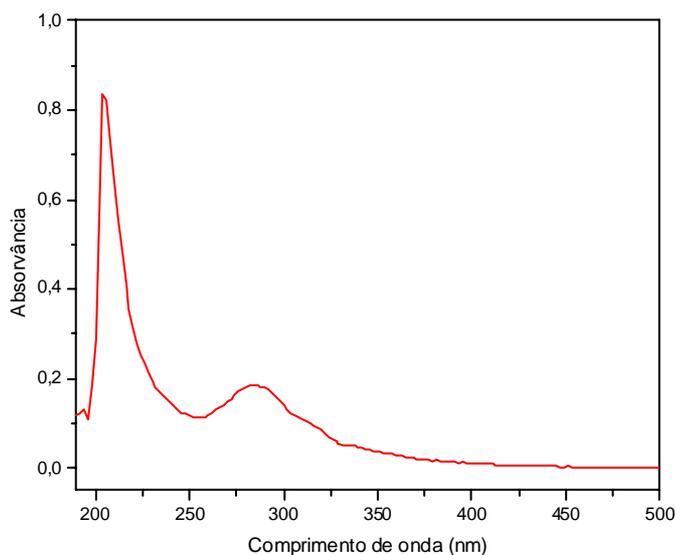


Figura 35- Espectro de absorção do DMAE base livre na região do ultravioleta-visível após eletrólise

A análise do espectro de absorção (**Figura 35**), permitiu observar que os comprimentos de onda de maior absorvância foram entre 204 e 208nm, coerente com grupo cromóforo apresentado após a oxidação do mesmo. Desta forma, verificamos

que a indução da reação de oxidação por do DMAE por eletrólise é viável dentro das condições estabelecidas, sendo definido o comprimento de onda de 208nm, para ser utilizado nos estudos subsequentes com CLAE.

#### 4.6.4.2 Gráfico de controle do processo de eletrólise

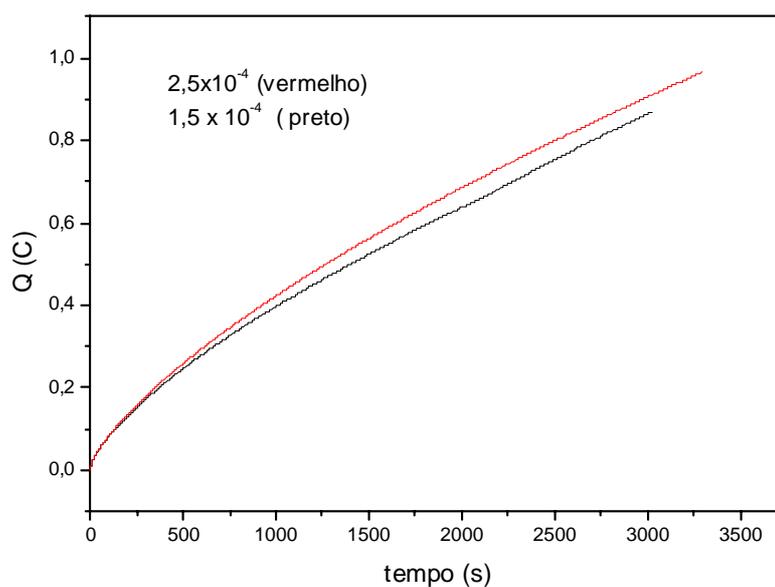


Figura 36- Gráfico de controle do processo de eletrólise do DMAE base livre nas concentrações de 1,5 e 2,5x10 mol.L<sup>-1</sup>

Todos os processos de eletrólise das amostras do DMAE base livre, na faixa de concentração estudada, foram controlados por gráficos, relacionando carga elétrica em Coulomb (C) x tempo (s), sendo que todas as amostras apresentaram o mesmo perfil de comportamento mostrado para as concentrações de 1,5 e 2,5x10 mol.L<sup>-1</sup> (**Figura 36**).

#### 4.6.5 Desenvolvimento e validação da metodologia analítica por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para quantificação do DMAE

##### 4.6.5.1 Análise cromatográfica do DMAE base livre oxidado através de reação com o cloro

Para verificar a possibilidade de validação da metodologia analítica através da indução de oxidação do DMAE base livre através de reação como cloro, foi construída uma curva analítica. As amostras foram obtidas após processo de oxidação e separação realizada com resina catiônica padrão e resina aniônica, descrita anteriormente como resina "A".

#### Curva analítica

Para a análise do composto foi construído um gráfico de calibração (**Figura 37**), no intervalo de concentrações de  $2,0$  a  $4,0 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ , colocando-se no eixo das abscissas as concentrações das amostras e no eixo das ordenadas a altura dos picos.

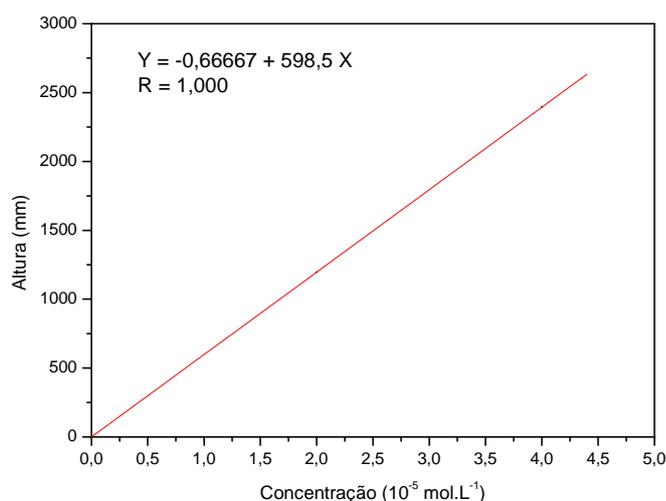


Figura 37- Curva analítica referente às amostras de DMAE base livre após oxidação por cloro e separação

O valor do coeficiente de correlação encontrado foi de 1,000, indicando que o método apresenta linearidade na faixa de concentração estudada. Ensaio posteriores foram efetuados para que se ampliasse essa faixa de concentração, porém a referida resina aniônica acabou sendo descontinuada sua produção pelo fabricante, impossibilitando sua aquisição no mercado interno e externo. Foi conseguida uma nova resina, similar quimicamente à anterior, porém com uma cadeia carbônica maior. Esta nova resina, descrita anteriormente como "B", passou a ser utilizada nos ensaios subseqüentes, na separação do DMAE base livre oxidado. Para a realização das análises foram utilizadas amostras do composto nas concentrações correspondentes a 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 5,0 e 6,0x 10<sup>-6</sup> mol.L em tampão fosfato.

Utilizando-se o protocolo já estabelecido para o preparo das colunas e separação do composto, não foram obtidos resultados reprodutivos. Assim novos ensaios foram realizados, efetuando-se a separação através da montagem de colunas com diferentes proporções das resinas catiônica padrão e da resina "B" e mesmo efetuando-se a separação utilizando-se as respectivas colunas isoladamente. Não foi obtida novamente uma reprodutibilidade do método, provavelmente pelo fato do cloro ser bastante reativo e terem sido formados outros compostos durante o processo de oxidação, como cloreto de acila. Mesmo com a utilização das resinas catiônica e aniônica, não foi possível separar adequadamente o composto, certamente pela cinética do processo.

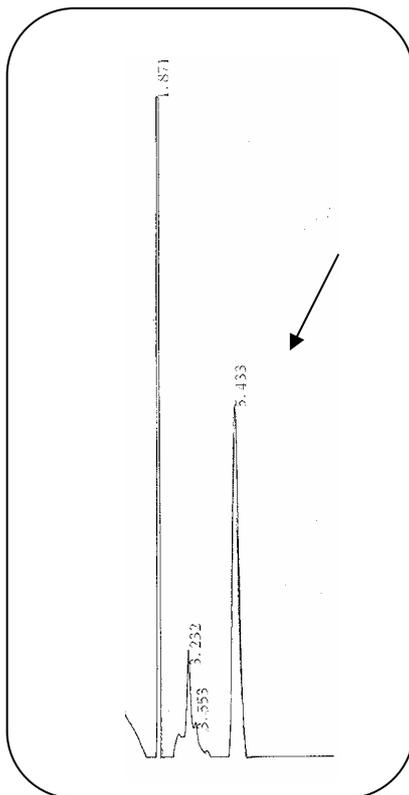


Figura 38- Cromatograma referente à amostra de DMAE base livre após oxidação com cloro e separação. Condições cromatográficas: Coluna RP-18; pré-coluna RP-18; fase móvel tampão fosfato pH 7,4: acetonitrila (99,5: 0,5 v/v) a um fluxo de 0,5 mL.min ; detecção a 208 nm

#### 4.6.5.2 Validação do método

Validação de um método analítico é o processo utilizado para estabelecer que os parâmetros de desempenho analítico do método estão de acordo com a aplicação desejada (CAUSON, 1997).

##### 4.6.5.2.1 Gráfico de calibração e linearidade

A calibração/linearidade é um dos mais importantes passos na análise química e

reflete a proporcionalidade entre a concentração do analito e a resposta obtida (PENG; CHIOU, 1990). Na análise de fármacos a concentração é determinada com base em gráficos de calibração obtidos pela análise de alíquotas de soluções com concentrações conhecidas do fármaco. Para a avaliação da linearidade são utilizadas concentrações superiores àquelas empregadas para a construção do gráfico de calibração. A linearidade do método proposto foi avaliada usando alíquotas de solução do composto na faixa de concentração de  $1,5 \times 10^{-4}$  -  $6,0 \times 10^{-4}$  mol.L<sup>-1</sup>. O gráfico de linearidade (**FIGURA 39**) foi construído colocando-se no eixo das abscissas as concentrações das amostras do DMAE base livre oxidado por eletrólise e no eixo das ordenadas a altura dos picos. Este estudo demonstrou que as respostas obtidas pelo detector são diretamente proporcionais à concentração do composto na amostra dentro do intervalo estudado. O coeficiente de correlação linear (r) encontrado para a curva de linearidade está dentro do limite aceitável (ANVISA, 2003), sendo que um coeficiente de correlação linear maior que 0,999, como foi obtido, é considerado como evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão.

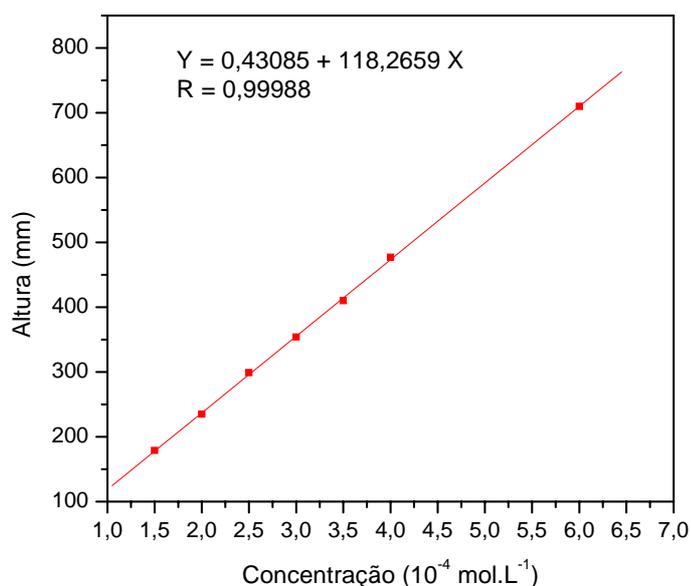


Figura 39- Gráfico de linearidade para análise do DMAE base livre após oxidação por eletrólise no intervalo de concentrações de  $1,5 - 6,0 \times 10^{-4}$  mol.L

#### 4.6.5.2.2 Precisão e exatidão

A precisão de um método analítico está relacionada com a dispersão das medidas ao redor do seu valor médio. A precisão é expressa como desvio padrão ou desvio padrão relativo (coeficiente de variação) e pode ser uma medida da reprodutibilidade ou da repetibilidade de um método analítico. A reprodutibilidade refere-se ao uso do procedimento analítico em diferentes laboratórios e a repetibilidade refere-se ao uso do procedimento analítico no laboratório, por um curto período de tempo, usando o mesmo analista e o mesmo equipamento (ANVISA, 2003; QUATTROCCHI et al, 1992).

A exatidão de um método analítico é definida como a diferença entre o valor obtido (média) e o valor verdadeiro presente na amostra (ANVISA; QUATTROCCHI et al, 1992).

##### 4.6.5.2.2.1 Precisão e exatidão intra e interensaios

Para avaliar a precisão e a exatidão do método analítico foram empregadas amostras de DMAE base livre, nas concentrações de 1,5; 2,5 e  $3,5 \times 10^{-4}$  mol.L<sup>-1</sup>, oxidadas por eletrólise. Todos os processos de eletrólise das referidas amostras foram controlados por gráficos, relacionando carga elétrica em Coulomb (C) x tempo (s). A **Figura 40** mostra o gráfico de controle do processo de eletrólise para a concentração  $1,5 \times 10^{-4}$  mol.L<sup>-1</sup>, durante o intraensaio.

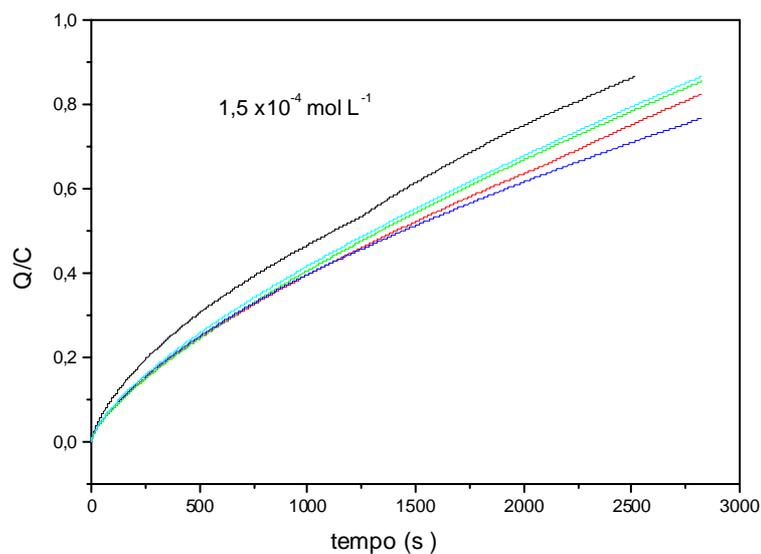


Figura 40- Gráfico de controle do processo de eletrólise das amostras de DMAE base livre na concentração de  $1,5 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ , durante intraensaio

A análise do gráfico mostra que todas as amostras apresentaram o mesmo perfil de comportamento.

A precisão e exatidão interensaio foram avaliadas durante três dias consecutivos, em duplicata, e a precisão e exatidão intra-ensaio ( $n=5$ ) foram realizadas no mesmo dia. Os resultados referentes à precisão e exatidão intra e interensaios encontram-se na Tabela 4.

Tabela 4 - Avaliação da precisão e exatidão do método para análise do DMAE

<b>Parâmetros</b>	<b>DMAE</b>		
<b>Precisão e exatidão intra-ensaio</b>			
conc. (mol.L <sup>-1</sup> )	1,5x10 <sup>-4</sup>	2,5x10 <sup>-4</sup>	3,5x10 <sup>-4</sup>
n	5	5	5
CV (%)	1,73	3,60	1,30
E (%)	+2,00	-5,30	+3,40
<b>Precisão e exatidão interensaios</b>			
conc. (mol.L <sup>-1</sup> )	1,5x10 <sup>-4</sup>	2,5x10 <sup>-4</sup>	3,5x10 <sup>-4</sup>
n	6	6	6
CV (%)	1,60	2,53	2,00
E (%)	+1,70	+1,20	+0,20

CV: coeficiente de variação; E: exatidão; conc.: concentração; n: número de determinações

Pelos dados da Tabela 4 pode-se verificar que os coeficientes de variação e os valores da exatidão, para as três concentrações analisadas, ficaram abaixo de 10% (SHAH et al., 1992; PENG; CHIOU, 1990).

#### 4.6.5.2.3 Limite de quantificação

O limite de quantificação (LQ) é um parâmetro usado para medir a sensibilidade de um método (GAITANI et al., 1998) e é definida como a menor concentração do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas (ANVISA, 2003).

Para determinar o limite de quantificação foram empregadas amostras de DMAE base livre, oxidadas por eletrólise, na concentração de 1,5x10<sup>-4</sup> mol.L<sup>-1</sup>, calculando-se os valores da precisão (CV%) e da exatidão (E%) intra-ensaio (n=5).

**Tabela 5-** Avaliação do limite de quantificação do método para análise do DMAE

Parâmetros	DMAE
<b>Precisão e exatidão intra-ensaio</b>	
conc. (mol.L <sup>-1</sup> )	1,5x10 <sup>-4</sup>
n	5
CV (%)	1,73
E (%)	+2,00

CV: coeficiente de variação; E: exatidão; conc.: concentração; n: número de determinações

Na avaliação dos dados da **Tabela 5**, verificamos que a concentração de  $1,5 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> corresponde ao limite de quantificação do método, pois apresentou valores para a precisão e exatidão menores que 10,0% (BRESSOLE et al., 1996).

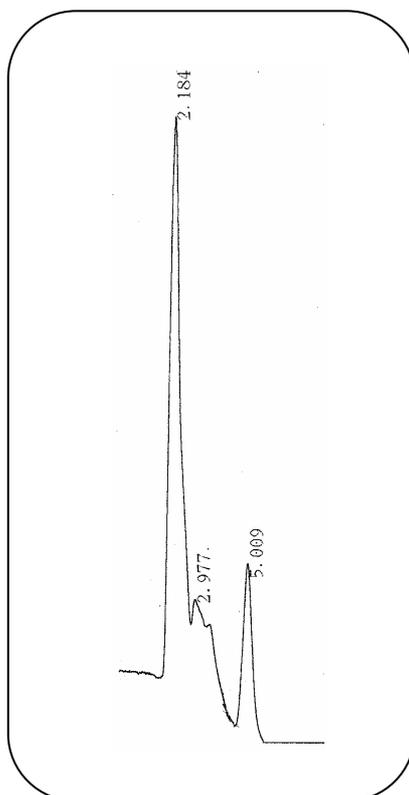


Figura 41- Cromatograma referente à amostra de DMAE base livre após oxidação por eletrólise  
Condições cromatográficas: Coluna RP-18; pré-coluna RP-18; fase móvel tampão fosfato pH 7,4; acetonitrila (99,5: 0,5 v/v) a um fluxo de 0,5 mL.min ; detecção a 208 nm

#### 4.7 Eficiência de encapsulação

Para determinar a eficiência de encapsulação foram empregadas duas amostras de partículas, com concentrações teóricas de DMAE base livre correspondentes a  $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$  (amostra "a") e  $3,5 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$  (amostra "b"). Os resultados da eficiência de encapsulação estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6- Avaliação da eficiência de encapsulação

Amostra	Concentração teórica ( $\text{mol.L}^{-1}$ )	Concentração real ( $\text{mol.L}^{-1}$ )	Eficiência de encapsulação (%)
"a"	$5,0 \times 10^{-4}$	$3,16 \times 10^{-4}$	63,2
"b"	$3,5 \times 10^{-4}$	$2,24 \times 10^{-4}$	64,0

Os dados da tabela mostram uma ótima eficiência de encapsulação (valor médio de 63,6%), comprovando ser adequada a metodologia empregada para o preparo das micropartículas de quitosana contendo DMAE base livre. Na avaliação dos dados verificamos ainda que os resultados foram reprodutivos para as diferentes concentrações das amostras, o que certifica a eficácia da metodologia para o rompimento das micropartículas e extração do DMAE.

## 5. CONCLUSÕES

Com base nas metodologias selecionadas e nos resultados experimentais obtidos pode-se concluir que:

O método de encapsulação mostrou-se adequado para a preparação de micropartículas de quitosana contendo, porque apresentou alto rendimento e excelente eficiência de encapsulação.

Os testes de caracterização físico-química mostraram que as partículas possuem forma esférica e tamanho adequado à via de administração pretendida;

O novo método desenvolvido para a quantificação do DMAE apresentou sensibilidade e seletividade, demonstrando ser um método vantajoso e confiável para a realização dos estudos propostos.

## REFERÊNCIAS

ABRAHAM, M.H.; CHADHA, H.S.; MITCHELL, R.C. The factors that influence skin permeation of solutes. **J. Pharm. Pharmacol.**, London, v.47, n.1, p.8-16, Jan. 1995.

AGNIHOTRI, S.A.; MALLIKARJUNA, N.N.; AMINABHAVI, T.M. Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery. **J. Controlled Release**, Amsterdam, v.100, n.1, p.5-28, Nov. 2004.

ALENCASTRE, J.B. **Micropartículas de carboximetilcelulose/quitosana para liberação de vitamina E na pele: caracterização, avaliação da estabilidade e estudos de permeação e retenção cutânea *in vitro***. São Paulo. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2002.

ALVAREZ-ROMÁN, R.; NAIK, A.; KALIA, Y.N.; GUY,R.H.; FESSI, H. Enhancement of topical delivery from biodegradable nanoparticles. **Pharm. Res.**, New York, v.21, n.10, p.1818-25, Oct. 2004.

ANDRÉO-FILHO, N.; OLIVEIRA, A.G. Sistemas de micro/nanoencapsulação de fármacos. **Infarma**. São Paulo, v.9, p.18-21, 1999.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução Re N<sup>o</sup> 899, de 29/05/2003.

ASPDEN, T.J.; ILLUM, L.; SKAUGRUD, O. Chitosan as a nasal delivery system: evaluation of insulin absorption enhancement and effect on nasal membrane integrity using rat models. **Eur. J. Pharm. Sci.**, Amsterdam, v.4, n.1, p. 23-31, 1996.

BARRY, B.W. Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery. **Eur. J. of Pharm. Sci.**, Amsterdam, v.14, n.2, p.101-114, Sep. 2001

BERTHOLD, A.; CREMER, K.; KREUTER, J. Preparation and characterization of chitosan microspheres as drug carrier for prednisolone sodium phosphate as model for antiinflammatory drugs. **J. Controlled Release**, Amsterdam, v.39, n.1, p.17-25, March 1996.

BRESSOLE, F.; BROMET-PETIT, M. AUDRAN, M. Validation of liquid chromatographic and gas chromatographic methods. Applications to pharmacokinetics. **J. Chromatogr. B**, v.686, p.3-10, 1996.

BRONAUGH, R.L.; COLLIER, S.W. *In vitro* methods for measuring skin permeation. In: ZATZ, J.L. **Skin permeation: Fundamentals and Application**. Wheaton, Allured Publishing, 1993, p.93-111.

CAI, N. Treatment of 37 cases of tardive dyskinesia by deanol. **Zhonghua Shen Jing Jing Shen Ke Za Zhi**, v.18, n.4, p.234-236, 1985

CALVIO, P.; VILA – JATO, J.; ALONSO, M.J. Comparative in vitro evaluation of several, colloidal systems, nanoparticles, nanocapsules, and nanoemulsions, as ocular drug carriers. **J. Pharm. Research**, Washington, v.85, n.5, p.530-6, May 1996.

CAUSON, R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis. Viewpoint and discussion. **J. Chromatogr. B**, Amsterdam, v.689, p.175-180, Feb. 1997.

CEVC, G.; BLUME, G.; SCHÄTZLEIN, A.; GEBAUER, D.; PAUL, A. The skin: a pathway for systemic treatment with patches and lipid based carriers. **Adv. Drug Del. Rev.**, Amsterdam, v.18, n.3, p.349-378, Feb. 1996.

CEVC, G. Lipid vesicles and other colloids as drug carriers on the skin. **Adv. Drug Del. Rev.**, Amsterdam, v.56, n.5, p.675-711, March 2004.

COLE, A.C.; GISOLDI, M.E. Clinical and consumer evaluations of improved facial appearance after 1 month use of topical Dimethylaminoethanol. **Scienc and Technology**. Johnson & Johnson CPWW, Skillman, Nj., 2002.

COUVREY, P.; COVARRAZE, G.; DEVISSAGUET, J.P.; PUISIEUX, F. Nanoparticles: Preparation and Characterization. **Microencapsulation Methods and Industrial Applications**. New York: Marcel Dekker, Inc., 1996, p.183-211.

COTSARELIS, G.; SUN, T.T.; LAVKER, R.M. Label-retaining cells reside in the bulge area of pilosebaceous unit: implications for follicular stem cells, hair cycle, and skin carcinogenesis. **Cell.**, v.61, p.1329-1337, 1990.

CUI, Z.; MUMPER, R. J. Chitosan – based nanoparticles for topical genetic immunization. **J.Controlled Release**, v.75, p.409-19, 2001.

DE GAITANI, C.M.; LANCHOTE, V.L.; BONATO, P.S. Enantioselective analysis of propafenone in plasma using a polysaccharide-based chiral stationary phase under reversed-phase conditions. **J. Chromatogr. B**, Amsterdam, v.708, n.1-2, p.177-183, April, 1998.

DENKBAS, E.B.; SEYYAL, M.; PISKIN, E. 5-Fluoracil loaded chitosan microspheres for chemoembolization. **J. Microencapsulation**, v.16, p.741-749, 1998.

EMBRIL, K.; NACHT, S. The Microsponge Delivery System (MDS): a topical delivery system with reduced irritancy incorporating multiple triggering mechanisms for the release of actives. **J. Microencapsulation**, London, v.13, n. 5, p.575-588, Sep./Oct. 1996.

FAIRHURST, D.; MITCHNICK, M. Submicron encapsulation of organic sunscreens. **Cosmetics & Toiletries**, v. 110, p. 47-50, Sep. 1995.

FERRIS, S.H.; SATHANANTHAN, G.; GERSHON, S.; CLARK, C. Senile dementia: treatment with deanol. **J. Am. Geriatrics Soc.**, Baltimore, v.25, n.6, p.241-244, 1977.

FINCH, C.A. Microencapsulation. In: ELVERS, B.; HAWKINS, S.; SCHULZ, G. **Encyclopedia of Industrial Chemistry**. 5.ed. Neiheim: VCH Verlagsgesellschaft, 1990, p. 575-88.

FREITAS, M.N.; MARCHETTI, J.M. Nimesulide PLA microspheres as a potencial sustained release system for the treatment of inflammatory diseases. **Int. J.I Pharm.** Amsterdam, v.295, n.1-2, p.201-211, May 2005.

FROKJAER, S.; HJORTH, E.L.; WORTS, O. Stability testing of liposomes during storage. In: Gregoriadis, G. **Liposomes technology**. Boca Raton: CRC, v.1, p .241-3, 1989.

GENTA, I; PERUGINI, P; PAVANETTO, F. A multiple emulsion method to entrap a lipophilic compound into chitosan microspheres. **Int. J. Pharm.** Amsterdam, v.152, n.2, p.237-246, Jun. 1997.

GEORGE, J.; PRIDMORE, S.; ALDOUS, D. Double blind controlled trial of deanol in tardive dyskinesia. **Australian and New Zealand Journal of Psychiatry**, Karrinyub, v.15, n.1, p.68-71, 1981.

GROSSMAN, M.R.; GISOLDI M.E.; COLE A.C. Long tern safety and efficacy evaluation of a new skin firming technology: Dimethylaminoethanol. **Sci.Techonol.** Johnson & Johnson CPWW, Skillman, Nj., 2002.

GUPCHUP, G.V.; ZATZ, J. Target delivery to pilosebaceous structures. **Cosmetics & Toiletries**, v.112, p.79-88, March 1997.

HASKELL, R. J. Characterization of submicron system via optical methods. **J. Pharm. Sci.** Washington, v.87, n.2, p.125-9, Feb. 1998.

HAUBRICH, D.R.; GERBER, N.H.; PELUEGER, A.B. Deanol affects choline metabolism in peripheral tissues of mice. **J. Neurochem**, Washington, v.37, n.2, p.476-82, Aug. 1981.

HEJAZI, R.; AMIJI, M. Stomach-specific anti H. pylori therapy. I: preparation and characterization of tetracycline-loaded chitosan microspheres. **Int. J. Pharm.** Amsterdam, v.235, n.1-2, p.87-94, March 2002.

HE, P.; DAVIS, S.S.; ILLUM, L. Chitosan microspheres prepared by spray drying. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v.187, n.1, p.53-65, Sep. 1999.

HOU, W.M.; MIYAZAKI, S.; TAKADA, M.; KOMAI, T. Sustained release of indomethacin from chitosan granules. **Chem. Pharm. Bull**, v.33, p.3986-3992, 1985.

HOUK, J.; GUY, R.H. Membrane models for skin penetration studies. **Chem. Rev.**, Washington, v.88, n.3, p.455-471, May 1988.

ILLUM, L. Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient. **Pharmaceutical Research**, New York, v.15, n.9, p.1326-1331, Sep. 1998.

IMAI, T.; SHIRAISHI, S.; SAITO, H.; OTAGIRI, M. Interaction of indomethacin with low molecular weight chitosan and improvement of some pharmaceutical properties of indomethacin by low molecular weight chitosan. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v.67, n.1, p.11-20, Jan. 1991.

INOUE, K.; MACHIDA, Y., SANNAN, T.; NAGAI, T. Bioyant sustained release tablets based on chitosan. **Drug Des. Deliv.**, v.2, p.165-175, 1988.

INTERNATIONAL COSMETIC INGREDIENT DICTIONARY AND HANDBOOK – CTFA, 7.ed., v.1, p.444 – Washington, 1997.

JAHODA, C.A.B.; REYNOLDS, A.J. Dermal-epidermal interactions. Adult follicle-derived cell populations and hair growth. **Dermatol. Clin.**, Philadelphia, v.14, p.573-583, Oct. 1996.

JAMEELA, S.R.; KUMARY, T.V.; LAL, A.V.; JAYAKRISHNAN, A. Progesterone-loaded chitosan microspheres: long acting biodegradable controlled delivery system. **J. Controlled Release**, Amsterdam, v.52, n.1-2, p.17-24, March 1998.

JANES, K.A.; FRESNEAU, M.P.; MARAZUELA, A.; FABRA, A.; ALONSO, M.J. Chitosan nanoparticles as delivery systems for doxorubicin. **J. Controlled Release**, Amsterdam, v.73, n.2-3, p.255-267, Jun. 2001.

JENNING, V.; GYSLER, A.; SCHÄFER-KORTING, M.; GOHLA, S.H. Vitamin A loaded solid lipid nanoparticles for topical use: occlusive properties and drug targeting to the upper skin. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, Amsterdam, v.49, p.211-218, May, 2000.

KAS, H.S. Chitosan: properties, preparations and application to microparticulate systems. **J. Microencapsulation**, London, v.14, n.6, p.689-711, Nov./Dec. 1997.

KAWASHIMA, Y.; HANDA, T.; KASAI, A.; TAKENAKA, H.; LINS, Y.; ANDO, Y. Novel method for the preparation of controlled-release granules coated with a polyelectrolyte complex of sodium polyphosphate-chitosan. **J. Pharm. Sci.**, Washington, v.74, n.3, p.264-268, 1985.

KISSINGER, P.T.; HEINEMAN, W. Electrochemical Detection in Liquid Chromatography and Flow Injection Analysis. **Laboratory Techniques in Electroanalytical Chemistry**. New York and Basel: Marcel Dekker, Inc., 1984, p.613-615.

KRISTL, J.; SMID-KORBAC, J.; STRUC, E.; SCHARA, M.; RUPRECHT, H. Hydrocolloids and gels of chitosans as drug carriers. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v.99, n.1, p.13-19, Sep. 1993.

KUMAR, M.N.V.R.; KUMAR, N. Polymeric Controlled Drug-Delivery Systems: Perspective Issues and Opportunities. **Drug Dev. Ind. Pharm.** New York, v.27 n.1, p. 1-30, n.2, 2001.

KUMBAR, S.G.; KULKARNI, A.R.; AMINABHAVI, T.M. Cross-linked chitosan microspheres for encapsulation of diclofenac microspheres for encapsulation of diclofenac sodium: effect of cross-linking agent. **J. Microencapsulation**, London, v.19, n.2, p.173-180, March/Apr. 2002.

LAMBERT, P.A; WOLFF, P.H.; DE MAXIMY, B.; GHENIM, A. Dimethylaminoethanol in treatment of neuroleptic-induced tardive dyskinesia. **Annales Medico-Psychologiques**, Paris, v.136, n.4, p.625-629, 1978.

LANG, G.; CLAUSEN, T. The use of chitosan in cosmetics. In: SKJAK-BRAEK, G.; ANTHONSEN, T.; SANFORD, P. (Eds). **Chitin and chitosan-sources, chemistry, biochemistry, psysical properties and applications**, London: Elsevier, 1989, p.139-150.

LOPEZ, R.F.V.; COLLET, J.H.; BENTLEY, M.V.L.B. Influence of ciclodextrin complexation on the *in vitro*, permeation and skin metabolism of dexamethasone. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v.200, n.1, p.127-32, Apr. 2000.

MAGDASSI, S. Delivery systems in cosmetics. **Colloids and Surfaces A: physicochemical and engineering aspects**, Amsterdam, v.123, p.671-9, May 1997.

MAGILL, M. Microencapsulation for the personal care industry. **Cosmetics & Toiletries**, v.105, p.59-62, Jun. 1990.

MAO, H.Q.; ROY, K.; TROUNG-LE, V.L.; JAMES, K.A.; LIM, K.Y.; WANG, Y.; AUGUST, J.T.; LEONG, K.W. Chitosan DNA nanoparticles as gene delivery carriers: synthesis, characterization and transfection efficiency. **J. Controlled Release**, Amsterdam, v.70, n.3, p.399-421, Feb. 2001.

MARTINDALE, W. **Martindale the Extra Pharmacopoeia**. Pharmaceutical Press, 1999.

MI, F.L.; WONG, T.B.; SHYU, S.S. Sustained-release of oxytetracycline from chitosan microspheres prepared by interfacial acylation and spray hardening methods. **J. Microencapsulation**, London, v.14, n.2, p.577-591, Sep./Oct. 1997.

MITRA, S.; GAUR, U.; GHOSH, P.C.; MAITRA, A.N. Tumor targeted delivery of encapsulate dextran-doxorubicina conjugate using chitosan nanoparticles as carrier. **J. Controlled Release**, Amsterdam, v.74, n.1-3, p.317-323, Jul. 2001.

MORGANTI, P.; RUOCCO, E.; WOLF, R.; RUOCCO, V. Percutaneous absorption and delivery systems. **Clin. Dermatol**, New York, v.19, n.4, p.489-501, Jul./Aug. 2001.

NACHT, S. Encapsulation and other topical delivery systems: a review of the state-of-the-art for controlled topical delivery. **Cosmetic Toiletries**, v.110, p.25-30, Sep. 1995.

NAIDOO, N.T. Natural cosmetic constituents: seaweeds, chitosan and rice. **South African Farming Journal**, v.59, p.131-132, 1992.

NAGAI, T.; SAWAYANAGI, Y.; NAMBU, N. Application of chitin and chitosan to pharmaceutical preparations. In ZIZAKIS, J.P. (Ed). **Chitin, Chitosan and Related Enzymes**. Orlando: Academic Press. Inc., 1984, p.21-39.

NEW, R.J. **Liposomes: a practical approach**. New York: Oxford University Press, 1990, p.105-12, 154-60.

NISHIMURA, E.K.; JORDAN, S.A.; OSHIMA H.; YOSHIDA H.; OSAWA, M.; MORIYAMA M.; JACKSON I.J.; BARRANDON Y.; MIYACHI Y.; NISHIKAWAS, S. Dominant role of the niche in melanocyte stem-cell fate determination. **Nature**, London, v.416, p.854-860, Apr. 2002.

NISHIOKA, Y.; KYOTANI, S.; OKAMURA, M.; MIYAZAKI, M., OKAZAKI, K.; OHNISHI S.; YAMAMOTO Y.; ITO, K. Release characteristics of cisplatin chitosan microspheres and effect of containing chitin. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v.38, n.10, p.2871-2873, Oct. 1990.

O'CONNORS, D.J.; SEXTON, B.A. **Surface Analysis Methods in Materials Science**, Springer, 1992.

OLIVEIRA, A.G.; SCARPA, M.V.; BUENO, J.H.F.; EVANGELISTA, R.C. Micro e nanocápsulas: um eficiente sistema com dimensões reduzidas, para liberação controlada e direcionamento de fármacos encapsulados. **Rev. Ciênc. Farm.**, v.14, p.37-49, 1992.

ORIENTI, I.; AIEDEH, K.; GIANASI, E.; BERTASI, V.; ZECCHI, V. Indomethacin loaded chitosan microspheres. Correlation between the erosion process and release kinetics. **J. Microencapsulation**, London, v.13, n.4, p.463-472, Jul./Aug. 1996.

OZBAS-TURAN, S.; AKBUGA, J.; ARAL, C. Controlled release of interleukin-2 from chitosan microspheres. **J. Pharm. Sci.**, Hoboken, v.91, n.5, p.1245-1251, May 2002.

PENG, G. W.; CHIOU, W. L. Analysis of drugs and other toxic substances in biological samples for pharmacokinetic studies. **J. Chromatogr.**, v.531, p.131-180, 1990.

PERRICONE, N. **O Fim das Rugas: um método natural e definitivo para evitar o envelhecimento da pele.** 2.ed. Rio de Janeiro: Campus, p.82, 2001.

PERUGINI, P.; GENTA, I.; PAVANETTO, F.; CONTI, B.; SCALIA, S.; BARUFFINI, A. Study on glycolic acid delivery by liposomes and microspheres. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v.196, n.1, p.51-61, Feb. 2000.

PIERRE, M.B.R.; TEDESCO, A.C.; MARCHETTI, J.M.; BENTLEY, M.V.L.B. Stratum corneum lipids liposomes for the topical delivery of 5-aminolevulinic acid in photodynamic therapy of skin cancer: preparation and *in vitro* permeation study. **BMC Dermatol.**, v.5, 2001. Disponível no site [http://www. Biomedcentral.com/1471-5945/1/5](http://www.Biomedcentral.com/1471-5945/1/5).

QUATTROCCHI, O.A.; ANDRIZZI, S.A.; LABA, R.F. Validación de metodos. **Introducción a la HPLC aplicación y práctica.** Buenos Aires: Artes Gráficas Farro, 1992, cap.12, p.301-328.

QUINTANAR-GUERRERO, D.; QUINTANAR-GANEN, A.; ALLÉMAND, E.; FESSI, H.; DOELKER, E. Influence of stabilizer coating layer on the purification and freeze-drying of poly(D,L-lactic acid) nanoparticles prepared by emulsion diffusion technique. **J. Microencapsulation**, London, v.15, n.1, p.107-19, Jan./Feb. 1998.

RICHARDS, R.N.; MEHARG, G.E. Electrolysis: Observations from 13 years and 140,000 hours of experience. **J. Am. Acad. Dermatol.**, Louis, v.33, n.4, p.662-666, Oct. 1995.

ROGERS, K. Controlled release technology and delivery systems. **Cosmetic Toiletries**, v.114, n.5, p.53-60, 1999.

ROLLAND, A.; WAGNER, N.; CHATELUS, A.; SHROOT, B.; SCHAEFER, H. Site-specific drug delivery to pilosebaceous structures using polymeric microspheres. **Pharm. Res.**, New York, v.10, n.12, p.1738-1744, Dec. 1993.

RUGGINENT, A. Effects of dimethylaminoethanol acetyl glutamate on the attentive capacity of a group of soccer players. **Archivio e Maragliano Di Patologia e Clinica**, v.30, n.2, p.189-198, 1974.

SAMPAIO, S.A.P.; RIVITTI, E.A. Anatomia e fisiologia. **Dermatologia**. São Paulo: Artes Médicas, 2001, cap. 1, p.5.

SHAH, P.V.; MIDHA, K.K.; DIGHE, S.; MCGILVERAY, I.J.; SKELLY, J.P.; YACOBI, A.; LAYLOFF, T.; VISWANATHAN, C.T.; COOK, C.E.; McDOWALL, R.D.; PITTMAN, K.A.; SPECTOR, S. Analytical Methods Validation: Bioavailability, Bioequivalence and Pharmacokinetic Studies. **J. Pharm. Sci.** Washington, v.81, n.3, p.309-14, March 1992.

SHAH, S.; QAQISH, R.; PATEL, V.; AMIJI, M. Evaluation of the factors influencing stomach-specific delivery of antibacterial agents for *Helicobacter pylori* infection. **J.Pharm. Pharmacol.**, London, v.51, n.6, p.667-672, Jun. 1999.

SHAROV, A.A.; LI, G.Z.; PALKINA, T.N.; SHAROVA T.Y.; GILCHREST, B.A.; BOTCHKAREV, V.A. Fas and c-kit are involved in the control of hair follicle melanocyte apoptosis and migration in chemotherapy-induced hair loss. **J. Invest Dermat.**, Malden, v.120, p.27-35, Jan. 2003.

SHRIVER, D.F.; ATKINS, P. W.; LANGFORD, C. H. **Inorg. Chem.** 2.ed. Oxford : Oxford University Press, 1994.

SILVER, A.F.; CHASE, H.B.; ARSENAULT C.T. Early anagen initiated by plucking compared with early spontaneous anagen. In: MONTAGNA, W.; DOBSON, R.L. **Biology of skin**. 1.ed. Oxford: Pergamon Press, 1975, v.19, p. 265-286.

SINGH, S.; SINGH, J. Transdermal drug delivery by positive diffusion and iontophoresis: a review. **Med. Res. Rev.**, New York, v.13, n.5, p.569-621, Sep. 1993.

SINHA, V.R.; SINGLA, A.K.; WADHAWAN, S.; KAUSHIK, R.; KUMRIA, R.; BANSAL, K.; DHAWAN S. Review article - Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v.274, n.1-2, p.1-33, Apr. 2004.

SOPPIMATH, K.S.; AMINABHAVI, T.M.; KULHARNI, A.R.; RUDZINSKI, W.E. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. Review. **J. Controlled Release**, Amsterdam, v.70, n.1-2, p.1-20, Jan. 2001.

THACHARODI, D.; PANDURANGA RAO, K. Development and *in vitro* evaluation of chitosan-based transdermal drug delivery systems for controlled delivery of propranolol hydrochloride. **Biomaterials**, Oxford, v.16, n.2, p.145-8, Jan. 1995.

THIES, C. A Survey of Microencapsulation Processes. **Microencapsulation Methods and Industrial Applications**. New York: Marcel Dekker, Inc., 1996, p.1-19.

TOLL, R.; JACOBI, U.; RICHTER, H.; LADERMANN, J.; SCHAEFER, H.; BLUME-PEYTAVI, U. Penetration profile of microspheres in follicular targeting of terminal hair follicles. **J. Invest. Dermatol.**, Malden, v.123, p.168-176, Jul. 2004.

TURCHIELLO, R.F.; VENA, F.C.B.; MAILLARD, Ph.; SOUZA, C.S.; BENTLEY, M.V.B.L.; TEDESCO, A.C. Cubic phase gel as a drug delivery system for topical application of 5 – ALA, its ester derivatives and m – THPC in photodynamic therapy (PDT). **J. Photochem. Photobiol. B: Biology**, Lausanne, v.70, n.1, p.1-6, Apr. 2003.

UHODA, I.; FASKA, N.; ROBERT, C.; CAUWENBERGH, G.; PIERARD, G.E. Split face study on the cutaneous tensile effect of 2-dimethylaminoethanol (deanol) gel. **Skin Res. Technol.**, Copenhagen, v.8, n.3, p.164-7, Aug. 2002.

VIRAGH, P.A.; MEULI, M. Human scalp hair follicle development from birth to adulthood: statistical study with special regard to putative stem cells in the bulge and proliferating cells in the matrix. **Arch. Dermatol. Res.**, New York, v.287, p.279-284, March 1995.

VOGT, A.; MANDT, N.; LADERMANN, J.; SCHAEFER, H.; BLUME-PEYTAVI, U. Follicular targeting-a promising tool in selective dermatotherapy. **J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.**, Oxon, v.10, p.252-255, Dec. 2005.

WALLO, W.; KOLLIAS, N.; PAYONG, G.; KURTZ, S.E. Clinical Instrumental documentation of skin firming effects of topical dimethylaminoethanol. **Science and Technology**, Johnson & Johnson CPWW, Skillman, Nj., 2002.

WHITING, D.A. Histology of normal hair. In: HORDINSKY, M.K.; SAWAYA, M.E.; SCHER, R.K. **Atlas of Hair and Nails**. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2000, p.9-18.