



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO MULTIDISCIPLINAR EM SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS**

ANA CAROLINA DIAS VIANA DE ANDRADE

**PEELING DE ÁCIDO RETINÓICO EM MICROEMULSÃO:
DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA
CLÍNICA NO TRATAMENTO DE MELASMA**

Vitória da Conquista
2015

ANA CAROLINA DIAS VIANA DE ANDRADE

**PEELING DE ÁCIDO RETINÓICO EM MICROEMULSÃO:
DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA
CLÍNICA NO TRATAMENTO DE MELASMA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, Universidade Federal da Bahia, como requisito para obtenção do título de Mestre em Biociências.

Orientador: Prof. Dr. Mateus Freire Leite

Vitória da Conquista
2015

Biblioteca Universitária Campus Anísio Teixeira, UFBA

Andrade, Ana Carolina Dias Viana de

Peeling de ácido retinóico em microemulsão: Desenvolvimento e avaliação da eficácia clínica no tratamento do melasma. 2015. Dissertação (Mestrado) – Instituto Multidisciplinar de Saúde, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, 2015. 117f. il

Orientador: Prof. Dr Mateus Freire Leite.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal da Bahia, Programa de Pós-Graduação em Biociências, 2015.

1. Tretinoína. 2. Pele. 3. Melanose. I. Universidade Federal da Bahia. Programa de Pós-Graduação em Biociências. II. Título

CDD

ANA CAROLINA DIAS VIANA DE ANDRADE

**PEELING DE ÁCIDO RETINÓICO EM MICROEMULSÃO:
AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA NO TRATAMENTO DE
MELASMA**

Essa dissertação foi julgada adequada à obtenção do grau de Mestre em Biociências e aprovada em sua forma final pelo programa de Pós-graduação em Biociências, Universidade Federal da Bahia.

Vitória da Conquista, 26 de junho de 2015

Prof. Dr. Orientador Mateus Freire Leite
Universidade Federal da Bahia - BA

Profa. Dra. Danila Souza Oliveira Coqueiro
Universidade Federal da Bahia-BA

Prof. Dr. Anderson Santos Souza
Universidade Federal da Bahia - BA

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por proporcionar o milagre da existência e iluminar meu caminho.

Aos meus pais Isaias e Rita, por me darem o incentivo a perseverança em superar todos os obstáculos.

Ao meu esposo Matheus por todo o amor, paciência e dedicação.

Ao meu filho João Pedro, por encher a minha vida de alegria.

Especialmente ao meu orientador, Prof. Dr. Mateus Freire Leite, por não medir esforços durante a realização deste trabalho, pela confiança, incentivo, compreensão, esclarecimentos e grandiosos ensinamentos.

A minha irmã, Ana Paula pelo apoio e companheirismo nos momentos de necessidade.

A todos os professores do programa de pós-graduação em Biociência que fizeram parte do meu crescimento profissional e pessoal;

Aos colegas do laboratório, Gessyka, Mahala, Lorena, Laryana, Ricardo e Maiara pelo grande apoio durante o desenvolvimento do produto.

Ao amigo Raildo, pelo grande auxílio na estatística.

Aos colegas de mestrado Lorena, Danyo, Rafael, Maiana, Danilo e Nina por todo apoio dado durante esse período.

A farmácia Formulize, pelo apoio com a matéria prima.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e à Universidade Federal da Bahia pela oportunidade realizar esse mestrado;

Enfim, gostaria de agradecer a todos que torceram por mim, que mesmo de longe sempre emitiram vibrações positivas para que tudo desse certo.

Se um dia tiver que escolher entre o mundo e o amor lembre-se: se escolher o mundo ficará sem o amor, mas se escolher o amor com ele você conquistará o mundo.

Albert Einstein

ANDRADE, Ana Carolina Dias Viana de. Peeling de ácido retinóico em microemulsão: Desenvolvimento e avaliação da eficácia clínica no tratamento do melasma. 115f. 2015. Dissertação (Mestrado) – Instituto Multidisciplinar de Saúde, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, 2015.

RESUMO

O melasma é uma desordem comum caracterizada por hiperpigmentação em áreas fotoexpostas. É uma doença benigna, porém gera grande insatisfação em pacientes que a possuem. O tratamento é difícil, e pode haver recidivas frequentes após o término da terapia. Uma das opções de tratamento é o *peeling* de ácido retinóico. Essa terapia mostra-se eficaz em algumas situações clínicas, porém, ainda sem sucesso no tratamento de melasmas dérmicos. A proposta dos autores com o presente estudo foi desenvolver um *peeling* em microemulsão contendo ácido retinóico a 1%, caracterizá-lo, dosá-lo na microemulsão, validá-lo, testá-lo quanto a sua permeação cutânea e avaliar a eficácia dessa terapia através de um estudo clínico controlado randomizado duplo cego. Após o desenvolvimento do produto, 60 pacientes portadoras de melasma foram divididas aleatoriamente em três grupos (n=20): Grupo A-aplicação do *peeling* de ácido retinóico 1% convencional (AR 1%). Grupo B-aplicação do *peeling* de ácido retinóico a 1% em microemulsão (AR 1%M). Grupo C-aplicação de placebo. Os grupos foram submetidos a quatro sessões de *peeling* quinzenalmente nos dias zero, 15, 30 e 45 e analisados nos tempos zero, 15, 30, 45 e 60 dias. A avaliação foi realizada utilizando o *Melasma Area and Severity Index* (MASI) e o *Melasma Quality of Life* (MelasQoL). Foram também avaliados parâmetros hemato-bioquímicos nos dias zero e 60. De posse dos resultados obtidos avaliou-se a normalidade através Kolmogorov-Smirnov e posteriormente, aplicou-se os teste estatísticos Friedman (para testar o efeito dos tratamentos no índice MASI), Wilcoxon (para comparações entre pares sendo e testar o efeito dos tratamentos no índice MelasQoL), Kruskal-Wallis (para testar as diferenças entre os grupos) e Mann-Whitney (para comparações entre pares). O nível de significância adotado foi de 5% ($\alpha=0,05$). Em relação ao desenvolvimento do *peeling* de ácido retinóico em microemulsão foi possível obter a formulação desejada, cujos seus componentes finais foram PEG 40, Cetiol V, Tween 20, Span 80, ácido retinóico e água, e, o mesmo apresentou as seguintes características físico químicas: pH: 6,41 ($\pm 0,1734$), Tamanho das gotículas: 3,42 ($\pm 0,0611$) nm, pdi: 0,189 ($\pm 0,02$), Densidade: 1,024 ($\pm 0,0018$)g/ml, Viscosidade: 755,4 Cp, Potencial Zeta: - 0,837 ($\pm 0,2965$)mV, Condutividade: 25,6 ($\pm 3,579$) μ s/cm. O doseamento de ácido retinóico na microemulsão foi de 93,89%. No teste de permeação cutânea foi demonstrado que havia pouca permeação do ácido retinóico em microemulsão na solução receptora. Os resultados demonstraram redução significativa do índice MASI nos três grupos, indicando efeito de todos os tratamentos, inclusive do placebo, contra o melasma ($P < 0,001$). Foi observado que houve uma redução significativa das manchas com a utilização do *peeling* de ácido retinóico em microemulsão (62%) quando comparado ao *peeling* de ácido retinóico a 1% convencional (26%) e ao placebo (12%). Houve também redução significativa do índice MelasQoL (soma de todos os aspectos) nos três grupos, indicando efeito de todos os tratamentos, inclusive do placebo, na qualidade de vida global dos portadores de melasma. Entretanto, o *peeling* de ácido retinóico 1% em microemulsão foi o tratamento que promoveu o maior efeito na qualidade de vida dos indivíduos. Em termos percentuais o *peeling* de ácido retinóico a 1% em microemulsão proporcionou redução média de 30% no índice MelasQoL,

contra 13% do tratamento convencional e apenas 4% do placebo. Comparando os parâmetros hemato-bioquímicos nos dias zero e 60 não houve alterações significativas entre os resultados. Pode-se concluir com a realização desse estudo que foi possível a obtenção do peeling químico contendo ácido retinóico a 1% em microemulsão e que esse produto foi eficaz no tratamento do melasma por promover redução das manchas e melhora na qualidade de vida dos pacientes. Além disso, mostrou-se seguro pela baixa permeação *in vitro* e não alteração de exames laboratoriais.

Palavras-chave: Melanose. Microemulsão. Tretinoína.

ANDRADE, Ana Carolina Dias Viana de. Retinoic acid peeling delivered in a microemulsion: development and clinical efficacy in the treatment of melasma. 115f. 2015. Dissertation (Master's) Multidisciplinary Health Institute, Federal University of Bahia, Vitória da Conquista, 2015.

ABSTRACT

Melasma is a common disorder characterized by hyperpigmentation in photoexposed areas. It is a benign disease, however, one that leads to great dissatisfaction in patients affected by it. Treatment is difficult, and there are frequent relapses after conclusion of the therapy. One of the treatment options is retinoic acid peeling. This therapy has been shown to be effective in some clinical situations, however, without success in the treatment of dermal melasmas. The authors' proposal in the present study was to develop a peeling delivered in a microemulsion containing 1% retinoic acid, characterize it, test it with regard to its cutaneous permeation, and evaluate the efficacy of this therapy by means of a double blind randomized controlled clinical study. After development of the product, 60 patients with melasma were randomly divided into three groups (n=20): Group A - application of conventional 1% retinoic acid peeling (AR 1%). Group B - application of 1% retinoic acid peeling in microemulsion (AR 1%M). Group C - Application of placebo. The groups were submitted to 4 peeling sessions, fortnightly, and analyzed at the time intervals of zero, 15, 30, 45 and 60 days. Evaluation was made by using the *Melasma Area and Severity Index* (MASI) and *Melasma Quality of Life* (MelasQoL). Hemato-biochemical parameters were also evaluated at days zero and 60. After obtaining the results, normality was evaluated by means of the Kolmogorov-Smirnov test and afterwards, the following tests were applied: Friedman statistical (to test the effect of the treatments on the MASI index), Wilcoxon (for comparison between pairs to test the effect of treatments on the MelasQoL index), Kruskal-Wallis (to test the differences between the groups) and Mann-Whitney (for comparisons between pairs). The level of significance adopted was 5% ($\alpha = 0.05$). Regarding the development of retinoic acid peels microemulsion was possible to obtain the desired formulation, its end whose components were PEG 40, Cetiol V, Tween 20, Span 80, retinoic acid and water, and it had the following physicochemical characteristics pH: 6.41 (± 0.1734), size of the droplets: 3.42 (± 0.0611) nm, pdi: 0,189 (± 0.02), density: 1.024 (± 0.0018) g / ml , viscosity: 755.4 Cp, Zeta Potential: - 0.837 (± 0.2965) mV, Conductivity: 25.6 (± 3.579) S / cm. The dosage of retinoic acid in the microemulsion was 93.89%. The results demonstrated a significant reduction in the MASI index in the three groups, indicating the effect of all the treatments, including the placebo, on melasma ($P < 0.001$). A significant reduction in the stains was observed with the use of retinoic acid peeling delivered in microemulsion (62%) when compared with the conventional 1% retinoic acid peeling (26%) and the placebo (12%). There was also a significant reduction in the MelasQoL index (sum of all the aspects) in the three groups, indicating the effect of all the treatments, including the placebo, on the overall quality of life of those with melasma. However, 1% retinoic acid peeling delivered in microemulsion was the treatment that promoted the greatest effect on the quality of life of individuals. In percentage terms, the 1% retinoic acid delivered in microemulsion provided a mean reduction of 30% in the MelasQoL index, against 13% of the conventional treatment and only 4% of the placebo. When comparing the hemato-biochemical parameters on days zero and 60, there were no significant changes in the results. It could be concluded that by performing this study, it was possible to obtain chemical peeling containing 1% retinoic acid delivered in microemulsion, and that this

product was effective in the treatment of melasma by promoting a reduction in the stains and improving the quality of life of patients. In addition, it was shown to be safe due to the low permeation in vitro and in showing no alteration in the laboratory exams.

Key words: Melanosis. Microemulsion. Tretinoin.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Corte histológico de pele humana. A - camadas histológicas da pele fina (coloração HE) e B - camadas histológicas de pele espessa (coloração tricrômico). Aumento 400 X.....	21
Figura 2. Disposição dos melanócitos na epiderme, demonstrando discreta projeção em relação á derme	23
Figura 3. Esquema de distribuição de melanina na epiderme, através dos melanosomos.....	26
Figura 4. Esquema demonstrando a produção de melanina	28
Figura 5. Tipo de pele de Fitzpatrick	30
Figura 6. Estrutura química do ácido retinóico	40
Figura 7. Mecanismo de ação do ácido retinóico	40
Figura 8. Diagrama simplificado do estrato córneo e de duas microrrotas de penetração de fármacos. (1) via matriz lipídica entre os corneócitos (rota intracelular) e (2) através dos corneócitos e matriz lipídica intercelular (rota transcelular)	43
Figura 9. Estrutura das microemulsões	45
Figura 10. Figura demonstrando a diluição da microemulsão para análise.	53
Figura 11. Figura demonstrando a diluição da solução padrão para análise.....	54
Figura 12. Esquema da célula de Franz.....	57
Figura 13. Teste de solubilidade do ácido retinóico nos solventes Mackaderm microexpress [®] , Óleo mineral, Cetiol V, Tween 20, Óleo de canola e Tween 80, da esquerda para direita, respectivamente.....	62
Figura 14. Teste de solubilidade do ácido retinóico nos solventes Silicone Volátil, PEG 400, Glicerol, Miristato de isopropila e Propilenoglicol, da esquerda para a direita, respectivamente	63
Figura 15. Teste de solubilidade do ácido retinóico nos solventes Mackam 1200, Estearato de butila, Óleo de silicone, PEG 40, Triglicerídeos dos ácidos cáprico-caprílico e Span 80, da esquerda para a direita, respectivamente.....	63
Figura 16. Diagrama nº1, sendo a fase oleosa constituída por cetiol V, os tensoativos Span 80, Tween 20 e PEG 400 (1:1:1) e a fase aquosa constituída por água.....	65
Figura 17. Diagrama nº2, sendo a fase oleosa constituída por cetiol V, os tensoativos Span 80, PEG 400 e Tween 20 (1:2:1) e a fase aquosa constituída por água.....	66
Figura 18. Diagrama nº 3, sendo a fase oleosa constituída por cetiol V, os tensoativos Span 80, Tween 20 e PEG 40 (1:1:1) e a fase aquosa constituída por água.....	67
Figura 19. Diagrama nº 4, com incorporação do ativo ácido retinóico 1%, sendo a fase oleosa constituída por cetiol V, os tensoativos Span 80, Tween 20, PEG 40 (1:1:1), a fase aquosa constituída por água.....	68
Figura 20. Gráfico demonstrando a definição do ponto isoelétrico (PIE) do sistema final escolhido (9:1), de composição FA 9,09%, T81,82% E FO 9,09%.	70
Figura 21. Comportamento reológico da microemulsão desenvolvida	72
Figura 22. Comportamento da condutividade da microemulsão selecionada com a adição gradativa de água. Os valores são representados pela média e desvio padrão	72
Figura 23. Linearidade do método.....	74
Figura 24. Efeito dos tratamentos sobre a qualidade de vida dos portadores de melasma.....	80
Figura 25. Aspecto clínico da face das pacientes após aplicação dos peelings e placebo; A. Peeling ácido retinóico a 1% (AR1%); B. Peeling ácido retinóico a 1% em microemulsão (AR 1%M) e C. Placebo	80

Quadro 1. Classificação dos fototipos de pele proposta por Fitzpatrick.....	30
Quadro 2. Formulação do <i>peeling</i> contendo ácido retinóico com seus componentes e propriedades.....	52
Quadro 3. Parâmetros de referência da fórmula MASI.....	59
Quadro 4. Questionário MelasQuol	60
Quadro 5. Solubilidade do ácido retinóico nos solventes utilizados;.....	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição das 24 microemulsões reproduzidas do diagrama nº3 para escolha da melhor microemulsão.....	69
Tabela 2. Caracterização físico-química da microemulsão desenvolvida. Os valores são representados pela média e o desvio padrão (n=3).....	71
Tabela 3. Formulação da microemulsão contendo ácido retinóico a 1%	73
Tabela 4. Valores da absorvância da solução padrão, da amostra (microemulsão) e o teor de ácido retinóico contido na amostra	73
Tabela 5. Diferenças entre a absorvância e teor do ácido retinóico nas solução padrão, amostra e placebo	74
Tabela 6. Tabela demonstrando o teor de ácido retinóico da amostra nas concentrações 80%, 100% e 120%.....	75
Tabela 7. Tabela demonstrando as médias do teor de ácido retinóico da amostra nas concentrações 80%, 100% e 120%, vistas por dois analistas em dois dias diferentes.....	75
Tabela 8. Tabela demonstrando o teor do ácido retinóico da amostra nas concentrações 80%, 100% e 120%, observadas por dois analistas em dois laboratórios	75
Tabela 9. Teor da amostra contendo ácido retinoico e a exatidão nas concentrações 80%, 100% e 120%.....	76
Tabela 10. Tabela demonstrando o teor de ácido retinóico da amostra nos tempos 0 e 60'	76
Tabela 11. Tabela demonstrando o teor de ácido retinóico da amostra na temperatura ambiente e 10' em 50°C	76
Tabela 12. Tabela demonstrando o teor de ácido retinóico da amostra em relação a diferenças no comprimento de onda.....	76
Tabela 13. Comparação entre os tratamentos e acordo com o índice MASI e os períodos de avaliação	77
Tabela 14. Comparação entre os tratamentos, de acordo com o índice MelasQoL e os períodos de avaliação.....	78
Tabela 15. Grupo A – Comparação dos exames (Hb, Ht, L, PLA) nos dias zero e 60.	81
Tabela 16. Grupo A – Comparação dos exames (COL, HDL, LDL, VLDL, TRI) nos dias zero e 60.	82
Tabela 17. Grupo A – Comparação dos exames (F.A, GGT, TGO, TGP) nos dias zero e 60.	83
Tabela 18. Grupo B – Comparação dos exames (Hb, Ht, L, PLA) nos dias zero e 60.....	84
Tabela 19. Grupo B – Comparação dos exames (COL, HDL, LDL, VLDL, TRI) nos dias zero e 60.	85
Tabela 20. Grupo B – Comparação dos exames (F.A, GGT, TGO, TGP) nos dias zero e 60.	86
Tabela 21. Grupo C – Comparação dos exames (Hb, Ht, L, PLA) nos dias zero e 60.....	87
Tabela 22. Grupo C – Comparação dos exames (COL, HDL, LDL, VLDL, TRI) nos dias zero e 60.	88
Tabela 23. Grupo C – Comparação dos exames (F.A, GGT, TGO, TGP) nos dias zero e 60	89

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SIMBOLOS

ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
ATA	Ácido tricloroacético
COL	Colesterol total
CRABP	Proteína celular de ligação ao retinóide
DCT	Dopacromo tautomerase
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EHL	Equilíbrio hidrófilo/lipófilo
FA	Fosfatase alcalina
FSH	Hormônio folículo estimulante
G	Grama
GGT	Gama-Glutamiltransferase
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HE	Hematoxilina eosina
Hb	Hemoglobina
Ht	Hematócrito
L	Leucócitos
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
L-DOPA	dioxifenilalanina
LH	Hormônio luteinizante
LIP	Luz intensa pulsada
MASI	Melasma Area And Severity Index
MelasQol	Melasma Quality Of Life
ml	Mililitro
mm	Milímetro
mg	Miligrama
MSH	Hormônio melanócito estimulante
α -MRC-1	Receptor de melanocortina 1
nm	Nanômetro
pH	Potencial hidrogeniônico
PLA	Plaqueta
RAR	Receptor de ácido retinóico
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Rotações por minuto
UV	Ultravioleta
RXR	Receptor de retinóide X
TGO	Transaminase glutâmico oxalacética
TGP	Transaminase glutâmico pirúvica
TRI	Triglicerídeos
TRP-2	Tirosinase relacionada à proteína 2
Tyrp-1	Tirosinase relacionada a proteína 1
UVA	Ultravioleta A
UVB	Ultravioleta B
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade
VDC	<i>Vertical diffusion cell</i>
ΔG	Energia livre
γ	Tensão superficial

ΔS
°C
%

Área interfacial
Grau celsius
Porcentagem

SUMÁRIO

1 Introdução	18
2 Revisão de Literatura	20
2.1 ANATOMIA E FISIOLOGIA DA PELE	20
2.1.1 A epiderme	20
2.1.2 Derme.....	24
2.1.3 Anexos cutâneos.....	25
2.1.4 Tecido subcutâneo	26
2.1.5 Melanogênese	26
2.2 CLASSIFICAÇÃO DA PELE	29
2.3 MELASMA	31
2.3.1 Diagnóstico	33
2.3.2 Tratamento do melasma	34
2.4 PEELINGS QUÍMICOS	37
2.5 ÁCIDO RETINÓICO E PEELING DE ÁCIDO RETINÓICO.....	39
2.6 TOXICIDADE DO ÁCIDO RETINÓICO	42
2.7 PERMEAÇÃO PERCUTÂNEA DE FÁRMACOS.....	42
2.8 MICROEMULSÃO.....	44
3 Justificativa	47
4 Objetivos	48
4.1 OBJETIVO GERAL.....	48
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	48
5 Material e Métodos	49
5.1 OBTENÇÃO DA MICROEMULSÃO	49
5.1.1 Teste de solubilidade do ativo.....	49
5.1.2 Construção do diagrama de fases pseudo-ternário e seleção das microemulsões.....	49
5.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA MICROEMULSÃO DESENVOLVIDA	50
5.2.1 Tamanho das gotículas e índice de polidispersividade.....	50
5.2.2 Reologia	50
5.2.3 Potencial zeta.....	51
5.2.4 pH.....	51
5.2.5 Condutividade.....	51
5.2.6 Densidade	51
5.3 TESTE DE ESTABILIDADE PRELIMINAR.....	52
5.3.1 Centrifugação.....	52
5.4 OBTENÇÃO DA FORMULAÇÃO SELECIONADA DO PEELING CONTENDO ÁCIDO RETINÓICO 1%.....	52
5.5 DOSEAMENTO DO ÁCIDO RETINÓICO NA MICROEMULSÃO	53

5.6 VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ÁCIDO RETINÓICO A 1,0% EM MICROEMULSÃO POR ESPECTOFOTOMETRIA UV	54
5.6.1 Especificidade e seletividade	54
5.6.2 Linearidade	55
5.6.3 Intervalo linear	55
5.6.4 Precisão	55
5.6.5 Exatidão	56
5.6.6 Robustez	56
5.7 ESTUDO DA PERMEAÇÃO CUTÂNEA <i>IN VITRO</i>	56
5.8 AVALIAÇÃO CLÍNICA DA EFICÁCIA DO <i>PEELING</i> DE ÁCIDO RETINÓICO 1% EM MICROEMULSÃO EM PACIENTES PORTADORAS DE MELASMA.....	57
5.8.1 Procedimento estatístico para análise do estudo clínico	60
5.8.2 Determinação hemato-bioquímica	61
6 Resultados	62
6.1 OBTENÇÃO DA MICROEMULSÃO	62
6.1.1 Teste de solubilidade do ativo	62
6.1.2 Construção do diagrama de fases pseudo-ternário e seleção da microemulsão	64
6.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO QUÍMICA DA MICROEMULSÃO SELECIONADA	71
6.3 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE PRELIMINAR	73
6.3.1 Centrifugação	73
6.4 OBTENÇÃO DA MICROEMULSÃO CONTENDO ÁCIDO RETINÓICO A 1%	73
6.5 DOSEAMENTO DO ÁCIDO RETINÓICO NA MICROEMULSÃO	73
6.6 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ÁCIDO RETINÓICO A 1% EM MICROEMULSÃO POR ESPECTOFOTOMETRIA	74
6.6.1 Especificidade e seletividade	74
6.6.2 Linearidade	74
6.6.3 Precisão	75
6.6.3.1 Repetibilidade (precisão intracorrida)	75
6.6.3.2 Precisão intermediária	75
6.6.3.3 Reprodutibilidade	75
6.6.4 Exatidão	76
6.6.5 Robustez	76
6.7 ESTUDO DE PERMEAÇÃO CUTÂNEA <i>IN VITRO</i>	77
6.8 AVALIAÇÃO CLÍNICA DA EFICÁCIA DO <i>PEELING</i> DE ÁCIDO RETINÓICO 1% EM MICROEMULSÃO EM PACIENTES PORTADORAS DE MELASMA.....	77
7 Discussão	90
7.1 OBTENÇÃO DAS MICROEMULSÕES CONTENDO ÁCIDO RETINÓICO 1,0%.....	90
7.1.1 Teste de solubilidade do ativo	90
7.1.2 Construção do diagrama de fases pseudo-ternário e seleção da microemulsão	90
7.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA MICROEMULSÃO DESENVOLVIDA	92
7.3 TESTE DE ESTABILIDADE PRELIMINAR.....	94
7.3.1 Centrifugação	94
7.4 DOSEAMENTO DO ÁCIDO RETINÓICO NA MICROEMULSÃO	95

7.5 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ÁCIDO RETINÓICO A 1% EM MICROEMULSÃO POR ESPECTOFOTOMETRIA	95
7.6 ESTUDO DA PERMEAÇÃO CUTÂNEA <i>IN VITRO</i>	97
7.7 AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DO <i>PEELING</i> DE ÁCIDO RETINÓICO A 1% EM MICROEMULSÃO EM PACIENTES PORTADORAS DE MELASMA	98
7.7.1 Determinação hemato-bioquímica	100
8 Conclusão	101
Referência	103
Anexos	113
ANEXO A - Parece do Comitê de Ética em Pesquisa.....	114
ANEXO B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	116

1 Introdução

O melasma é uma desordem frequente caracterizada por hiperpigmentação da pele em áreas fotoexpostas, principalmente na face (RENDON *et al.*, 2006; SAMPAIO; RIVITTI, 2007; MIOT *et al.*, 2009). Acomete mais o sexo feminino, e todos os grupos raciais, principalmente os fototipos de Fitzpatrick mais altos (FITZPATRICK *et al.*, 2005). É uma doença benigna, porém, é causa de desconforto para as portadoras de melasma, trazendo um impacto na qualidade de vida das pacientes que possuem o distúrbio (BALL AREFIEV; HANTASH, 2012). A etiologia ainda permanece desconhecida, porém fatores de risco são conhecidos como exposição à radiação ultravioleta, fatores hormonais, uso de anticoncepcionais orais e terapia de reposição hormonal. O tratamento do melasma é geralmente insatisfatório, pela grande recorrência das lesões e pela ausência de uma alternativa de clareamento definitivo (RENDON *et al.*, 2006), e esse fato tem incentivado a busca por tratamentos inovadores.

Os *peelings* químicos são ferramentas terapêuticas úteis no tratamento do melasma (YAMAMOTO *et al.*, 2012). Dentre os *peelings* químicos, o *peeling* de ácido retinóico tem sido bastante utilizado, pois além de promover remoção do pigmento depositado na epiderme, tem a capacidade de inibir a tirosinase que é uma enzima chave na produção de melanina, porém, ainda sem boa eficácia para o melasma dérmico (CLARK; SCERRI, 2008).

Vários fármacos podem apresentar dificuldade em atravessar a barreira da pele e atingir o seu sítio de ação (BARRY, 2004). A nanotecnologia tem-se desenvolvido em vários campos da medicina, entre eles a dermatologia. As características físico-químicas das nanopartículas como o seu tamanho, podem contribuir para uma maior permeação dos fármacos através da pele (GUPTA *et al.*, 2013).

Muitas estratégias tem sido propostas para superar a função da barreira para o aumento da permeabilidade de substâncias que são aplicadas sob a pele. As microemulsões são abordagens úteis e são capazes de fornecer drogas através da pele mais do que substâncias simples em dosagens convencionais. Além de possuírem uma boa aparência e serem termodinamicamente estáveis, as microemulsões podem aumentar a permeação cutânea, por serem de tamanhos reduzidos (BOONME, 2007).

Nesse contexto o presente estudo teve como proposta obter um *peeling* em microemulsão contendo ácido retinóico a 1%, caracterizá-lo, testá-lo quanto a sua permeação cutânea e avaliá-lo quanto sua eficácia clínica em pacientes portadoras de melasma.

2 Revisão de Literatura

2.1 ANATOMIA E FISIOLOGIA DA PELE

A pele ou *cúti*s é o manto de revestimento do organismo, indispensável à vida e que isola os componentes orgânicos do meio exterior. Corresponde ao maior órgão do corpo humano e abrange cerca de 16% do peso corporal. Constitui-se em complexa estrutura de tecidos de várias naturezas, dispostos e inter-relacionados de modo a adequar-se, harmonicamente, ao desempenho de suas funções. É responsável por funções cruciais a vida como termorregulação, percepção, vigilância imunológica, secreção e proteção do indivíduo contra agressões exógenas, de natureza química, física ou biológica, e contra a perda de água e de proteínas para o exterior (SAMPAIO; RIVITTI, 2007).

É composta por três camadas interdependentes: epiderme, derme e tecido subcutâneo (panículo adiposo). A epiderme, mais externa, é formada por uma disposição ordenada de células denominadas queratinócitos, cuja função básica é sintetizar queratina, uma proteína filamentar que tem função protetora; a derme é a camada intermediária, cujo principal constituinte é a proteína colágeno de estrutura fibrilar; a derme localiza-se sobre o panículo adiposo, que é composta por lóbulos de lipócitos (JAMES *et al.*, 2007).

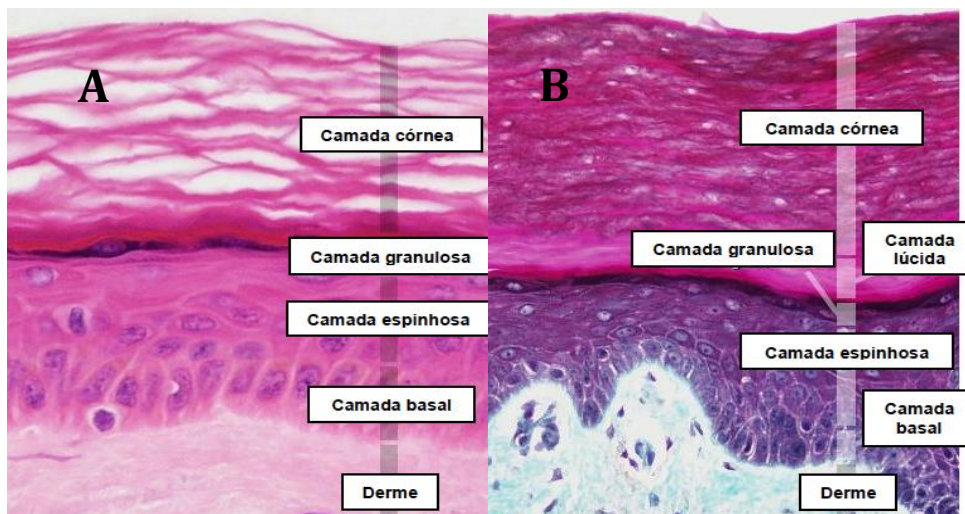
2.1.1 A epiderme

A epiderme é constituída por epitélio escamoso estratificado de origem ectodérmica que continuamente renova-se. Possui espessura que varia de 0,04 mm até 1,5 mm de acordo com as variações topográficas. A maioria das células da epiderme são queratinócitos, que constitui pelo menos 80% da população total de células da epiderme, e são organizadas em quatro camadas e classificadas conforme sua posição ou propriedades estruturais das células nela incluídas (FITZPATRICK; FREEDBERG *et al.*, 2005). Os queratinócitos são nucleados desde a camada basal até a granular (BARONI *et al.*, 2012).

As características de cada camada refletem as propriedades mitóticas e sintéticas de queratinócitos e seu estado de diferenciação. São elas, a camada basal ou germinativa, a camada espinhosa ou de *Malpighi*, a granulosa e a córnea, conforme figura 1. O tempo de maturação de uma célula basal até atingir a camada córnea é de aproximadamente 26 dias (FITZPATRICK; FREEDBERG *et al.*, 2005). O processo de maturação, desde a camada

germinativa, através das várias camadas da epiderme, é complexo e multifatorial e é influenciado por fatores genéticos, sistêmicos e ambientais. Na diferenciação epidérmica, há também importante participação da derme através de inter-relações entre fibroblastos e queratinócitos (SAMPAIO; RIVITTII, 2007). Cada camada da epiderme é definida pela posição, forma, morfologia e estado de diferenciação dos queratinócitos (LEONARDI, 2004).

Figura 1. Corte histológico de pele humana. A - camadas histológicas da pele fina (coloração Hematoxilina Eosina) e B - camadas histológicas de pele espessa (coloração tricrômico). Aumento 400 X



Fonte: Adaptado de Slomianka (2009)

A barreira física é constituída principalmente pelo estrato córneo, mas também pelas junções de célula-célula e associações de proteínas do citoesqueleto nas camadas mais inferiores. A barreira química e bioquímica consiste em lipídios, ácidos, enzimas hidrolíticas, peptídeos antimicrobianos e macrófagos (BARONI *et al.*, 2012).

A base da epiderme é sinuosa, formada por cones epidérmicos que se projetam na derme e encontram-se intercalados com projeções digitiformes da derme denominadas papilas. Essa disposição confere grande adesão da epiderme com a derme e maior superfície de contato entre elas, permitindo uma área eficaz de troca entre esses dois componentes, já que a epiderme é avascular e sua nutrição deriva dos capilares dérmicos. Intercalados entre os queratinócitos, há outros tipos celulares, melanócitos, células de Langerhans e células de Merkel (FITZPATRICK *et al.*, 2005).

A camada basal é a mais profunda, constituída por queratinócitos basais e melanócitos. Apresenta atividade mitótica, sendo que os queratinócitos resultantes da divisão celular sofrem diferenciação à medida que são direcionados para as camadas superiores, sintetizando

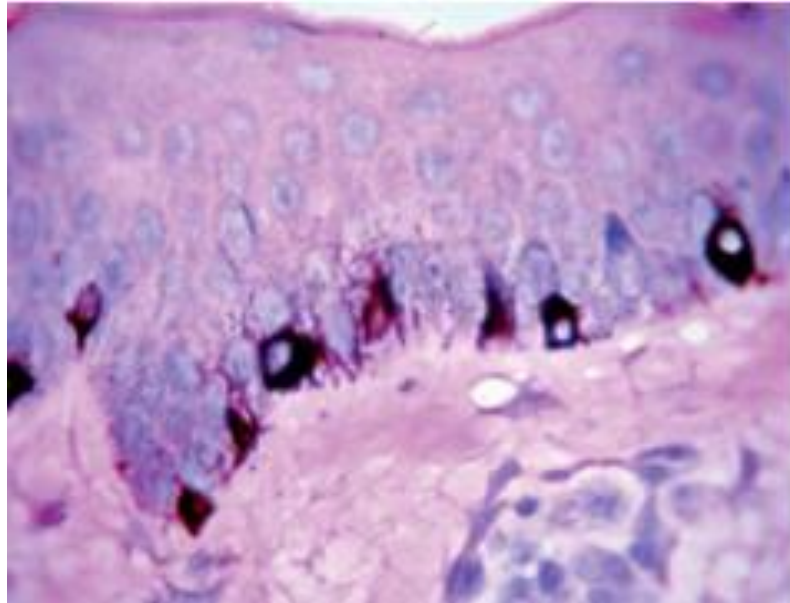
quantidade crescente de queratina no seu citoplasma (LEONARDI, 2004). Abaixo da camada basal existe uma fina estrutura constituída por mucopolissacarídeos neutros, a membrana basal. As células basais estão unidas entre si e às células espinhosas suprajacentes, e estas entre si através das pontes intercelulares, chamadas desmossomas. Ao nível da camada basal, há apenas uma placa de aderência ligando a membrana plasmática das células basais à membrana basal; essas estruturas de adesão são chamadas hemidesmossomos. Os melanócitos são células que se relacionam com as células espinhosas suprajacentes, que conjuntamente aos queratinócitos, constituem as unidades pigmento melânicas da pele, e constituem 5 a 10% da população celular basal, onde pode ser demonstrado na figura 2 (BARONI; BUOMMINO *et al.*, 2012).

Os melanócitos são células dendríticas produtoras de pigmento e são derivados da crista neural. Após o nascimento, podem ser encontrados nos olhos, no sistema nervoso central, no ouvido, nas mucosas e na pele. Seus dendritos se estendem por longa distância dentro da epiderme, e qualquer um dos melanócitos, portanto, está em contato com um grande número de queratinócitos numa proporção de 1 para 36 (JAMES *et al.*, 2007).

Os melanócitos contêm em seu citoplasma, organelas especializadas denominadas melanossomas, que produzem melanina através de uma série de reações enzimáticas mediada por interação com receptores e estimulação de hormônios. O tamanho dos melanossomas é determinado geneticamente; peles negras contêm tipicamente melanossomas maiores do que peles claras (FITZPATRICK *et al.*, 2005). Apenas os melanócitos da epiderme e do folículo piloso são capazes de produzir melanina e transferí-la aos queratinócitos.

Após a síntese completa da melanina, os melanossomas, repletos desse pigmento, são injetados no interior dos queratinócitos, da unidade epidérmico-melânica correspondente, através dos prolongamentos dendríticos dos melanócitos (atividade citocrínica). Uma vez no interior dos queratinócitos, os melanossomas tendem a distribuir-se no citoplasma, sobre a parte superior do núcleo, de forma a protegê-lo das radiações ultravioleta (HEARING, 2005).

Figura 2. Disposição dos melanócitos na epiderme, demonstrando discreta projeção em relação á derme



Fonte: Miot *et al.* (2009).

Em humanos, a pigmentação da pele e dos cabelos é dependente da atividade melanogênica, dentro dos melanócitos, da taxa de síntese de melanina, bem como do tamanho, número, composição e distribuição dos melanosomas, além da natureza química da melanina que elas contêm (SULAIMON; KITCHELL, 2003).

A melanina tem importante função como barreira à penetração da radiação ultravioleta , exercendo proteção contra os efeitos indesejáveis da radiação solar.

A camada espinhosa é formada por células escamosas, que têm configuração poliédrica, formada por cinco a dez camadas que se achatam progressivamente em direção a superfície. As células espinhosas estão unidas mecanicamente entre si e às células basais subjacentes por meio de pontes intercelulares denominadas desmossomos, estruturas complexas que conferem à pele resistência a traumas mecânicos (SAMPAIO; RIVITTII, 2007).

A camada granulosa é formada por uma a três camadas achatadas de queratinócitos com formato losangular e citoplasma repleto de grânulos de querato-hialina, que dá origem à filagrina, importante componente do envelope das células corneificadas. Na região palmoplantar, há uma camada adicional entre as camadas granulosa e córnea denominada estrato lúcido. Suas células são anucleadas e formam uma faixa clara e homogênea, fortemente coradas pela eosina à microscopia óptica (BURNS *et al.*, 2010). No estrato

granuloso as células são transformadas em escamas ou corneócitos que formam a camada córnea (ASZTERBAUM *et al.*, 1992).

A camada córnea é a camada mais superficial da pele. Sua espessura é variável de acordo com a topografia anatômica, sendo maior nas palmas e plantas. O processo de maturação dos queratinócitos está completo no estrato córneo, apresentando células anucleadas com um sistema de filamentos de queratina imerso em uma matriz contínua circundada por membrana celular espessada. É um estrato semi-permeável, hidrófobo, atuando como barreira contra perda de água das camadas epidérmicas e impede a entrada de agentes tóxicos e micro-organismos. Atua também como escudo protetor das camadas inferiores da epiderme e dos efeitos nocivos da RUV (JAMES *et al.*, 2007; SAMPAIO; RIVITTI, 2007).

2.1.2 Derme

A derme é a camada situada logo abaixo da epiderme, formada por denso estroma fibroelástico de tecido conectivo em meio a uma substância fundamental, que serve de suporte para extensas redes vasculares e nervosas, e anexos cutâneos que derivam da epiderme. Os principais componentes da derme incluem o colágeno (70 a 80%) para resistência, a elastina (1 a 3%) para elasticidade e os proteoglicanos, que constituem a substância amorfa em torno das fibras colágenas e elástica (JAMES *et al.*, 2007; SAMPAIO; RIVITTI, 2007). Sua espessura varia de 1 a 4 mm (SILVER *et al.*, 2001).

A derme é constituída por duas camadas, de limites pouco distintos: a papilar mais superficial, e a reticular, mais profunda. A derme papilar é mais delgada, constituída por tecido conjuntivo frouxo que forma papilas dérmicas (Junqueira e Carneiro, 2008). Contém numerosos fibroblastos e abundante substância fundamental. É constituída por tecido conjuntivo frouxo com fibras colágenas tipo III, fibras elásticas e fibrilas de colágeno tipo IV. Essas últimas ligam a epiderme à derme (GARTNER; HIATT, 2007). A camada reticular é mais espessa, contém tecido conjuntivo denso não modelado, redes de fibras elásticas entrelaçadas à fibras colágenas tipo I; essas são mais espessas e dipostas, em sua maior parte, paralelamente a epiderme (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

A derme apresenta também população mista de células, incluindo fibroblastos, fibrócitos, macrófagos teciduais, melanóforos, mastócitos e leucócitos sanguíneos (como neutrófilos, eosinófilos, linfócitos, monócitos e plasmócitos) (JAMES *et al.*, 2007).

2.1.3 Anexos cutâneos

Em relação aos anexos cutâneos, a pele possui a unidade pilossebácea, as glândulas sudoríparas apócrinas, écrinas e as unhas. A unidade pilossebácea é encontrada sobre toda a superfície da pele, exceto nas regiões palmoplantares, nos lábios e na glândula. Compõem-se de uma haste pilosa circundada por bainha epitelial contínua com a epiderme, uma glândula sebácea, musculatura lisa piloerectora e, em certas regiões corpóreas, ducto excretor de uma glândula apócrina que desemboca acima da glândula sebácea. Na porção inferior do folículo piloso, há uma expansão chamada de bulbo piloso, que contém a matriz do pelo. Nela ocorre a atividade mitótica do pelo e encontram-se os melanócitos, sendo, portanto, responsável pelo crescimento e pigmentação do pêlo. Existem dois tipos de pelo: o lanugo ou pelo fetal, que são curtos, delicados e claros, idênticos aos pelos velus do adulto; e o terminal, mais grosso, escuro e grande, encontrado nas axilas, cabelos, barba e região púbica. As glândulas sebáceas são glândulas holócrinas, cuja função é produzir o sebo, que é uma combinação de ésteres de cera, esqualeno, ésteres de colesterol e triglicérides. Ocorrem por toda a pele, exceto na região palmoplantar, e seu controle é hormonal, especialmente andrógeno (SAMPAIO; RIVITTII, 2007).

As glândulas sudoríparas écrinas derivam da epiderme e não pertencem à unidade pilossebácea. Cada glândula é um túbulo simples com um segmento secretor enovelado situado na derme e um ducto reto que se estende até a superfície da pele. São inervadas por fibras simpáticas, mas têm a acetilcolina como mediador. Localizam-se em toda a superfície cutânea, exceto nas áreas de pele modificada, como os lábios, os leitos ungueais e a glândula. Participam da termorregulação, produzindo suor hipotônico que evapora durante o calor ou estresse emocional. As glândulas sudoríparas apócrinas derivam da epiderme e fazem parte da unidade pilossebácea, desembocando, em geral, nos folículos pilosos. Localizam-se nas axilas, escroto, prepúcio, pequenos lábios, mamilos e região perineal, além de, modificadamente, nas pálpebras (glândulas de Moll), mamas (glândulas mamárias) e conduto auditivo externo (glândulas ceruminosas). Produzem secreção viscosa e leitosa constituída de proteínas, carboidratos, amônio e ácidos graxos; é inodora quando atinge a superfície, mas as bactérias a decompõem, causando odor desagradável. São inervadas por fibras nervosas simpáticas e estão sob o controle dos hormônios sexuais. Sua função provavelmente representa vestígios de espécies inferiores, cuja comunicação sexual se dá por meio de substâncias químicas (BURNS *et al.*, 2010).

As unhas são lâminas queratinizadas que recobrem a última falange dos dedos. Ela

possui quatro partes: a posterior ou raiz, localizada sobre a dobra da pele; a lâmina, que está aderente ao leito ungueal na porção inferior; as dobras laterais e a borda livre. Sua espessura varia de 0,5 a 0,75 mm, e o crescimento é de 0,1 mm por dia (SAMPAIO; RIVITTI, 2007).

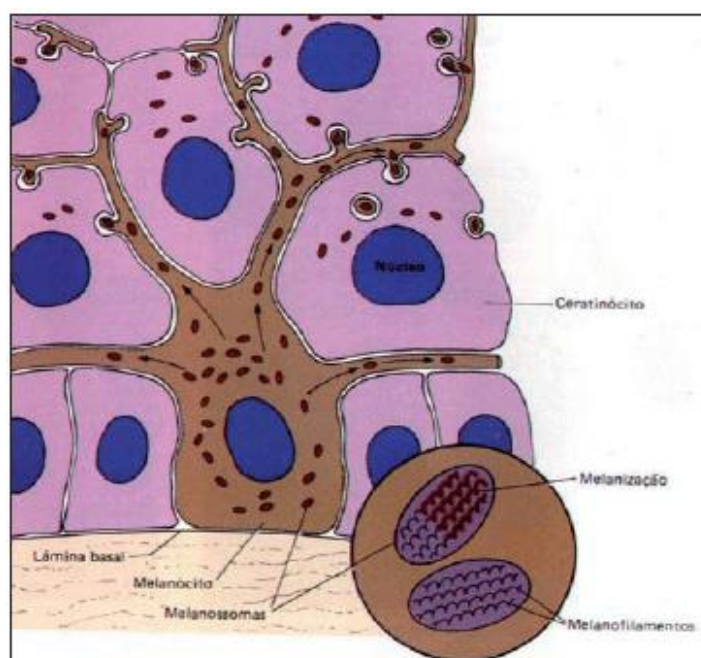
2.1.4 Tecido subcutâneo

A hipoderme ou tecido celular subcutâneo é a camada mais profunda da pele, de espessura variável, composta exclusivamente de tecido adiposo, formando lóbulos subdivididos por traves conjuntivo-vasculares. Funcionalmente, além de depósito nutritivo de reserva, participa no isolamento térmico e na proteção mecânica do organismo, além de facilitar a motilidade da pele em relação às estruturas subjacentes (BURNS *et al.*, 2010).

2.1.5 Melanogênese

Melanogênese é um processo complexo, com diferentes estágios na qual o pigmento melanina é produzido nos melanossomas pelos melanócitos, conforme demonstrado na figura 3 (VIDEIRA; MOURA; MAGINA, 2013). A melanina é o principal pigmento biológico envolvido na pigmentação cutânea, sendo determinante nas diferenças de coloração da pele (FITZPATRICK *et al.*, 2005).

Figura 3. Esquema de distribuição de melanina na epiderme, através dos melanossomos



Fonte: MIOT *et al.* (2009)

Todos os tipos de melanina são derivados da hidroxilação do aminoácido tirosina. São produzidos dois tipos distintos de melanina, a eumelanina, com pigmento preto/castanho e a feomelanina com cores de vermelho ao amarelo, onde ambas contêm enxofre. A estrutura do polímero de melanina, no entanto, permanece incerta (MIOT *et al.*, 2009).

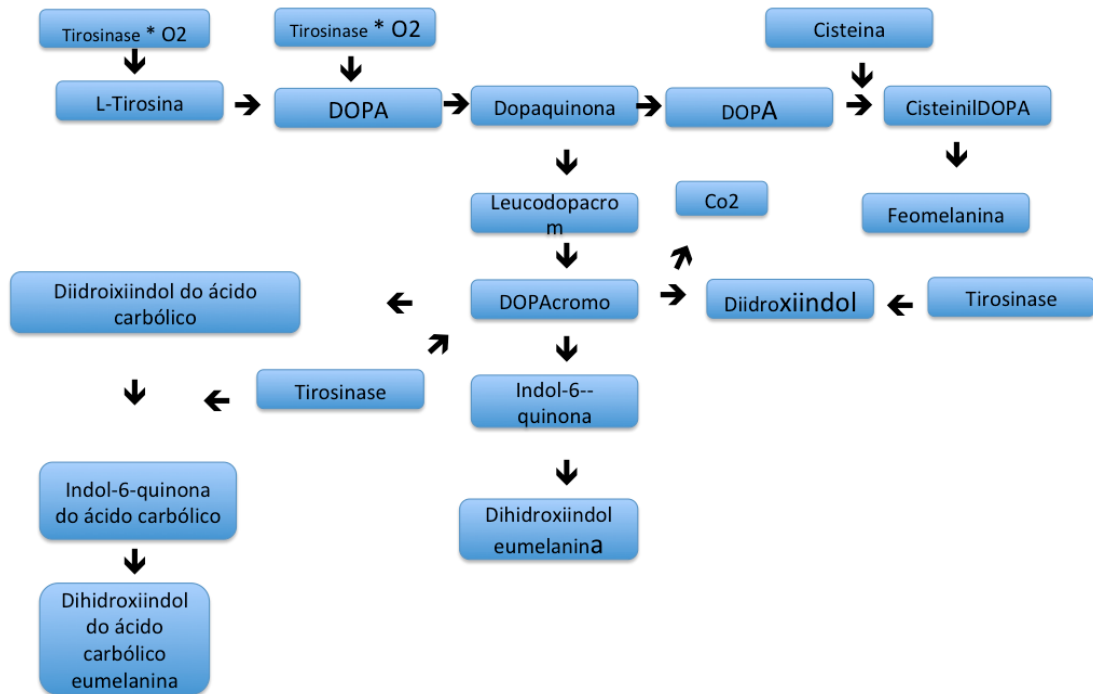
O elemento inicial na biossíntese da melanina é a tirosina, um aminoácido essencial. A tirosina sofre atuação química da tirosinase, um complexo enzimático cúprico proteico, sintetizado nos ribossomos e transferido, através do retículo endoplasmático para o aparelho de Golgi, sendo aglomerado em unidades envoltas por membrana, ou seja, os melanossomos (MIOT *et al.*, 2009).

Os três membros da família relacionada à tirosinase (tirosinase, Tyrp 1 tirosinase relacionada a proteína 1 e DCT – dopacromo tautomerase) estão envolvidos no processo de melanogênese, levando a produção de eumelanina ou feomelanina (CAU *et al.*, 2006).

A tirosinase é uma glicoproteína localizada na membrana do melanossomo, e possui um domínio que contém uma região catalítica (cerca de 90% da proteína) seguido de um domínio transmembranar e um curto domínio citoplasmático composto por 30 aminoácidos. Resíduos de histidina estão presentes na região catalítica e íons cobre são necessários para a sua atividade. Conforme esquematizado na figura 4, a tirosinase catalisa as duas primeiras etapas da produção da melanina: a hidroxilação de L-tirosina em L-dioxifenilalanina (L-DOPA) e subsequentemente a oxidação para o seu correspondente quinona, L-Dopaquinona. Seguindo a formação da dopaquinona, o caminho para a síntese de melanina é dividida em produção de eumelanina e a feomelanina (GILLBRO; OLSSON, 2011). A partir desse momento, a presença ou ausência de cisteína determina a via da reação para a síntese de eumelanina ou feomelanina (ITO, 2003). Na ausência de cisteína a dopaquinona é convertida em leucodopacromo e esta por sua vez em dopacromo. O dopacromo é espontaneamente convertido em 5,6-dihidroxi-indole ou é enzimaticamente convertida em ácido 5,6-dihidroxi-indole-2-carboxílico via conversão enzimática por dopacromo tautomerase (DCT), também referida como a tirosina relacionada à proteína 2 (TRP-2). Por fim, a polimerização das índoles e quinonas leva a formação de eumelanina (GILLBRO; OLSSON, 2011). A tirosinase relacionada à proteína 1 (Tyrp-1) parece estar envolvida na catalização da 5,6 diidroxiindol-2-cido carboxílico a eumelanina (MIOT *et al.*, 2009). A via para a formação de feomelanina está baseada no fato de que a L-dopaquinona é dependente da presença de cisteína, que é transportada ativamente através da membrana do melanossomo. A cisteína reage com L-dopaquinona para formar cisteinil-dopa que é convertido em quinoleimina, alanina-hidroxil

diidrobentotazina e se polimeriza a feomelanina (GILLBRO; OLSSON, 2011).

Figura 4. Esquema demonstrando a produção de melanina



Sendo assim, a melanogênese apresenta três passos distintos e importantes: passo inicial é a produção de cisteinildopa, que continua tão intensa quanto for a quantidade de cisteína presente; o segundo passo é a oxidação da cisteinildopa para formar feomelanina - processo dependente da quantidade de cisteinildopa presente; o terceiro (e último) passo é a produção de eumelanina, que somente tem início após a maioria da cisteinildopa ser depletada. Entretanto, parece que a eumelanina se deposita sobre a feomelanina pré-formada e a relação entre feo e eumelanina é determinada pela atividade da tirosinase e disponibilidade de cisteína (ITO, 2003).

A eumelanina absorve e dispersa a luz ultravioleta, atenuando sua penetração na pele e reduzindo os efeitos nocivos do sol (WAGNER *et al.*, 2002). A feomelanina, por outro lado, tem um grande potencial em gerar radicais livres, em resposta às radiações ultravioleta, que são capazes de causar danos ao DNA, dessa forma, contribuir para os efeitos fototóxicos da radiação ultravioleta (THODY; GRAHAM, 1998).

Melanócitos individuais tipicamente sintetizam eumelaninas e feomelaninas, com a taxa das duas sendo determinada por um balanço de variáveis, incluindo expressão de

enzimas pigmentares e a disponibilidade da tirosinase e de agentes redutores específicos na célula. A melanina total da pele resulta de uma mistura de monômeros de feomelanina e eumelanina e a proporção entre as duas determina a expressão fenotípica final da cor da pele e cabelos (LIN; FISHER, 2007).

2.2 CLASSIFICAÇÃO DA PELE

Fitzpatrick e Mosher (1983) classificaram a cor natural da pele como: i) constitutiva, isto é, controlada por fatores genéticos que atuam em todas as etapas da melanogênese e fornecem características específicas aos melanossomas através dos genes de pigmentação e não submetidas a radiação UV, ou então ii) facultativa, é a cor da pele mais intensa, dependendo da exposição ao sol, processo de envelhecimento e influências hormonais. A esse respeito, Boissy (2003) explica que fatores externos e internos ao corpo controlam a produção de melanina, sendo que as forças de inibição e estimulação atuam constantemente.

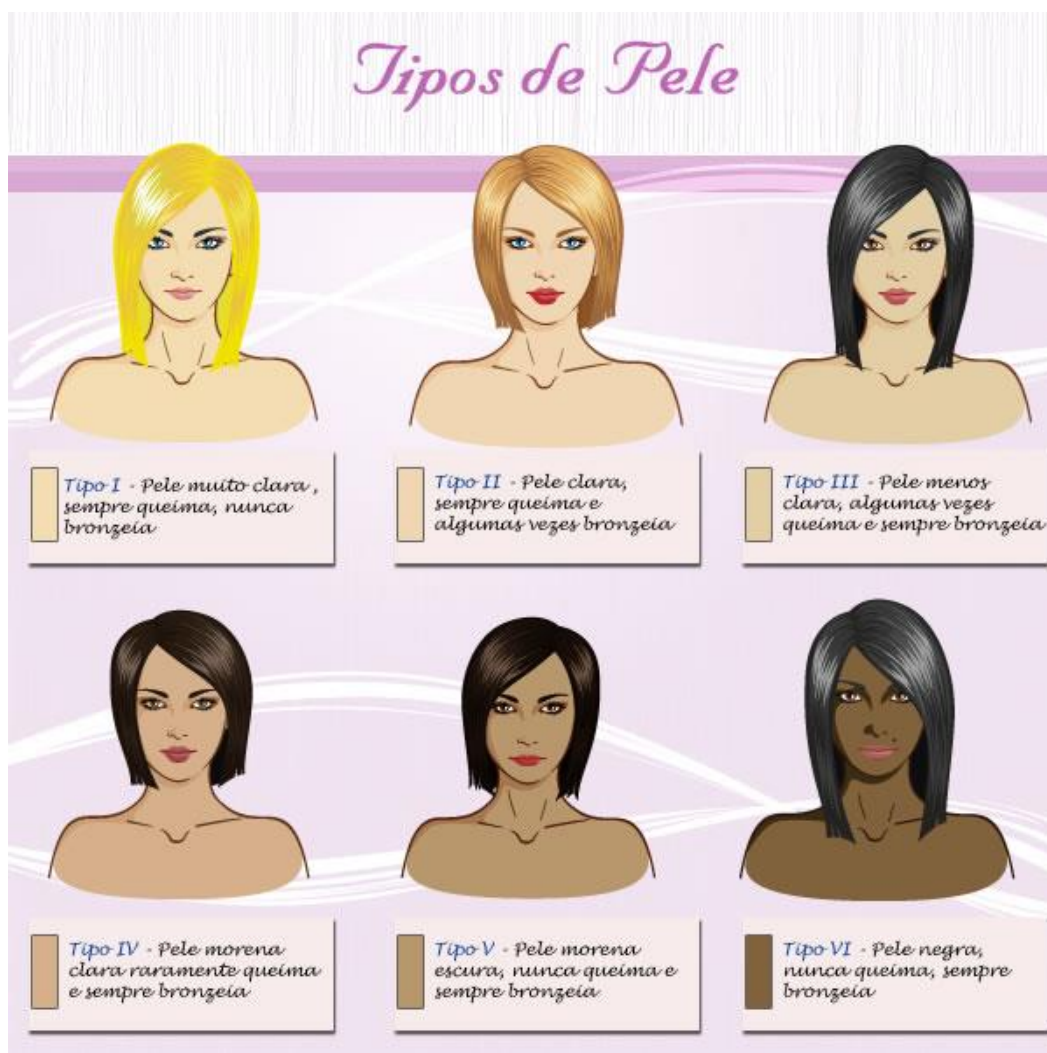
Dois componentes de pigmentação da pele contribuem com coloração que a pele irá adquirir. Inicialmente, a cor constitutiva da pele é a melanina básica herdada geneticamente, sem nenhum efeito de radiação solar. A síntese desse tipo de pigmentação é controlada pelas proteínas do gene da tirosinase que regulam o tipo de melanina sintetizada. Em segundo lugar, a cor facultativa da pele é aquela que se pode induzir e resulta da exposição solar e inclui o bronzeamento imediato e o bronzeamento tardio. Essa cor facultativa é reversível e diminui até o nível da cor constitutiva da pele.

Em 1976, Fitzpatrick classificou a pele humana em seis tipos de acordo com o fototipo e etnia, variando de I (pele mais branca) ao tipo VI (pele negra), conforme apresentado no quadro 1 e figura 5 (FITZPATRICK; MOSHER, 1983).

Quadro 1. Classificação dos fototipos de pele proposta por Fitzpatrick

Fototipos	Descrição	Sensibilidade ao Sol
I – Branca	Queima com facilidade, nunca bronzeia	Muito sensível
II – Branca	Queima com facilidade, bronzeia muito pouco	Sensível
III - Morena Clara	Queima moderadamente, bronzeia moderadamente	Normal
IV - Morena Moderada	Queima pouco, bronzeia com facilidade	Normal
V - Morena Escura	Queima raramente, bronzeia bastante	Pouco sensível
VI – Negra	Nunca queima, totalmente pigmentada	Insensível

Fonte: Fitzpatrick e Mosher (1983)

Figura 5. Tipo de pele de Fitzpatrick

Arte: Willen Athayde/Portal Amazônia

2.3 MELASMA

Melasma é um distúrbio comum de hiperpigmentação, caracterizado por hiperpigmentação da pele em áreas fotoexpostas. É encontrado em uma parcela significativa da população especialmente em mulheres, e em todos os grupos raciais, mas, com maior prevalência em fototipos de Fitzpatrick mais altos. Está associado a predisposição genética, desequilíbrio hormonal e fotodano (SAFOURY *et al.*, 2009).

O melasma é caracterizado por máculas de distribuição simétrica com bordas irregulares, porém bem definidas, policíclicas ou arciformes. A coloração varia do marrom claro ao mais escuro ou acinzentado, e localizam-se especialmente na região frontal, áreas malaras, região supra labial e queixo, podendo ocorrer no V do decote e na face extensora dos membros superiores (SANCHEZ *et al.*, 1981).

Em relação à epidemiologia, existem poucos estudos que abordam esse tema. Em um estudo randomizado envolvendo auto relato de melasma em uma população hispânica do sexo feminino no Texas, Werling *et al.* (2002) observaram uma prevalência de 8,8%, e com um adicional de 4% da doença no passado. Em outro estudo no sudeste da Ásia, foi relatada uma prevalência de 40% em mulheres e 20% em homens, porém, foram pacientes de uma clínica de dermatologia, indicando um viés na apuração (SIVAYATHORN, 1995). Em um estudo multicêntrico envolvendo mulheres de nove países, foi evidenciado que peles com fototipos III e IV são mais afetadas. Também foi observado que 41% dos casos tinham início após gestação, mas anterior ao período de menopausa. 25% das pacientes que fazem uso de anticoncepcionais tiveram o início do melasma após o início dos contraceptivos. Apenas 8% apresentavam resolução espontânea (SHETH; PANDYA, 2011a).

A etiologia exata do melasma ainda permanece desconhecida, porém vários fatores de risco são conhecidos. São relatados a predisposição genética, exposição à luz ultravioleta, a gravidez e uso de hormônios exógenos, ou seja, contraceptivos orais e terapia de reposição hormonal. Entre os fatores estudados, a exposição a radiação ultravioleta (UV) é considerada por vários autores como o mais relevante. Uma razão para isso é que a radiação UV pode induzir a proliferação de melanócitos, migração e melanogênese. Além disso, ainda pode levar a produção de múltiplas citocinas, incluindo a interleucina-1, endotelina-1, e hormônios como o alfa-MSH e o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), que por sua vez induzem a melanogênese através do aumento da atividade da tirosinase. Vários estudos tem mostrado que a luz UVA, UVB, e também o espectro visível podem induzir a pigmentação da pele (SHETH; PANDYA, 2011a).

A influência hormonal para o melasma ainda não está claramente elucidada. Muitas pacientes notam o aparecimento ou agravamento da doença com a gravidez ou uso de contraceptivos orais. Muitos estudos tem procurado esclarecer o papel de hormônios específicos na patogênese do melasma. Lieberman e Moy (2008) revelaram através de um estudo com imuno-histoquímica que havia um aumento da expressão dos receptores de estrogênio em pele com melasma em comparação com pele normal nas proximidades. Um outro estudo mostrou que melanócitos de pele normal quando incubados com ACTH, MSH, LH e FSH mostravam um aumento no seu tamanho e uma maior produção de tirosinase. A incubação com estriol, estradiol e progesterona não levou a um aumento na produção da tirosinase (MAEDA *et al.*, 1996; BROWN *et al.*, 2007; LIEBERMAN; MOY, 2008).

Achados imuno-histoquímicos sugerem que uma forte imunorreatividade de α -MSH na pele lesada de melasma é um dos maiores fatores na gênese dessa doença. A relação entre área fotoexposta e a maior imunorreatividade de α -MSH na pele lesada ainda não foi elucidada. Entretanto, a existência de um caminho sinalizador ainda desconhecido, com aumento de expressão de MC1-R, que pode desempenhar um papel significativo nessa maior imunorreatividade ao α -MSH ainda não foi investigado. Há evidências de uma forte expressão de antígeno α -MSH nos queratinócitos de pele lesada no melasma, sugerindo que α -MSH desempenha um papel chave na hiperpigmentação de pele com melasma (FUNASAKA *et al.*, 1998; KANG *et al.*, 2002).

O melasma também pode ter um componente vascular em sua patogênese. Kim *et al.* (2007) encontraram em biopsias de pele de pacientes com melasma uma maior expressão de fatores de crescimento endotelial vascular em queratinócitos, quando comparadas a pele perilesional.

Outros fatores de risco menos comumente relatados incluem distúrbios da tireóide, medicamentos fototóxicos e cosméticos (LUTFI *et al.*, 1985).

A principal estrutura implicada nos melasmas é o melanócito que é a célula responsável pela produção de melanina. Os melanócitos são mais secretores e neles os melanossomas são maiores, mais densos e mais alongados quando comparados com áreas da pele que não possuem melasma. São células com “memória”, ou seja, sempre que estimuladas, aumentam o metabolismo, exacerbando a função para a qual estão diferenciadas. A produção de melanina é mais intensa nos melasmas, contribuindo para a distribuição anormal e exagerada da

melanina pela epiderme. À medida que os melanócitos tipo-específicos são estimulados, aumentam a produção de melanina. Esse excesso de pigmento depositado nas células basais, ascende pelo estrato epidérmico e, gradualmente, é eliminado com os queratinócitos. Nos melasmas mais antigos, há incontinência pigmentar. Esse pigmento que atinge a derme não é encontrado isoladamente, pois é imediatamente fagocitado por melanófagos que podem ser visualizados ao redor dos plexos vasculares da derme superficial, por onde são removidos (HANDEL; MIOT; MIOT, 2014).

2.3.1 Diagnóstico

O diagnóstico do melasma é fundamentalmente clínico e não impõe maiores dificuldades ao dermatologista (HANDEL; MIOT; MIOT, 2014).

De acordo com a histopatologia, o melasma pode ser classificado em epidérmico, onde ocorre uma maior deposição de melanina principalmente nas camadas basais e suprabasais; dérmico na qual há presença de melanófagos na derme; e misto onde há deposição de melanina na epiderme e derme. Há controvérsias se ocorre ou não aumento do número de melanócitos, mas há maior número de melanosomas nos dendritos dos mesmos (GRIMES *et al.*, 2005).

Vários padrões clínicos foram descritos, mas muitos pacientes apresentam uma mistura de padrões. O padrão centrofacial é o mais comum e consiste em manchas localizadas na região frontal, malar, supralabial, nasal e queixo. O padrão malar é caracterizado por manchas na região malar e nasal e o padrão mandíbula consiste em manchas localizadas no ramo da mandíbula (RIGOPOULOS *et al.*, 2007).

O melasma ainda pode ser classificado com base no exame com a lâmpada de Wood (emissor de luz ultra-violeta que permite uma visão de anomalias como manchas, dermatoses e grau de hidratação que ainda não são vistas a olho nú), que auxilia na identificação da localização do pigmento. As manchas que são reforçadas quando vistas com a lâmpada de Wood implicam em um aumento do teor de melanina epidérmica enquanto que aquelas que não são reforçadas implicam em um aumento da melanina na derme (BALL AREFIEV; HANTASH, 2012). Nos melasmas epidérmicos, ou seja, quando o pigmento se deposita nas camadas mais superiores da pele, quando vistos pela lâmpada de wood ocorre acentuação da coloração a medida que a luz é absorvida pelo excesso de melanina. Nos melasmas dérmicos, ou seja, quando o pigmento está profundo, a acentuação da mancha não é notada, e nos

mistos, na qual o depósito de melanina ocorre tanto na epiderme quanto na derme, o aumento da coloração é visto apenas em alguns locais (SURGICAL, 2009).

O diagnóstico diferencial pode ser feito com hiperpigmentação pós inflamatória, hiperpigmentação por uso de drogas como amiodarona e tetraciclinas, efélides, lentigo solar, líquen plano actínico, acantose nigricans facial e menos frequentemente, nevo de Ota e Ito. Em alguns casos essas patologias podem coexistir com o melasma, e a distinção pode ser feita através de história clínica, exame da pele com a lâmpada de Wood e em alguns casos biópsia de pele (SHETH; PANDYA, 2011a).

2.3.2 Tratamento do melasma

O tratamento do melasma é geralmente insatisfatório, pela grande recorrência das lesões e pela ausência de uma alternativa de clareamento definitivo. Estudos clínicos controlados indicam os fotoprotetores e uso de clareadores como as medidas de primeira linha no tratamento do melasma (MIOT *et al.*, 2009).

O tratamento do melasma inclui, fotoproteção, formulações tópicas, *peelings* químicos, *lasers* e fontes de luz. Nenhuma terapia isolada se mostrou benéfica para o tratamento de todos os tipos de melasma, mas a combinação de modalidades de tratamento podem ser utilizadas para a otimização do tratamento (SHETH; PANDYA, 2011a).

Vazquez e Sanchez (1983), através de um estudo controlado, randomizado, duplo-cego, avaliando o uso de fotoprotetor de alto espectro *versus* placebo em 53 pacientes confirmaram o impacto positivo do uso do fotoprotetor no tratamento do melasma.

Em relação às formulações tópicas utilizadas no tratamento do melasma, a hidroquinona é uma das medicações usadas. A sua eficácia tanto sozinha ou em combinação com outros agentes é bem estudada e bem estabelecida. A hidroquinona atua através da inibição da tirosinase, possivelmente ligando-se à enzima ou por interação com moléculas de cobre no sítio ativo da enzima, que conduz à formação de alteração no melanossoma e talvez na inibição da síntese de DNA e RNA (ITO, 2003).

Vázquez e Sánchez (1983), observaram efeito favorável (em até 88% dos casos tratados) de soluções hidro-alcoólicas de hidroquinona a 3%. Em altas concentrações (superiores a 5%), ou pelo uso prolongado, pode ocasionar escurecimento da pele, principalmente nas áreas expostas, por ocronose (SHETH; PANDYA, 2011a). Outros efeitos

colaterais incluem dermatite de contato alérgica ou por irritante primário. Pode haver a hipopigmentação persistente, também conhecida como leucodermia em confete, após o uso de altas concentrações de hidroquinona (RIGOPOULOS *et al.*, 2007).

O Mequinol (4-hidroxianisol), outro derivado fenólico inibidor reversível da tirosinase, tem se mostrado efetivo para o tratamento do melasma, especialmente quando associado à tretinoína, em concentrações de 2% e 0,01%, respectivamente (FLEISCHER *et al.*, 2000).

O ácido azelaico é um ácido derivado do *Pityrosporum ovale* e age como um inibidor fraco e reversível da tirosinase. Outro mecanismo de ação inclui a diminuição da produção de radicais livres (NAZZARO-PORRO, 1987; KIM; UYAMA, 2005).

O Arbutin, princípio ativo da *Uva ursi*, também encontrado no mirtilo, vários tipos de pêras e em outras plantas, tem sido incorporado a diversos cosméticos clareadores. Atua por inibição reversível da tirosinase e por seus efeitos antioxidantes. Tem sido usado em concentrações de até 3%, pois concentrações maiores podem causar hiperpigmentação paradoxal (DRAELOS, 2007; PICARDO; CARRERA, 2007).

O ácido kójico tem sido indicado como uma boa alternativa para o tratamento dos melasmas. Atua inibindo de forma reversível a tirosinase e, por seu caráter ácido, apresenta sinergismo com a hidroquinona, alfa-hidroxiácidos e a tretinoína. É indicado em concentrações entre 2% e 4%, para uso cotidiano e, em esfoliações, até 20 % (DRAELOS, 2007).

O ácido ascórbico, também conhecido como vitamina C, pode interagir com o cobre no sítio da tirosinase, diminuindo a dopaquinona. No entanto, é uma molécula instável, na qual é rapidamente oxidada e por isso, não deve ser usada sozinha. Normalmente é combinado com extrato de licorice e soja para aumentar sua eficácia (DRAELOS, 2007).

O extrato de licorice inibe a tirosinase por limitar o primeiro passo da oxidação. Também possui propriedades antiinflamatórias (KIM; UYAMA, 2005).

Os retinóides tópicos têm sido utilizados com sucesso no tratamento do melasma. O mecanismo de ação envolve o aumento do turnover de queratinócitos, diminuição da transferência de melanossomas e permitem uma maior penetração de outros ativos (ROMERO *et al.*, 1994). Em um estudo randomizado e controlado, foi utilizado creme de tretinoína 0,1% em comparação com veículo aplicado todas as noites na face de mulheres brancas com melasma durante um período de 40 semanas. Observou-se uma melhora em 68% dos pacientes tratados com tretinoína em comparação com o veículo. Todas as pacientes

usaram fotoproteção regular. Na histologia das lesões tratadas foi confirmada uma média de 36% de diminuição do pigmento na pele tratada com ácido retinóico comparado com um aumento de 50% no pigmento epidérmico em relação ao veículo. Os efeitos colaterais mais comuns foram eritema e descamação, vistos em 88% dos indivíduos tratados (GRIFFITHS *et al.*, 1993).

O gel de isotretinoína tópica a 0,05% e fotoprotetor também foi avaliado no tratamento do melasma em pacientes tailandeses. No entanto, o gel de isotretinoína tópica não mostrou aumento da eficácia comparativamente ao veículo e protetor solar sozinhos (LEENUTAPHONG *et al.*, 1999).

O adapaleno é um retinóide sintético que cursa com menor irritação, e tem sido testado para o tratamento de melasma. Adapaleno a 0,1% foi comparado com a tretinoína a 0,05% no tratamento do melasma em pacientes indianos asiáticos, e após 14 semanas, os investigadores observaram 37% redução da área Melasma e Índice de Gravidade da Área de Melasma (MASI) no grupo tratado com tretinoína e uma redução de 41% na pontuação Masi no grupo tratado com adapaleno. Além disso, os pacientes do grupo adapaleno desenvolveram menos efeitos colaterais (DOGRA *et al.*, 2002). Uma das terapias de combinação desenvolvida para o tratamento de hiperpigmentação é a fórmula Kligman-Willis, que consiste em 5% de hidroquinona, 0,1% de tretinoína e 0,1% de dexametasona (KLIGMAN; WILLIS, 1975). A combinação de hidroquinona, um retinóide, e um esteróide tópico parece ser altamente eficaz para o tratamento de melasma (DOGRA *et al.*, 2002).

Em relação aos *peelings* químicos, devem ser usados sempre os superficiais e com cautela minimizando o risco de complicações. A ablação controlada da epiderme é um método efetivo para acelerar a remoção da melanina depositada nessa camada. Deve-se promover a retirada de corneócitos e queratinócitos, com o mínimo de irritação dos melanócitos tipo-específicos, já que isso estimularia a melanogênese e o conseqüente rebote. Por outro lado, a estimulação indiscriminada dos melanócitos, secundária à reação inflamatória, inerente à agressão tecidual não controlada, pode resultar em intensa pigmentação. A escolha do esfoliante estará na dependência do tipo de melasma a ser tratado e da experiência de quem executa o procedimento, principalmente da ação terapêutica que apresenta. Os esfoliantes mais usados para esse nível são: a tretinoína, os alfa-hidroxiácidos, o ácido salicílico, a solução de Jessner e o ácido láctico e serão descritos no item 2.4. (ITO, 2003).

Por último, o uso de lasers e fontes de luz no tratamento do melasma é baseado no fato de que a melanina possui um amplo espectro de absorção, os melanossomas tem um tempo curto de relaxamento térmico e comprimentos de ondas mais longos podem penetrar mais internamente. Essa modalidade terapêutica ainda é um desafio, pois pode haver dano no tecido circunvizinho e inflamação, o que pode levar a uma hiperpigmentação pós-inflamatória. Portanto, devem ser usados apenas quando outras terapias não apresentarem sucesso (AISTER; LUPTON, 2001).

2.4 PEELINGS QUÍMICOS

Peeling químico é definido como a aplicação de um ou mais agentes químicos tópicos na pele, que resultam em vários graus de lesão na epiderme e na derme, dependendo do tipo e da concentração dos agentes utilizados. A cicatrização é por segunda intenção e a lesão na epiderme e na derme é regenerada pela migração do epitélio adjacente e das estruturas anexiais (LUPI; CUNHA, 2012).

Os *peelings* químicos podem ser utilizados no tratamento do melasma, mas também da acne, efélides, fotoenvelhecimento e ceratoses actínicas (GADELHA; COSTA, 2009).

A classificação do *peeling* é fundamentada no grau de profundidade do dano cutâneo, medida por exame histopatológico. São descritos como: muito superficiais, onde atingem o estrato córneo, superficiais, que podem atingir da camada granular até a camada basal, os médios, que atingem a derme papilar, e ocasionalmente, a derme reticular superior, e profundos que atingem até a derme reticular média (YAMAMOTO *et al.*, 2012).

Diversos são os fatores que condicionam a profundidade atingida por um esfoliante, e por consequência, o nível terapêutico do *peeling*. Entre ele estão a espessura da pele e a concentração de glândulas sebáceas, sendo considerados importantes barreiras para a penetração do esfoliante. Assim, para um mesmo produto aplicado na face, obtêm-se esfoliações mais profundas em peles mais secas e femininas do que em peles oleosas e masculinas, ricas em unidades pilossebáceas (GADELHA; COSTA, 2009).

Os agentes químicos utilizados durante o *peeling* são classificados de acordo com a profundidade que são capazes de adentrar na pele. Muitas variáveis podem alterar a profundidade do produto aplicado via *peeling*, incluindo a natureza e a concentração do agente químico, o número de camadas e o tempo em que a substância permanece em contato com a pele, preparação da pele nas semanas que antecedem ao *peeling*, limpeza e

desengorduramento da pele antes do *peeling* e localização anatômica do *peeling* (YAMAMOTO *et al.*, 2012).

O *peeling* de tretinoína utilizado em uma concentração de 5 a 10 % é considerado superficial. Além de promover a esfoliação gradual, sem inflamação, diminui a ação citocrínica e, pela angiogênese que promove, favorece a mobilização dos melanóforos dérmicos. Não deve ser aplicada durante a gravidez. A aplicação é simples e segura. Pode ser repetida a intervalos quinzenais. O produto é aplicado na pele, previamente desengordurada com uma solução de acetona e álcool isopropílico, na proporção 2:1, e removido seis horas após com detergente facial. A descamação é suave e ocorre do segundo ao quinto dia da aplicação (CUCE *et al.*, 2001).

Os alfa-hidroxiácidos, especialmente, o ácido glicólico, trabalham inibindo a tirosinase e são pH dependente. Além disso, diminuem o estrato córneo, dispersam a melanina na epiderme e melhoram a distribuição de outras drogas, tornando-se um complemento útil de outros agentes hipopigmentantes tópicos. O ácido glicólico, entretanto, pode ser lesivo em mãos inexperientes. A epidermólise focal é o efeito adverso mais temido, pela seqüela que pode produzir. O ácido glicólico é aplicado em gel, em concentrações de 40% a 70%, e o tempo de permanência na pele é de 15 a 20 minutos. Quanto maior a concentração e o tempo de permanência, maior será seu grau de penetração, ou seja, pode variar desde um *peeling* superficial até médio. As preparações mais ativas, porém mais agressivas e irritantes, são as que mantêm o pH próximo a 1. Fórmulas tamponadas, com pH 2, são mais bem toleradas, menos agressivas e, proporcionalmente, menos efetivas. (BALL AREFIEV; HANTASH, 2012)

O ácido salicílico, utilizado também em *peelings*, é um beta hidroxiácido e tem sido estudado para o tratamento do melasma e hiperpigmentação pós-inflamatória pós-acne (SHETH; PANDYA, 2011b). O ácido salicílico é um agente lipofílico que produz descamação do estrato córneo e promove a ativação das células basais e e fibroblastos. Pode exibir também efeitos anti-inflamatórios. Pode ser formulado para a utilização em *peelings* superficiais em concentrações que variam de 20 a 30% em veículo hidroalcoólico ou em polietilenoglicol. Pode permanecer na pele por um período de 30 a 120 minutos. Apesar do bom perfil de segurança, é possível toxicidade sistêmica com a utilização desse produto (ZAKOPOULOU; KONTOCHRISTOPOULOS, 2006).

A solução de Jessner, formulada com 14 g de resorcinol, 14 g de ácido salicílico e 14 ml de ácido láctico (85%) e quantidade suficiente para 100 ml com álcool etílico é usada como

um *peeling* químico superficial, e tem sido utilizado com sucesso no tratamento do melasma (SHARQUIE *et al.*, 2006).

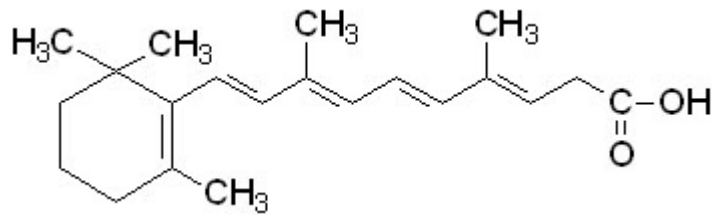
Esfoliações um pouco mais profundas, que atingem até a junção dermo-epidérmica, podem ser indicadas para o tratamento dos melasmas. Requerem maior conhecimento e habilidade, pois o risco de hiperpigmentação pós-inflamatória não é desprezível. O ácido tricloroacético (ATA) é o esfoliante mais indicado. A derme deve ser preservada, evitando-se assim a resposta inflamatória secundária a esse dano tecidual. Uma única aplicação da solução de ATA a 30% costuma ser suficiente para produzir o efeito desejado. A epidermólise deve ser o mais uniforme possível. A esfoliação acontece no sétimo dia, sob a forma de descamação lamelar (LUPI; CUNHA, 2012).

Os agentes químicos muito superficiais incluem o ácido de glicólico de 30 a 50 % aplicado por um a dois minutos, solução de Jessner aplicado de uma a três camadas e ácido tricloroacético a 10% em uma camada. Os agente superficiais são o ácido glicólico de 50% a 70 % aplicado por dois a vinte minutos, solução de Jessner aplicado em quatro a dez camadas, o ácido salicílico a 30%, o ATA 10 a 30%, e o ácido retinóico 5 a 10%. Os agentes capazes de provocar um *peeling* químico médio são o ácido glicólico a 70% aplicado de 3 a 30 minutos, ATA de 35% a 50%, e a combinação de agentes como solução de Jessner associada ao ATA a 35% ou ácido glicólico a 70% associado ao ATA a 35%. Para promover a esfoliação profunda utiliza-se a fórmula de Baker-Gordon (3 ml de fenol 88%, 2ml de água destilada , 8 gotas de sabão líquido e 3 gotas de óleo de cróton) (CLARK; SCERRI, 2008).

2.5 ÁCIDO RETINÓICO E *PEELING* DE ÁCIDO RETINÓICO

O ácido retinóico (figura 6), sinônimo de tretinoína, é uma molécula derivada da vitamina A, e tem como funções a dispersão dos grânulos de pigmento nos queratinócitos, interferência na transferência dos melanossomas e aceleração do *turnover* celular, aumentando a perda do pigmento (MAGALHÃES *et al.*, 2011a). Além disso, há evidências de que ele possa inibir melanogênese, podendo ter um efeito inibidor da tirosinase por inibição da tradução da enzima bem como sobre o fator de conversão do dopacromo, e, conseqüentemente interrupção da síntese de melanina (RENDON *et al.*, 2006).

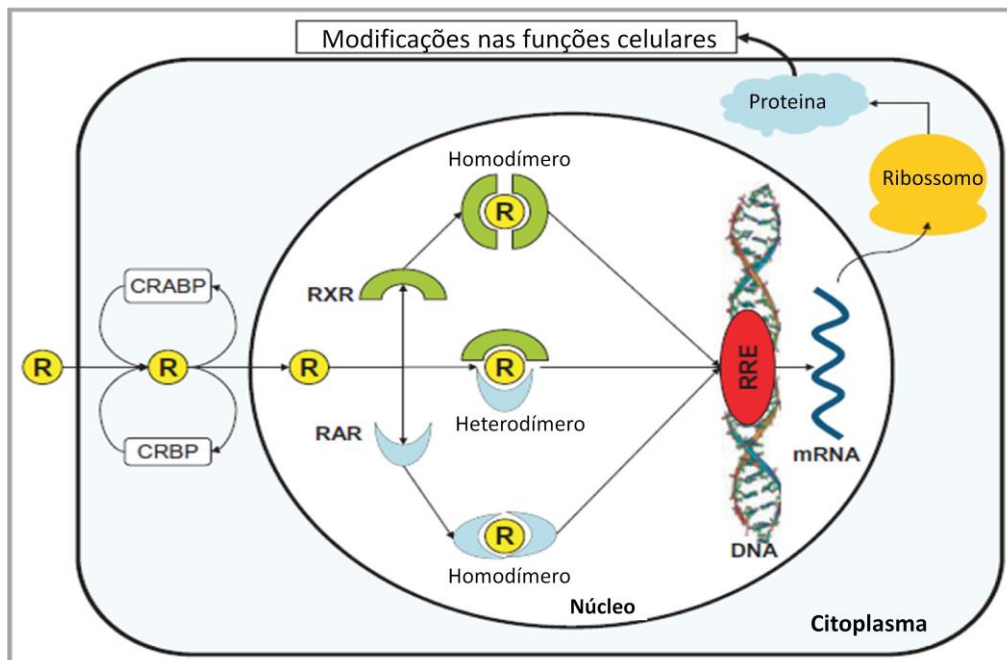
Figura 6. Estrutura química do ácido retinóico



Fonte: <http://themedicalbiochemistrypage.org/es/vitamins-sp.php>

O ácido retinóico pode exercer seus efeitos clínicos, pelo menos em parte, através da ativação de receptores de retinóides. É geralmente aceito que as moléculas de retinóides passam pela membrana celular mediado por endocitose, são transferidas para o núcleo por ligação a uma proteína (CRBP). A ação direta é mediada por receptores de retinóides que são eles os receptores de ácido retinóico (RAR) e receptores de retinóides X (RXR) conforme esquematizado na figura 7 (DARLENSKI *et al.*, 2010).

Figura 7. Mecanismo de ação do ácido retinóico



Fonte: Darlenski *et al.* (2010)

Um retinóide é definido atualmente como uma molécula que se liga e ativa os receptores de retinóides, quer diretamente ou por conversão metabólica, e assim, induz a

transcrição de genes de resposta ao ácido retinóico (THIELITZ; GOLLNICK, 2008).

Os efeitos biológicos do ácido retinóico mediado pelos RAR, formam assim um complexo capaz de interagir com o DNA e modular a expressão gênica, o que resulta em respostas biológicas específicas.

Os retinóides tópicos têm sido utilizados no tratamento de várias patologias na pele como acne, melasma, fotoenvelhecimento, queratose actínica há mais de 30 anos. Muitos estudos clínicos avaliaram a eficácia e segurança do seu uso e não foi encontrada nenhuma evidência clara de relação entre o uso da tretinoína tópica e o desenvolvimento de efeitos adversos sistêmicos (BALDWIN *et al.*, 2013).

O ácido retinóico tópico apresenta pouca absorção percutânea, e com isso, baixo índice de toxicidade. Toxicidade sistêmica em seres humanos é praticamente inexistente com o uso de tretinoína (DARLENSKI *et al.*, 2010).

As reações adversas locais em relação ao uso de tretinoína têm sido descritas, e incluem, eritema, sensação de queimação local, hiperpigmentação as quais são variáveis conforme o tipo de pele e são reversíveis, o que confere segurança no seu uso (BALDWIN *et al.*, 2013).

O *peeling* de ácido retinóico é considerado superficial, pois pode atingir o estrato córneo, granuloso, camada de células basais, até a junção dermo epidérmica. É usado em concentrações que variam de 1 a 5% em propilenoglicol. Um fator determinante para a sua ação é o tempo de permanência na pele, onde pode permanecer por 6 à 12h. O intervalo entre as sessões poderá ser de no mínimo sete dias. Tem um efeito esfoliante que ocorre após 2 a 5 dias. Pode ocorrer eritema, ardência e ressecamento após seu uso (GADELHA; COSTA, 2009).

Na literatura há poucos estudos sobre *peelings* de ácido retinoico (KIMURA *et al.*, 2012). Cucé *et al.* (2001) estudaram as modificações clínicas e histopatológicas após *peelings* seriados de tretinoína em concentrações de 1 a 5%, aplicadas duas vezes por semana, e observaram bons resultados em várias patologias, o melasma entre elas. Khunger *et al.* em 2004 compararam a eficácia do *peeling* de ácido retinoico a 1% à do *peeling* de ácido glicólico 70%, em 10 pacientes com fototipo elevado, que receberam 12 aplicações em intervalos de uma semana. Não foi notada diferença estatística de eficácia entre os dois tratamentos, e observou-se diminuição significativa no *Melasma Area and Severity Index* (MASI). Hersetich *et al.* (2010), avaliaram a eficácia do *peeling* de tretinoína a 10% em 20

mulheres, sendo observada melhora acentuada do melasma com ótima tolerabilidade e eficácia, sem efeitos adversos.

2.6 TOXICIDADE DO ÁCIDO RETINÓICO

O ácido retinóico pertence à família dos retinóides que é constituída por uma grande variedade de compostos naturais e pelos seus análogos sintéticos, que apresentam em comum uma semelhança estrutural com a vitamina A (NOY, 2010).

Na década de 80, foram sintetizados vários retinóides sintéticos, com diferentes aplicações terapêuticas. Atualmente, os retinóides sintéticos são utilizados como agentes terapêuticos tópicos e sistêmicos numa grande variedade de patologias (CHAPMAN, 2012).

A toxicidade de retinóides sistêmicos é bem relatada principalmente no que diz respeito a isotretinoína. Existem casos descritos de pancreatite, teratogenicidade, hepatotoxicidade droga induzida, leucopenia, trombocitopenia e alterações no metabolismo do colesterol (AHMAD, 2015).

Retinoides tópicos estão sendo usado há mais de três décadas, e o ácido retinóico foi o primeiro avaliado clinicamente. É considerada uma droga segura, pelo seu baixo poder de absorção, o que reduz o potencial de desenvolver efeitos adversos sistêmicos. A absorção percutânea é baixa, gira em torno de cerca de 1 a 2%, quando ácido retinóico a 0,05% é usado uma vez ao dia por um período de um ano. Não está descrito mudanças nas concentrações plasmáticas de ácido retinóico após longo uso de aplicações tópicas. Tipicamente, os efeitos adversos são locais, como eritema, descamação e queimação (SHAPIRO, 2011).

Devido à semelhança da tretinoína com a isotretinoína, tem havido preocupação com a teratogenicidade durante o período de gravidez. Existem pelo menos quatro relatos de anomalias congênitas na literatura em mulheres grávidas que fizeram uso de tretinoína tópica. No entanto, um estudo retrospectivo com 215 gestantes expostas a tretinoína tópica não mostrou aumento na incidência de embriopatias. Apesar do fato de que essa evidência é inconclusiva, as mulheres são aconselhadas a evitar sua exposição (BALDWIN *et al.*, 2013).

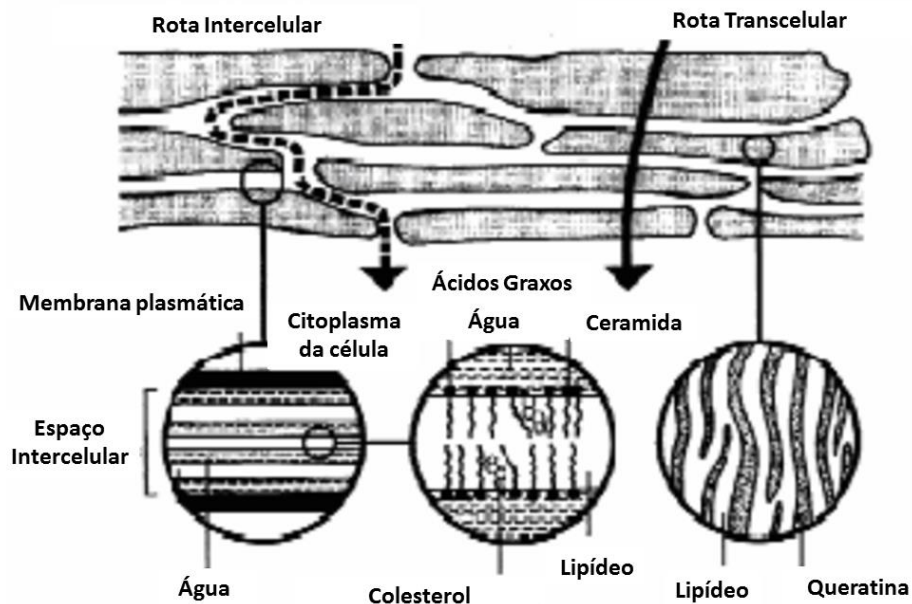
2.7 PERMEÇÃO PERCUTÂNEA DE FÁRMACOS

A denominação permeação percutânea é o caminho pelo qual uma substância atravessa a pele até a corrente linfática e sanguínea. Em preparações dermatológicas, embora seja

importante que o fármaco penetre além da superfície, normalmente não se deseja que o medicamento penetre na circulação sistêmica (JATO, 1977).

A permeação de fármacos através da pele inclui a difusão através da epiderme intacta e através dos anexos da pele, que formam desvios na pele. Dois caminhos de permeação através da barreira intacta podem ser identificados: a rota intercelular lipídica, entre os corneócitos, e a rota transcelular, através dos corneócitos e lípideos intercelulares, conforme figura 8 (MOSER *et al.*, 2001).

Figura 8. Diagrama simplificado do estrato córneo e de duas microrrotas de penetração de fármacos. (1) via matriz lipídica entre os corneócitos (rota intrcelular) e (2) através dos corneócitos e matriz lipídica intercelular (rota transcelular)



A unidade pilossebácea (folículo piloso, glândula sebácea e infundíbulo) proporciona outra rota de permeação que atravessa o estrato córneo intacto, o que representa um alvo (BARRY, 2001).

A penetração passiva do fármaco através da pele ocorre predominantemente via rota intercelular e envolve a difusão de moléculas através da matriz lipídica entre os corneócitos. A rota via folículos pilosos também contribui para a penetração percutânea. Contudo, considerando que esses apêndices ocupam somente 0,1% do total da superfície da pele, sua contribuição para a penetração de formulações convencionais tópicas é frequentemente considerada desprezível. Entretanto, quando consideramos o transporte cutâneo de formulações particuladas, a rota via apêndices pode exercer uma significativa função

(ALVAREZ-ROMÁN *et al.*, 2004), uma vez que essa rota denominada unidade pilosebácea, atravessa o estrato córneo intacto, representando um alvo de liberação de fármacos (BARRY, 2011).

A baixa penetração de fármacos na pele frequentemente limita a eficácia das formulações tópicas. Basicamente, a penetração na pele pode ser aumentada pelas seguintes estratégias: (1) aumentando a difusibilidade do fármaco na pele, (2) aumentando a solubilidade do fármaco na pele e (3) aumentando o grau de saturação do fármaco na formulação (MOSER *et al.*, 2001).

Por esse motivo, agentes terapêuticos como micelas, lipossomas, nanoemulsões, nanosferas e nanocápsulas tem sido desenvolvidas para aumentar a absorção percutânea de agentes terapêuticos, assim como para evitar danos na barreira da pele (SHIM *et al.*, 2004).

Nesse contexto, as microemulsões também apresentam excelente taxa de penetração em camadas mais profundas quando comparadas as formulações convencionais, sendo consideradas, portanto, como sistemas terapêuticos nanotecnológicos que apresentam grandes possibilidades de promover a permeação e o direcionamento de fármacos através da pele (SILVA *et al.*, 2010).

2.8 MICROEMULSÃO

Desde a descoberta das microemulsões por Hoar e Schulman (1943), o número de produtos farmacêuticos baseados nos novos sistemas carreadores de fármacos tem aumentado. São substâncias que podem ser utilizadas em muitos produtos como loções pos-barba, refrescantes bucais, cosméticos e como carreadores de fármacos (DAMASCENO *et al.*, 2011).

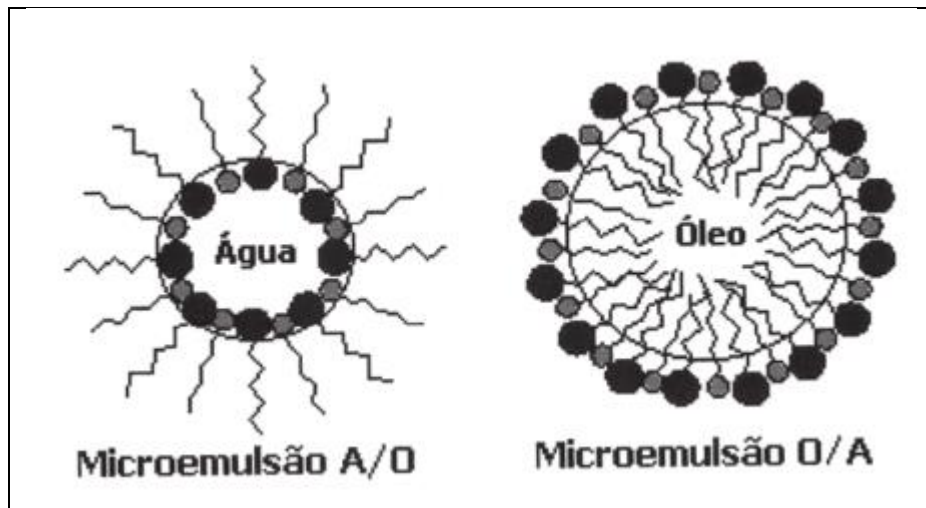
Microemulsão é caracterizada como microagregados esféricos dispersos e dinâmicos, que possuem diâmetro de 5 a 100 nm (SINTOV; SHAPIRO, 2004). É definido como um sistema termodinamicamente estável e isotropicamente translúcido de dois líquidos imiscíveis, usualmente água e óleo, estabilizadas por um filme interfacial de tensoativos localizados na interface óleo/água. A formulação de microemulsão geralmente envolve a combinação de dois a cinco componentes: óleo, água, tensoativo, cotensoativo e eletrólitos (CONSTANTINIDES; YIV, 1995). Dessa forma, o conceito antigo de que água e óleo não se misturam, sofreu alterações significativas, tendo sido comprovado que a adição de um terceiro componente em um sistema que seja parcialmente ou totalmente imiscível (como é o caso da água e do óleo) pode resultar na diminuição (ou aumento) da solubilidade desses líquidos. Se

o terceiro componente for um tensoativo, haverá redução da tensão superficial entre os líquidos imiscíveis, tornando-os capaz de se dispersarem um no outro (ROSSI, 2007).

As microemulsões podem ser classificadas de acordo com suas características de dispersão e proporções de óleo/água. São elas, óleo em água (O/A), onde o óleo encontra-se disperso sob a forma de pequenas partículas na fase aquosa, tornando-se o sistema rico em água; água em óleo (A/O), ou seja, quando a água está dispersa na fase oleosa, e neste caso o sistema é rico em óleo; ou bicontínua, quando as quantidades de óleo são semelhantes aos da água) (AZZINI, 1999).

Originam-se espontaneamente dependendo da natureza química e da quantidade dos componentes (PAUL; MOULIK, 2001). A orientação para a formação dos sistemas O/A ou A/O é dependente das propriedades físico-químicas do tensoativo, traduzidas principalmente pelo seu equilíbrio hidrofóbico/lipofílico (EHL) (figura9). A principal característica do sistema é formar espontaneamente a fase interna por homogeneização suave dos seus componentes. Sua estabilidade termodinâmica oferece vantagens sobre as dispersões instáveis, tais como as suspensões e emulsões, podendo ser utilizadas por um tempo muito mais amplo (OLIVEIRA *et al.* 2004).

Figura 9. Estrutura das microemulsões



Fonte: Oliveira et al. (2004)

Com relação à formação das microemulsões ela se baseia no seguinte princípio: quando dois líquidos imiscíveis são misturados, mantendo-se agitação constante, as duas fases tendem, inicialmente, a formar gotículas dispersas de um dos líquidos no interior do outro.

Quando a agitação cessa, as gotículas tendem a coalescer e os líquidos separam-se novamente.

Quando um dos líquidos divide-se no interior do outro se forma-se uma fase interna, dispersa ou descontínua, rodeada por uma fase externa, dispersante ou contínua. Assim, o processo de emulsificação implica num grande aumento da área interfacial (ΔS), a qual leva a um aumento brusco de energia livre de superfície (ΔG) (FRIBERG; BOTHOREL, 1988). Esse fenômeno, em condições de temperatura constante, pode ser descrito pela equação:

$(\Delta G) = \gamma \times (\Delta S)$, em que γ representa a tensão interfacial entre as fases aquosa e oleosa.

Se considerarmos que o aumento da área interfacial (ΔS) é imprescindível do ponto de vista tecnológico, uma das alternativas para estabilização da emulsão seria fornecer energia mecânica, continuamente, de modo a manter a área interfacial aumentada. Este fator, embora necessário para a dispersão, por si só, não é suficiente, pois vence a barreira da tensão superficial apenas temporariamente, enquanto durar a agitação. Através da equação, pode-se verificar que o caminho mais viável para a estabilização do sistema é a diminuição da tensão superficial da dispersão, como forma de reduzir a energia livre derivada da expansão da área interfacial. É possível verificar, também, que a estabilidade da emulsão deverá ser maior, quanto menor a energia livre remanescente da expansão da área interfacial, tendendo a um sistema a um sistema termodinamicamente estável, caso o aumento da energia livre seja totalmente compensado pela diminuição da tensão superficial (SHAH, 1998). Devido a alta instabilidade das emulsões, a manutenção da fase dispersa na contínua depende da presença de adjuvantes como substâncias tensoativas com propriedades emulgentes ou agentes emulsionantes, que formam uma película interfacial proporcionando aumento da estabilidade física e manutenção das fases externa e interna (AZZINI, 1999).

Enquanto que as emulsões são estabilizadas por agentes emulsivos comuns (tensoativo), as microemulsões geralmente são adicionadas de um co-tensoativo, cujo a função é diminuir a tensão superficial para valores abaixo dos limites proporcionados pelo emulsivo comum. No entanto, nos casos em que os tensoativos são capazes de cumprir integralmente essa função, a presença dos co-tensoativos não é necessária e a composição da microemulsão restringe-se a três componentes. Assim, em proporções adequadas entre seus componentes e em condições de temperatura, pressão e força iônica constantes, o sistema forma-se espontaneamente, quando a energia remanescente da interface está próxima a zero (FRIBERG, 1988).

3 Justificativa

O melasma é um problema prevalente na clínica dermatológica; no entanto a eficácia das modalidades de tratamento é questionável. O *peeling* de ácido retinóico convencional figura como uma das modalidades de tratamento mais frequentes, porém, com pouca resposta em melasmas mais profundos, como o dérmico.

A pele é considerada uma barreira anatômica, o que dificulta a penetração de fármacos através da mesma. Neste contexto está inserido o conceito dos sistemas transportadores de fármacos, os quais são capazes de compartimentalizar a substância ativa e direcioná-la para os sítios onde deverão exercer o efeito farmacológico, além de poder controlar a velocidade de liberação, sem alterar a estrutura química da molécula transportada. As microemulsões estão incluídas nesse conceito. Elas podem melhorar a capacidade de permeação na pele, pois podem se mover facilmente através do estrato córneo, entregando o ativo ao alvo desejado. Então, poderá haver uma maior eficácia do produto em microemulsão, quando comparado ao produto convencional, no tratamento do melasma, que ainda hoje é uma doença de difícil controle.

4 Objetivos

4.1 OBJETIVO GERAL

Obter microemulsões de ácido retinóico a 1% para *peeling* químico e avalia-las clinicamente em pacientes portadoras de melasma.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver e selecionar microemulsões para veiculação do *peeling* de ácido retinóico a 1%;
- Caracterizar físico-quimicamente as microemulsões para *peeling* químico contendo ácido retinóico a 1%;
- Realizar doseamento do ácido retinóico nas microemulsões;
- Realizar validação da metodologia de doseamento do ácido retinóico nas microemulsões;
- Avaliar a permeação cutânea *in vitro* do ácido retinóico veiculado a 1% nas microemulsões;
- Avaliar a eficácia clínica das microemulsões para *peeling* químico contendo ácido retinóico 1%, em pacientes portadoras de melasma;
- Determinar parâmetros hemato-bioquímicos das voluntárias do estudo;

5 Material e Métodos

5.1 OBTENÇÃO DA MICROEMULSÃO

5.1.1 Teste de solubilidade do ativo

Foi realizada avaliação prévia de solubilidade do ácido retinóico em componentes químicos que poderiam ser utilizados no desenvolvimento de microemulsões (tensoativos, co-tensoativos, óleo e água).

Para a realização do teste de solubilidade do ácido retinóico, foram pesados em recipiente adequado, 40 mg deste ativo em uma balança analítica de precisão. Logo após, em cada tubo de ensaio foram adicionados os devidos reagentes a serem testados, inicialmente na quantidade de 1 mL, e então eram submetidos à agitação, com auxílio de um vórtex, por um período de 3 minutos cronometrados. Este procedimento foi repetido por até 5 vezes, caso não fosse observada a solubilização do ativo por completo.

Os solventes utilizados foram: Propilenoglicol, Glicerol, Mackaderm Microexpress[®], Lauramido Propilbetaína (Mackam 1200), Óleo mineral, Vaselina líquida, Cetiol V, Estearato de butila, Miristato de Isopropila, Triglicerídeos dos Ácidos Cáprico e Caprílico, Óleo de silicone, Óleo de Canola, Silicone volátil, Monolaurato de Sorbitan Etoxilado 20 (Tween 20), Monooleato de Sorbitan Etoxilado 20 (Tween 80), PEG 40 (Óleo de Ricino Hidrogenado e Etoxidado), Polietilenoglicol 400 (PEG 400) Monooleato de sorbitano 80 (Span 80).

5.1.2 Construção do diagrama de fases pseudo-ternário e seleção das microemulsões

A construção dos diagramas de fases se deu tradicionalmente, por titulação lenta de fase aquosa com misturas diferentes de óleo e tensoativos/co-tensoativos, à temperatura ambiente.

Foram adicionadas pequenas quantidades de água purificada havendo sempre uma leve agitação no sistema. Entre essas adições esperou-se um intervalo padronizado de 10 minutos para observação macroscópica, que posteriormente foram anotadas quanto à formação de microemulsão, emulsão ou separação de fases.

Foram construídos quatro diagramas de fases, de acordo com os componentes selecionados no teste de solubilidade, sendo o primeiro constituído por uma mistura de Tween 20: PEG 400: Span 80 numa proporção de 1:1:1, e como fase oleosa foi utilizado o cetiol V.

Para a obtenção do segundo diagrama foram mantidos os mesmos constituintes que no primeiro, no entanto, alterou-se a proporção dos tensoativos/cotensoativos Tween 20: PEG 400: Span 80 para 1:2:1. O terceiro diagrama foi constituído de Span 80: PEG 40: Tween 20 nas proporções de 1:1:1 e cetiol V como fase oleosa.

O quarto diagrama foi construído a partir da seguinte composição: ácido retinóico 1%, sendo a fase oleosa constituída por cetiol V, os tensoativos (T) Span 80, Tween 20, PEG 40 (1:1:1), a fase aquosa (FA) constituída por água.

Todos os diagramas de fases construídos seguiram a seguinte proporção de adição de tensoativos/co-tensoativos e fase oleosa 1:9; 2:8; 3:7; 4:6; 5:5; 6:4; 7:3; 8:2 e 9:1. Foi adicionada a água da seguinte maneira: duas adições de 125µl, 19 adições de 250µl e 30 adições de 500µl, sendo que entre cada adição havia sempre uma leve agitação no sistema e aguardava-se um intervalo padronizado de 10 minutos para observação macroscópica, que posteriormente foram anotadas quanto à formação de microemulsão, emulsão ou separação de fases. Para cada mistura, o peso final do sistema foi padronizado em 5,0g e os diagramas de fases foram plotados com auxílio do Software SigmaPlot 10.

Com a construção dos diagramas de fases pseudo ternário e a elucidação macroscópica dos possíveis sistemas microemulsionados, foi realizada a seleção de alguns desses sistemas a fim de se verificar a influência tanto da porcentagem de óleo como da mistura de tensoativos na caracterização das mesmas (BRASIL, 2004).

5.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA MICROEMULSÃO DESENVOLVIDA

5.2.1 Tamanho das gotículas e índice de polidispersividade

A microemulsão contendo ácido retinóico a 1% teve o tamanho de gotículas determinado com o auxílio de um *Light Scattering* modelo Zetasizer Nano ZS – ZEN3601 (Malvern Instruments).

5.2.2 Reologia

O perfil reológico da microemulsão selecionada foi analisado por um Reômetro *Brooksfiel*, modelo DV-III Ultra, acopladas a um computador software Rheocalc V3.2 *Brooksfied Engineering Laboratories* com a utilização de spindle SC4-31, à 25 °C

As medições foram realizadas em triplicata em velocidades progressivamente maiores (intervalos de 5 a 30 rpm) para a obtenção da curva ascendente e em velocidades progressivamente menores (intervalo de 30 a 5 rpm), para obtenção da curva descendente.

5.2.3 Potencial zeta

A caracterização do potencial zeta da microemulsão foi realizada com auxílio de um *Light Scattering* modelo Zetasizer Nano ZS – ZEN 3601 (*Malvern Instruments*)

5.2.4 pH

A microemulsão contendo ácido retinóico teve os valores de pH determinados por um peagômetro (MS TECNOPON[®], modelo mPA-210). O pH foi determinado inserindo-se o eletrodo diretamente na amostra.

5.2.5 Condutividade

A condutividade (em $\mu\text{S}/\text{cm}$) da microemulsão obtida foi determinada à temperatura ambiente com o auxílio de um condutivímetro digital Gehaka[®] modelo CG 1800, a fim de se prever se o sistema isotrópico em estudo apresenta água ou óleo na fase externa.

5.2.6 Densidade

A densidade, relação entre massa e volume, foi determinada pela densidade relativa utilizando água purificada como substância padrão. A densidade relativa da microemulsão contendo ácido retinóico foi determinada à temperatura de 20°C, pelo método tradicional do picnômetro (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988; BRASIL, 2010).

A densidade da microemulsão contendo ácido retinóico foi calculada através da equação:

$$d = \frac{M_2 - M_0}{M_1 - M_0} \quad (2)$$

Onde:

d = densidade

M_0 = massa do picnômetro vazio

M_1 = massa do picnômetro com água purificada a 20°C;

M_2 = massa do picnômetro com a amostra a 20°C.

5.3 TESTE DE ESTABILIDADE PRELIMINAR

5.3.1 Centrifugação

A microemulsão contendo ácido retinóico foi centrifugada imediatamente após o preparo a 3000 rpm (rotações por minuto) por 30 minutos, à temperatura ambiente, a fim de se determinar sua estabilidade (BRASIL, 2004).

5.4 OBTENÇÃO DA FORMULAÇÃO SELECIONADA DO *PEELING* CONTENDO ÁCIDO RETINÓICO 1%

No quadro 2 estão apresentados os componentes que foram utilizados para compor a formulação do peeling contendo ácido retinóico a 1%.

Quadro 2. Formulação do *peeling* contendo ácido retinóico com seus componentes e propriedades.

Componente	Função
Ácido retinóico	Fármaco
PEG 40 (óleo de rícino hidrogenado e etoxilado)	Tensoativo
Cetiol V (Oleato de decila)	Fase Oleosa
SPAN 80 (mooleato de sorbitano)	Co-tensoativo
Tween 20 (monolaurato de sorbitano etoxilado)	Co-tensoativo
Água	Veículo

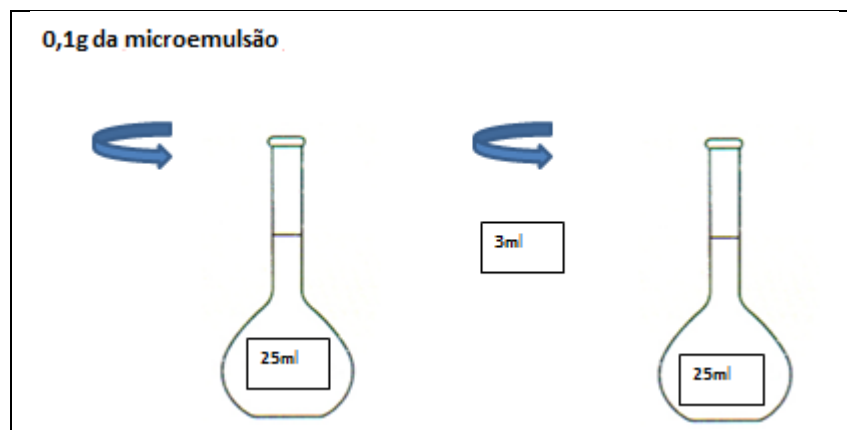
Para o preparo da formulação, inicialmente revestiu-se o béquer com papel alumínio para impedir a entrada da luz. O ácido retinóico foi introduzido no béquer; em seguida o PEG 40 e acetona, e em seguida foram agitados com auxílio de um agitador magnético em baixa rotação. Após esse processo, adionou-se o Cetiol V e acetona, efetuando-se a solubilização dos mesmos com auxílio do agitador. Depois, adionou-se o SPAN 80 e acetona, homogeneizando os mesmos, seguido de Tween 20 e acetona, agitando-se da mesma forma. Para finalizar a formulação, adicionou-se a água gradativamente, até completar a quantidade necessária para compor a formulação.

5.5 DOSEAMENTO DO ÁCIDO RETINÓICO NA MICROEMULSÃO

Para o doseamento do ácido retinóico contido na microemulsão, a mesma foi preparada de maneira a se obter uma quantidade equivalente a cerca de 0,5 mg de ácido retinóico em clorofórmio. Para comparação, preparou-se a solução padrão contendo ácido retinóico com a substância química de referência Sigma-Aldrich[®], na mesma concentração, utilizando o mesmo solvente.

Para o preparo da amostra da microemulsão, 0,1 g da microemulsão foi adicionado em um balão volumétrico de 25 ml e depois preenchidos com clorofórmio. Para diluição, 3 ml dessa solução foram coletados e colocados em um outro balão de 25 ml, foi preenchido com clorofórmio (figura 10).

Figura 10. Figura demonstrando a diluição da microemulsão para análise.



Para o preparo da solução padrão, 20 mg de ácido retinóico foram colocados em um balão volumétrico de 50 ml, e depois preenchido com clorofórmio. Posteriormente, 3 ml desta solução foram colocados em um outro balão de 50 ml. Este segundo balão também foi preenchido com clorofórmio. Procedeu-se nova diluição em que 2 ml foram coletados, colocados em um balão de 10 ml. Novamente foram preenchidos com clorofórmio (figura 11).

Figura 11. Figura demonstrando a diluição da solução padrão para análise.



Após esse procedimento, as microemulsões diluídas em clorofórmio foram analisadas por um espectrofotômetro de absorção molecular UV-VIS, modelo UV 1800, conectado a um computador Software-UV Probe (versão 2,43) para processamento e análise dos dados.

As absorvâncias das soluções resultantes foram medidas em 365 nm, utilizando clorofórmio para o ajuste do zero. A quantidade de ácido retinóico na microemulsão foi calculada a partir das leituras obtidas (BRASIL, 2010, adaptado e validado) e a análise foi feita em triplicata.

5.6 VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ÁCIDO RETINÓICO A 1,0% EM MICROEMULSÃO POR ESPECTOFOTOMETRIA NA REGIÃO UV

Os parâmetros avaliados na validação do método compreenderam: Especificidade, linearidade e intervalo, limites de quantificação, precisão, exatidão e robustez, conforme preconizado na Resolução RE n ° 899 de 29 de Maio de 2003. Em todas as análises foi utilizado clorofórmio como solvente e as absorvâncias foram obtidas em triplicata no comprimento de onda 365nm.

5.6.1 Especificidade e seletividade

É a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz. (BRASIL, 2003). Preparou-se a solução padrão (ácido retinóico), da formulação em estudo e uma solução placebo composta pelos excipientes utilizados na formulação da microemulsão

contendo ácido retinóico. Todas as amostras apresentavam concentração equivalente a 0,005 mg/mL de ácido retinóico e foram analisadas em triplicata. A especificidade e seletividade foram avaliadas através da comparação das absorbâncias obtidas em 365 nm.

5.6.2 Linearidade

Linearidade é capacidade do método, dentro de uma determinada faixa, produzir resultados que sejam diretamente proporcionais a concentração do analito na amostra (BRASIL, 2003).

A linearidade do método foi determinada através da construção de três curvas de calibração na faixa de 0,004 - 0,006 mg/mL, sendo um alcance de 80% a 120% da concentração teórica do teste. Para a construção da curva de calibração foram preparadas cinco concentrações (0,004 mg/mL; 0,0045 mg/mL; 0,005 mg/mL; 0,0055 mg/mL; 0,006 mg/mL) a partir do padrão de Ácido Retinóico.

5.6.3 Intervalo linear

Intervalo linear é a faixa que corresponde o maior nível de concentração do analito até o menor nível. Sendo obtido a partir da linearidade, ou seja, a partir da curva de calibração com alcance de 80 a 120% da concentração teórica.

5.6.4 Precisão

Precisão é a capacidade do método em avaliar o quão próximo são os resultados obtidos a partir de uma série de medidas de uma mesma amostra. De acordo com a Resolução n ° 899 de 29 de Maio de 2003, a precisão é considerada em três níveis: Repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade.

A repetibilidade foi verificada por nove determinações, contemplando o intervalo linear do método, ou seja, nas concentrações de 80, 100 e 120%. Realizadas pelo mesmo analista, no mesmo laboratório, em períodos alternados (manhã, tarde e noite), verificando se os resultados encontram-se dentro da máxima diferença aceitável.

A precisão intermediária foi avaliada através de variações dentro do mesmo laboratório, em dias diferentes e por analistas diferentes. O teste foi realizado com triplicatas a 80, 100 e 120 % da concentração do teste, em 2 dias diferentes com 2 analistas diferentes.

A reprodutibilidade foi verificada entre resultados obtidos em laboratórios diferentes, com analistas diferentes.

A precisão foi determinada através de análise de variância, desvio padrão e coeficiente de variação.

5.6.5 Exatidão

Exatidão é a capacidade do método de apresentar resultados próximos em relação ao valor verdadeiro. Portanto, determinou-se a exatidão do método após o estabelecimento da linearidade, do intervalo e da especificidade do mesmo, sendo verificada a partir de nove determinações contemplando o intervalo linear do procedimento, ou seja, nas concentrações de 80, 100 e 120% com três réplicas cada. A exatidão foi expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente. (BRASIL, 2003).

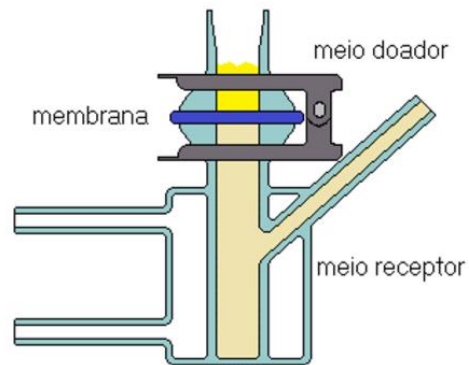
5.6.6 Robustez

A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. A robustez foi determinada em triplicata, a partir de soluções na concentração de 0,005 mg/mL, variando a temperatura (temperatura ambiente e a 50 °C), os comprimentos de onda (363, 365, 367 nm) e o tempo de preparo da amostra (30 e 60 minutos).

5.7 ESTUDO DA PERMEAÇÃO CUTÂNEA *IN VITRO*

Para estudo de avaliação da permeação cutânea do ácido retinóico contido na microemulsão a 1,0%, para *peeling* químico, seguiu-se o modelo da célula de Franz, que consiste em um modelo vertical e bicompartimental, com área difusional de 1,77cm² (Figura 12). O compartimento receptor foi preenchido com solução salina tamponada (18mL) pH 7,4. A pele de orelha de porco foi colocada na célula de difusão, com o lado da derme em contato com a solução receptora. Sobre a área da pele (meio doador) foram adicionados 200 mg da microemulsão contendo ácido retinóico a 1,0%. Os experimentos foram conduzidos a 37°C±1°C. Após seis horas de aplicação, a solução receptora foi coletada para a quantificação do fármaco permeado por espectrofotometria de absorção.

Figura 12. Esquema da célula de Franz



5.8 AVALIAÇÃO CLÍNICA DA EFICÁCIA DO *PEELING* DE ÁCIDO RETINÓICO 1% EM MICROEMULSÃO EM PACIENTES PORTADORAS DE MELASMA

Foi realizado um estudo experimental, prospectivo, clínico, controlado, randomizado, duplo-cego, em pacientes portadoras de melasma, com o objetivo de avaliar os efeitos do *peeling* em microemulsão contendo ácido retinóico a 1,0%. Previamente ao início do estudo o projeto de pesquisa foi encaminhado ao comitê de ética em pesquisa da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, onde recebeu parecer favorável com número CAAE: 28825514.8.0000.0055 (Anexo A).

As pacientes portadoras de melasma foram selecionadas aleatoriamente em um consultório particular de Dermatologia, na cidade de Vitória da Conquista, Bahia, Brasil.

A amostra foi constituída por 60 pacientes do sexo feminino, portadoras de melasma do tipo epidérmico, misto e dérmico com mais de um ano de duração, maiores que 18 anos, com fototipos de Fitzpatrick de I a IV e que possuíam o desejo pessoal de participar do estudo. Todas as participantes assinaram termo de consentimento livre e esclarecido, que continha uma explicação exaustiva a respeito dos riscos, benefícios e as possíveis complicações envolvidas (Anexo B).

Foram excluídas da amostra mulheres gestantes, lactantes ou planejando engravidar nos próximos 3 meses; pacientes com outras doenças cutâneas na face; fototipos V e VI; história de herpes recorrente; alergia ao ácido retinóico ou ao veículo; história de quelóides e cicatrizes hipertróficas; em uso de medicações tópicas (exceto o filtro solar); tratamentos com *lasers*, luz intensa pulsada (LIP), dermoabrasão ou *peeling* nos últimos 3 meses; uso de corticoterapia oral há menos de um mês; uso de retinóides sistêmicos, ciclosporina, interferon,

metotrexato há menos de quatro meses; uso de drogas fotoalérgicas ou fotossensibilizantes há menos de um mês e uso de terapia de reposição hormonal.

Foi colhida toda a história clínica de cada paciente, incluindo história pessoal (idade, sexo, estado civil, ocupação), história familiar, duração do melasma, relação com gestações anteriores, relação com exposição solar, terapias prévias, relação do melasma ao uso de pílulas anticoncepcionais. Todas as pacientes foram instruídas a fazer uso do fotoprotetor durante todos os dias do estudo.

Todas as pacientes foram randomizadas em três diferentes grupos (n = 20): Grupo placebo (base microemulsionada sem adição de substância ativa), Grupo *peeling* de ácido retinóico a 1% convencional (AR 1%) e Grupo *peeling* microemulsão contendo ácido retinóico a 1% (AR 1% M).

Os grupos foram submetidos a quatro aplicações de peeling quinzenalmente nos dias zero, 15°, 30° e 45°, e as análises foram realizadas nos dias zero, 15°, 30°, 45° e 60°.

O procedimento foi realizado da seguinte maneira: inicialmente limpeza da pele com gaze umedecida com acetona a 3% em álcool para remoção de oleosidade e sujidades, e posteriormente aplicação homogênea do produto em toda a face com *swab*. O produto permaneceu em contato com a pele por um período de seis horas e, após esse período o produto era removido através de lavagem com água e sabão.

Exame clínico e fotografias digitais com a máquina *Canon Rebel 60 D* foram realizadas antes e após cada procedimento, isto é, nos dias zero, 15°, 30° e 45° e 60°. As fotografias foram realizadas com vista frontal (medida à 90° graus), direita e esquerda (medida à 45° graus), e as medidas foram feitas com auxílio de um goniômetro. Posteriormente, as fotografias foram analisadas por dois dermatologistas, na qual seguiram os critérios do índice MASI (*melasma área and severity index*)

O MASI foi descrito por Kimbrough-Green em 1994, e é um instrumento útil na avaliação clínica do melasma. O *score* MASI é calculado por avaliação subjetiva através de 3 fatores: área envolvida (A), pigmentação (P) e homogeneidade (H). Para o cálculo são avaliadas quatro áreas da face: frontal (F), malar direita (MD), malar esquerda (ME) e mentoniana (M). As regiões malar direita, malar esquerda e frontal equivalem cada uma a 30% da área total da face e a região mentoniana a 10% dessa área. . A área de envolvimento corresponde a um valor numérico que varia de 0 a 6 (0 = sem envolvimento; 1 = < 10%; 2 = 10 a 29%; 3 = 30 a 49%; 4 = 50 a 69%; 5 = 70 a 89%; 6 = 90 a 100%. A pigmentação e

homogeneidade são avaliados em uma escala que varia de 0 a 4 (0= ausente; 1= leve; 2 = suave; 3 = marcado ; 4= máximo) (Quadro 3). A pontuação MASI é calculada adicionando a soma das classificações de pigmentação e homogeneidade, multiplicado pela área de envolvimento em cada um dos quatro domínios na face. A fórmula utilizada é da pela equação:

$$\text{Masi} = 0,3 (\text{PF} + \text{HF}) \text{ AF} + 0,3 (\text{PMD} + \text{HMD}) \text{ AMD} + 0,3 (\text{PME} + \text{HME}) \text{ AME} + 0,1 (\text{PM} + \text{HM}) \text{ AM.} \quad (1)$$

O escore Masi varia de 0 a 48 (PANDYA *et al.*, 2011).

Quadro 3. Paramêtros de referência da fórmula MASI

Valor	Referência
A:	0 - 5%
0-	sem envolvimento
1-	< que 10%
2-	10 a 29%
3-	30 a 49%
4-	50 a 69%
5-	70 a 89%
6-	90 a 100%
P:	0 a 4 severidade da pigmentação
H:	0 a 4 homogeneidade
Regiões	
Frontal (F)	30%
Malar D (MD)	30%
Malar E (ME)	30%
Mentoniana (M)	10%

As pacientes também responderam ao questionário MelasQol (*melasma quality of life*) nos dias zero e 60°.

O *melasma quality of life* (MelasQol) é um instrumento que avalia a percepção dos indivíduos com melasma em relação a qualidade de vida, dentro de um contexto cultural. Descrito por Balkrishan et al. (2003), validado por Cestari et al. (2006), demonstrou-se capaz de avaliar objetivamente o impacto na qualidade de vida dos pacientes com melasma. É uma ferramenta útil, pois o melasma é uma afecção assintomática que não representa uma doença com risco direto de vida, porém desfigurante, o que leva a um efeito significativo sobre a qualidade de vida. Foi desenvolvido um questionário, inicialmente em inglês, que

posteriormente foi traduzido para espanhol, português, francês e turco, devido ao fato de que o melasma é um problema mundial. O MelasQol é um questionário composto de 10 ítems, com pontuação que varia de 1 a 7, com os índices mais altos indicando uma pior qualidade de vida (LIEU; PANDYA, 2012) (Quadro 4).

Quadro 4. Questionário MelasQuol

<p>Considerando a sua doença, melasma, como você se sente em relação à</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. A aparência da sua pele 2. Frustração pela condição da sua pele 3. Constrangimento pela condição de sua pele 4. Sentindo-se depressivo pela condição da sua pele 5. Os efeitos da relação da sua pele no relacionamento com outras pessoas (por ex: interações com a família, amigos, relacionamentos íntimos . 6. Os efeitos da condição da sua pele sobre o seu desejo de estar com as pessoas 7. A condição da sua pele dificulta a demonstração de afeto 8. As manchas da pele fazem você sentir atraente para os outros 9 As manchas da pele fazem você se sentir menos importante ou produtivo 10. As manchas da pele afetam seu senso de liberdade
--

A partir desses dois índices (MASI e MelasQol) foram obtidos dados que posteriormente foram submetidos a análise estatística.

Além disso, foram avaliadas as complicações em relação *peeling*, como percepção de eritema, queimação e sensação de prurido. Todos os pacientes com desconforto descreveram através de auto avaliação.

5.8.1 Procedimento estatístico para análise do estudo clínico

Inicialmente, foram verificados os pressupostos para utilização da análise de variância de medidas repetidas (homocedasticidade, normalidade e esfericidade). Após a normalidade ter sido rejeitada por meio do teste Kolmogorov-Smirnov, procedeu-se com a estatística não paramétrica. O teste de Friedman foi utilizado para testar o efeito dos tratamentos no índice MASI, com as comparações ao longo das avaliações (0, 15, 30, 45 e 60) sendo realizadas por meio do teste Wilcoxon. O teste Wilcoxon também foi utilizado para testar o efeito dos tratamentos no índice MelasQoL. O teste Kruskal-Wallis foi utilizado para testar as diferenças entre os grupos (AR1%, AR1%M e placebo) em cada avaliação, com as comparações entre tratamentos sendo realizadas por meio do teste Mann-Whitney. O nível de significância

adotado foi de 5% ($\alpha = 0,05$). Os dados foram tabulados e analisados no IBM SPSS Statistics for Windows (IBM SPSS. 21.0, 2012, Armonk, NY: IBM Corp.).

Para a validação do método analítico, a análise estatística dos dados foi realizada através de análise de variância ANOVA, considerando-se os resultados como significativos quando a probabilidade foi inferior a 5% ($p < 0,05$, intervalo de confiança de 95%), e teste t de Student com nível de significância $\alpha = 0,05$ (intervalo de confiança de 95%). A avaliação estatística dos resultados foi realizada através do software Microsoft Office Excel®, versão 2007.

5.8.2 Determinação hemato-bioquímica

Para avaliação dos possíveis efeitos sistêmicos do tratamento, as pacientes foram submetidas a análises hemato bioquímicas através da coleta de sangue, onde foram dosadas as transaminases hepáticas (TGO, TGO), fosfatase alcalina, gama-gt, hemograma, colesterol total , LDL, HDL, VLDL e Triglicérides nos dia 0 e 60. Os exames foram coletados no laboratório Qualilab (Vitória da Conquista). Posteriormente, foram analisados por meio do Teste t student.

6 Resultados

6.1 OBTENÇÃO DA MICROEMULSÃO

6.1.1 Teste de solubilidade do ativo

Foi realizado o teste solubilidade do ácido retinóico em algumas substâncias químicas identificadas com potencial de utilização para obtenção de sistemas microemulsionados através da construção do diagrama de fases: tensoativos, co-tensoativos, óleo e água. (Figuras 13, 14 e 15)

Figura 13. Teste de solubilidade do ácido retinóico nos solventes A- Mackaderm microexpress[®], B- Óleo mineral, C- Cetiol V, D-Tween 20, E-Óleo de canola e F-Tween 80, da esquerda para direita, respectivamente

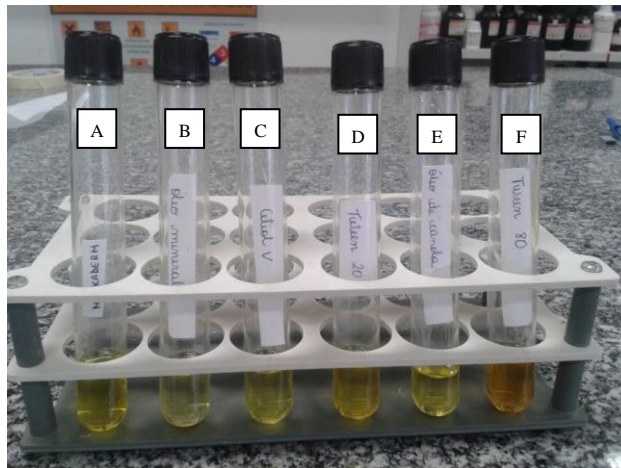


Figura 14. Teste de solubilidade do ácido retinóico nos solventes A-Silicone Volátil, B-PEG 400, C-Glicerol, D- Miristato de isopropila e E- Propilenoglicol, da esquerda para a direita, respectivamente

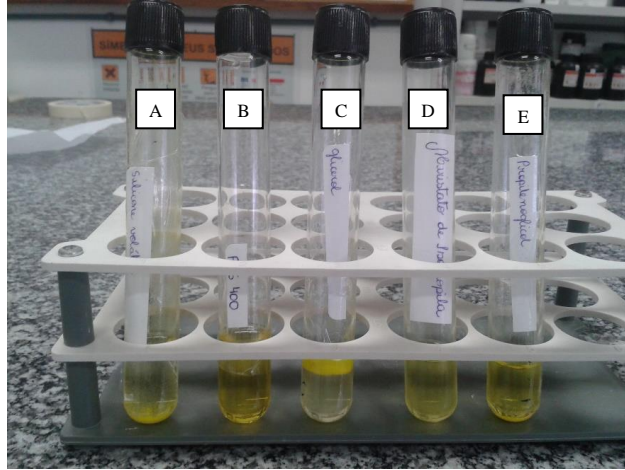
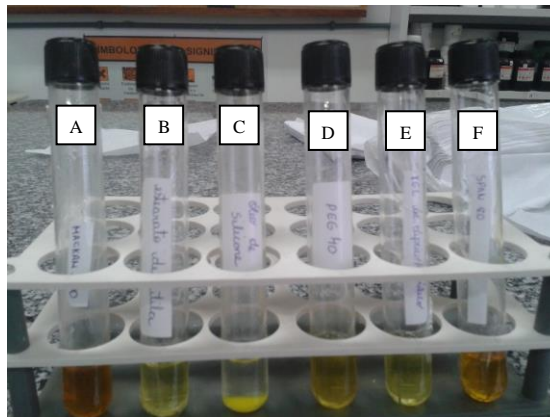


Figura 15. Teste de solubilidade do ácido retinóico nos solventes A- Mackam 1200, B- Estearato de butila, C- Óleo de silicone, D- PEG 40, E- Triglicerídeos dos ácidos cáprico-caprílico e F- Span 80, da esquerda para a direita, respectivamente



O quadro 5 apresenta os resultados obtidos da solubilidade d ácido retinóico nos diferentes solventes.

Quadro 5. Solubilidade do ácido retinóico nos solventes utilizados:

Reagente	Quantidade (ml)	Observações
Miristato de isopropila	5	Solúvel
Triglicerídeos dos Ácidos Cáprico e Caprílico	5	Solúvel
Óleo de silicone	5	Insolúvel
Óleo de canola	5	Insolúvel
Silicone volátil	5	Insolúvel
Monoaurato de Sorbitan Etoxilado 20 (Tween 20)	5	Solúvel
Monooleato de Sorbitan Etoxilado 20 (Tween 80)	5	Solúvel

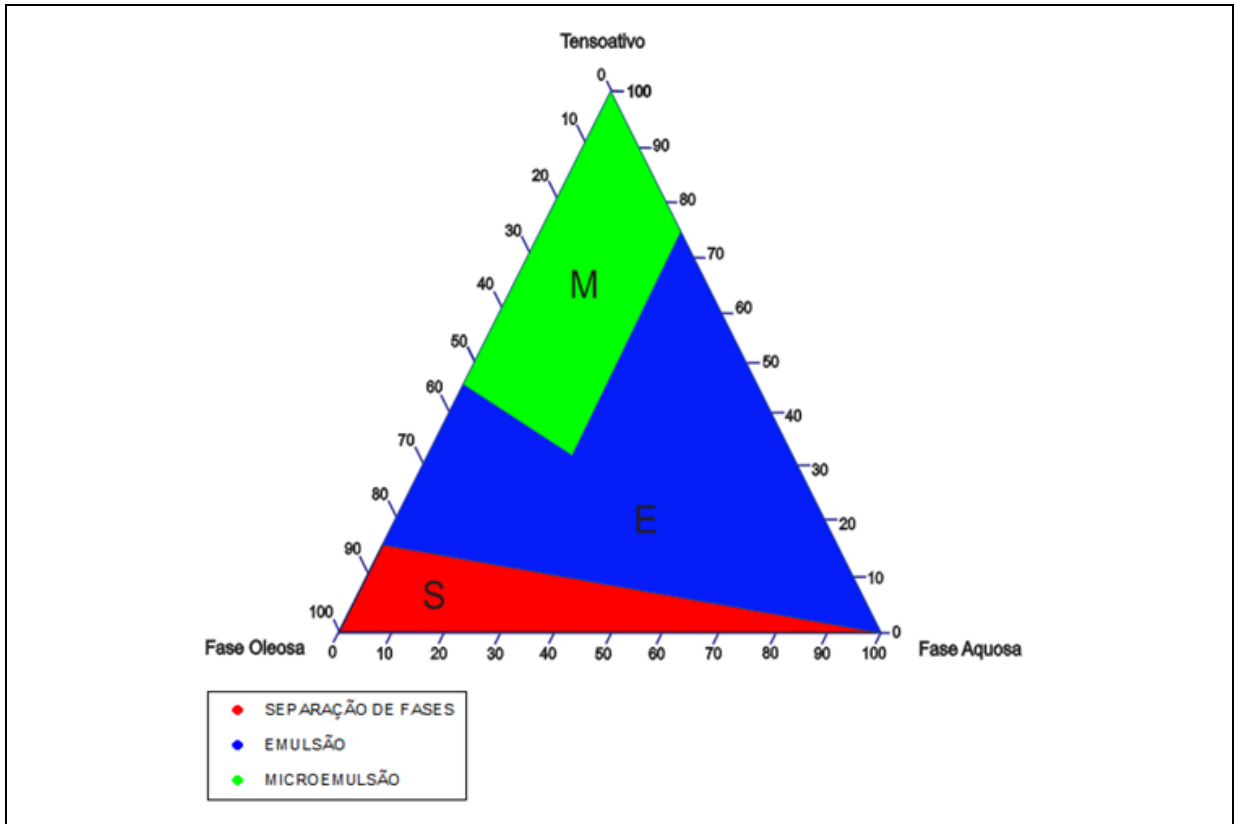
Óleo de Ricino Hidrogenado e Etoxidado (PEG 40)	5	Solúvel
Polietilenoglicol 400 (PEG 400)	5	Solúvel
Monooleato de sorbitano 80 (Span 80)	5	Parcialmente solúvel
Propilenoglicol	5	Insolúvel
Glicerol	5	Insolúvel
Mackaderm microexpress [®]	5	Solúvel
Lauramido propilbetaína (Mackam 1200)	4	Solubilizou
Óleo mineral	5	Insolúvel
Cetiol V	5	Solúvel
Estearato de meila	5	Solúvel

Dos componentes avaliados, foram selecionados o Tween 20, o PEG40, PEG400, Span 80 e Cetiol V para a construção do diagrama de fases pseudo- ternário. Apesar do Span 80 ser parcialmente solúvel ele foi utilizado na formulação, pois, quando o associava aos outros componentes da fórmula ele tornava-se solúvel.

6.1.2 Construção do diagrama de fases pseudo-ternário e seleção da microemulsão

Para a obtenção da microemulsão para veicular adequadamente o ácido retinóico foi necessária a construção de quatro diagramas diferentes. (Figuras 16, 17, 18 e 19)

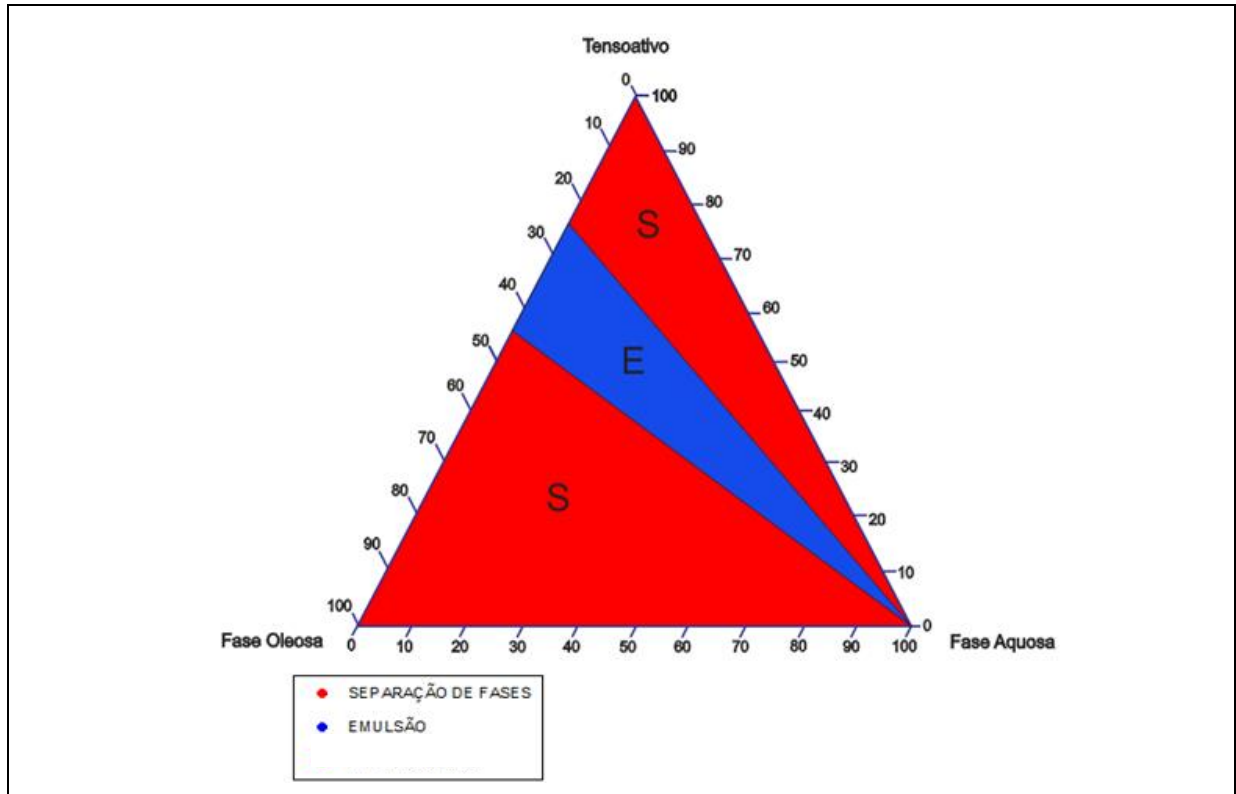
Figura 16. Diagrama nº1, sendo a fase oleosa constituída por cetiol V, os tensoativos Span 80, Tween 20 e PEG 400 (1:1:1) e a fase aquosa constituída por água



Analisando o diagrama número 1 obteve-se sistemas de separação de fases, emulsão e microemulsão, porém, com predomínio de emulsão. Com o aumento nas concentrações de tensoativos/cotensoativos obteve-se sistemas microemulsionados.

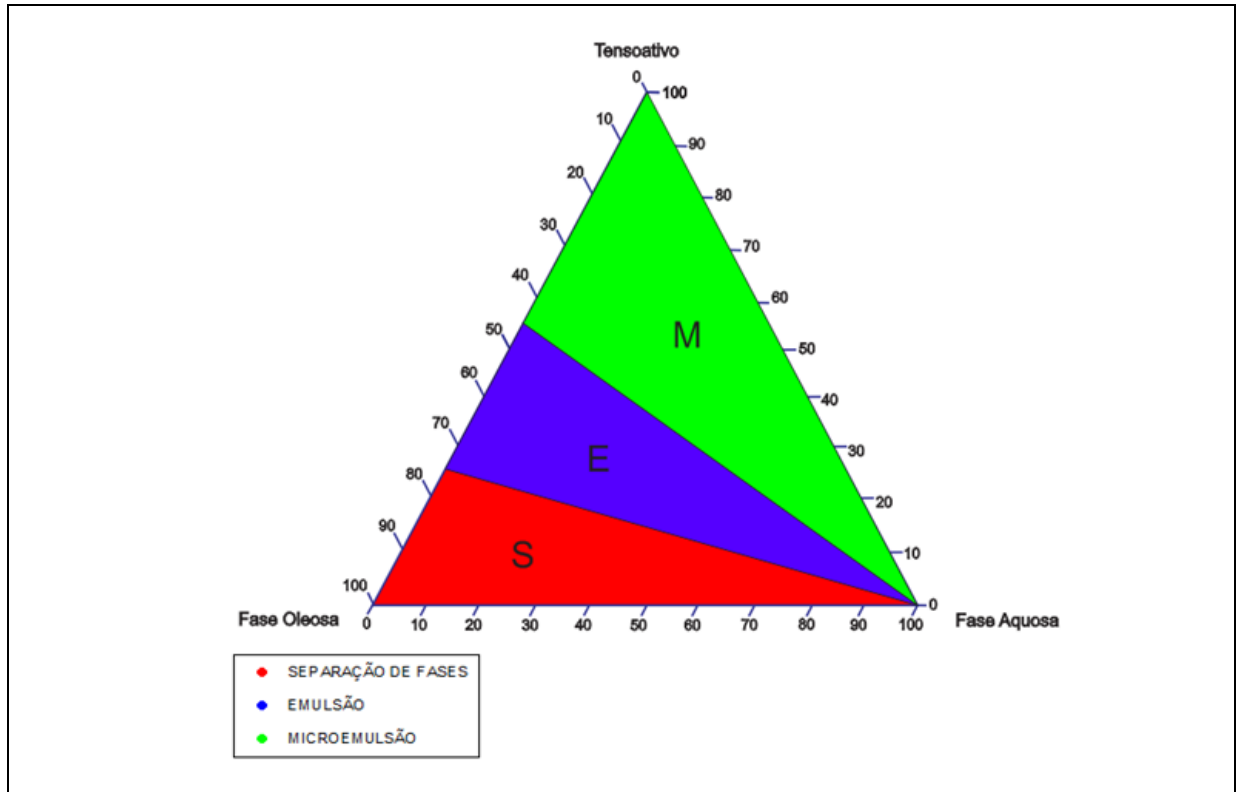
No segundo diagrama (Figura 17) predominou a separação de fases e sistemas emulsionados.

Figura 17. Diagrama nº2, sendo a fase oleosa constituída por cetiol V, os tensoativos Span 80, PEG 400 e Tween 20 (1:2:1) e a fase aquosa constituída por água



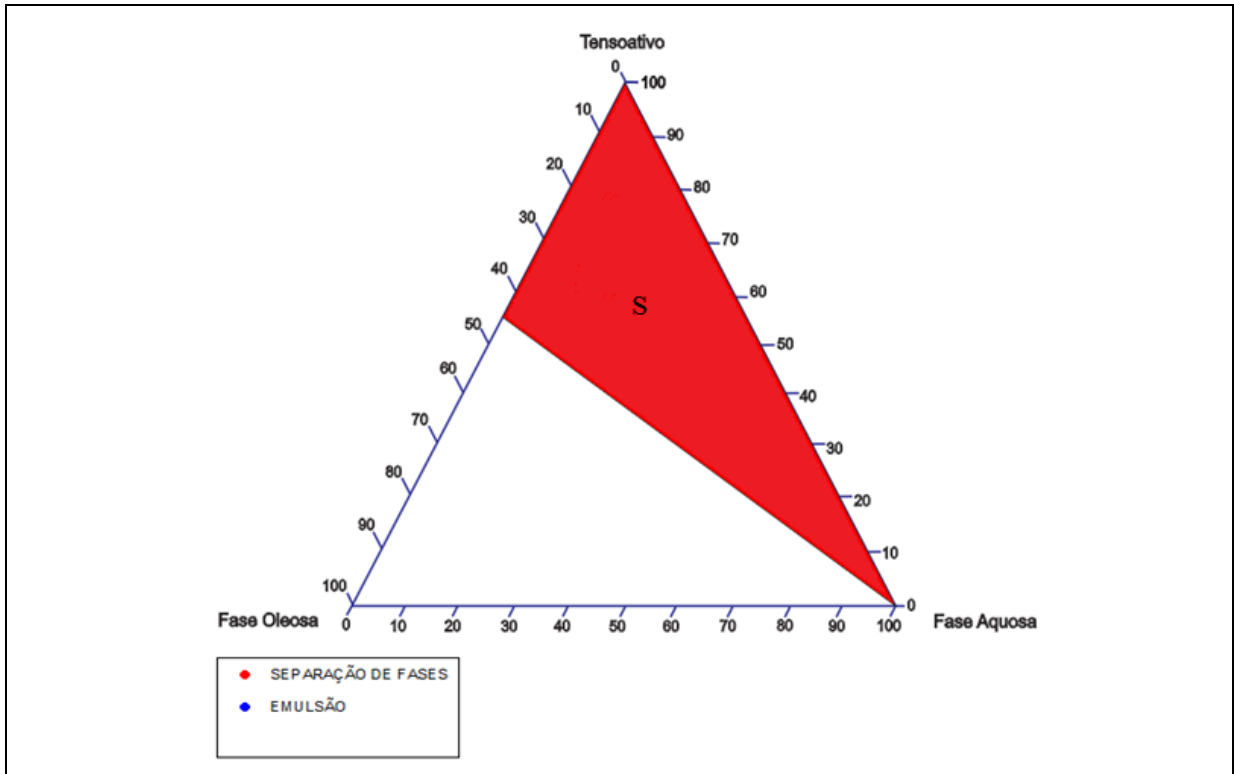
Na figura 18 segue o terceiro diagrama, onde pode ser percebido uma área maior de microemulsão, quando comparada aos diagramas anteriores.

Figura 18. Diagrama n° 3, sendo a fase oleosa constituída por cetiol V, os tensoativos Span 80, Tween 20 e PEG 40 (1:1:1) e a fase aquosa constituída por água



No quarto diagrama (Figura 19), foi adicionado ao sistema o ácido retinóico, porém, houve turvação do sistema na maior parte do diagrama.

Figura 19. Diagrama nº 4, com incorporação do ativo ácido retinóico 1%, sendo a fase oleosa constituída por cetiol V, os tensoativos Span 80, Tween 20, PEG 40 (1:1:1), a fase aquosa constituída por água



Por ter apresentado uma maior região de sistemas microemulsionados, o diagrama de fases pseudo-ternário 3 foi o diagrama escolhido para a seleção de microemulsões. Foram selecionadas 24 composições diferentes de microemulsões, inicialmente analisadas macroscopicamente, para que após os resultados obtidos fosse selecionada a melhor microemulsão para análises posteriores (Tabela 1).

Tabela 1. Composição das 24 microemulsões reproduzidas do diagrama nº3 para escolha da melhor microemulsão. FA: Fase aquosa, T: Tensoativos, FO: Fase Oleosa

Pontos reproduzidos	Composição (%)		
	FA	T	FO
A (6:4)	37,50	37,50	25,00
B (7:3)	13,04	60,87	26,09
C (7:3)	16,67	58,33	25,00
D (7:3)	20,00	56,00	24,00
E (7:3)	25,93	51,85	22,22
F (7:3)	39,39	42,42	18,18
G (7:3)	44,44	38,89	16,67
H (7:3)	50,00	35,00	15,00
I (7:3)	56,52	30,43	13,04
J (7:3)	60,00	28,00	12,00
K (8:2)	13,04	69,57	17,39
L (8:2)	23,08	61,54	15,38
M (8:2)	44,44	44,44	11,11
N (8:2)	54,55	36,36	9,09
O (8:2)	56,52	34,78	8,70
P (8:2)	60,00	32,00	8,00
Q (8:2)	76,74	18,60	4,65
R (9:1)	9,09	81,82	9,09
S (9:1)	16,67	75,00	8,33
T (9:1)	23,08	69,23	7,69
U (9:1)	42,86	51,43	5,71
V (9:1)	44,44	50,00	5,56
X (9:1)	60,00	36,00	4,00
Z (9:1)	76,74	20,93	2,33

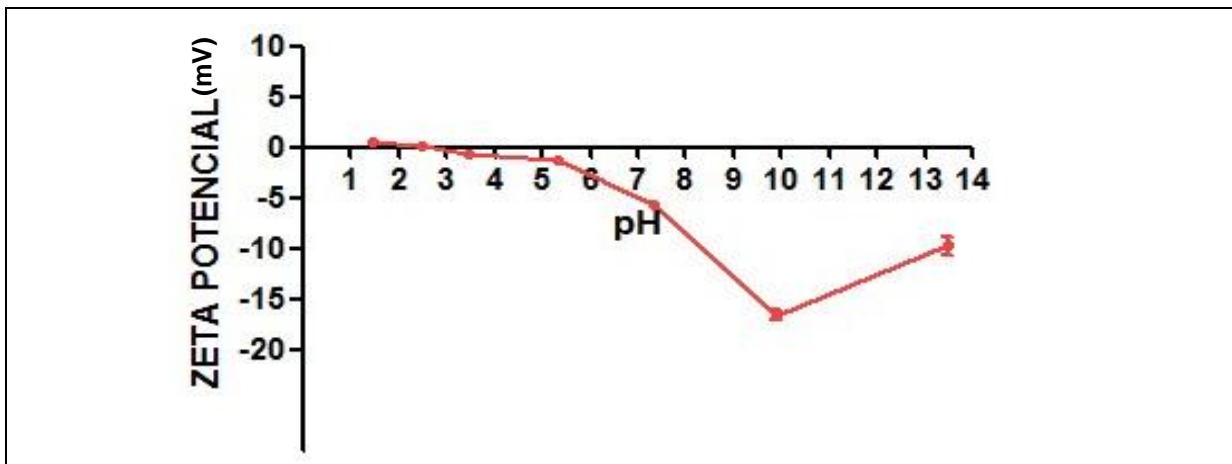
Em cada microemulsão selecionada foi adicionado o ácido retinóico e em quase todos os testes houve dificuldade na incorporação do ativo e na manutenção de um sistema estável. A escolha da microemulsão se deu a partir da precipitação ou não do ativo, que foi analisada por um período de sete dias a partir da data da finalização da microemulsão.

Após esta avaliação inicial, o sistema que permaneceu mais estável por mais tempo foi a microemulsão “R”(Tabela 1), na qual contém a seguinte composição: PEG 40 (26,7%), Cetiol V (8,9%), Span 80 (26,7%), Tween 20 (26,7%), Água (9,95%) e Ácido retinóico (0,99%), que caracteriza uma microemulsão com proporção de tensoativos/cotensoativos e óleo de 9:1 no diagrama de fases nº 3.

Entretanto, mesmo que esta microemulsão tenha se mostrado como a mais estável, ainda era possível observar uma leve turvação do sistema, o que caracteriza uma tendência à precipitação do ativo ou separação de fases. Diante disso, foi realizada uma avaliação do

potencial zeta em função do pH, para que se determinasse o pH de estabilidade do produto, já que o ponto isoelétrico traria uma instabilidade ao sistema. Segue abaixo o gráfico na figura 20.

Figura 20. Gráfico demonstrando a definição do ponto isoelétrico (PIE) do sistema final escolhido (9:1), de composição FA 9,09%, T81,82% E FO 9,09%.



Logo, a partir do gráfico podemos observar que as medidas do pH entre 1 a 3,5 foram as faixas de pH em que o sistema se mostrou mais próximo do ponto isoelétrico. Podemos afirmar, a partir do gráfico, que o pH mais adequado para se manter este produto estável estava na faixa acima de 5,5.

Definida a microemulsão e o ponto isoelétrico, foi adotado como nova estratégia de incorporação a utilização de um solvente orgânico para auxiliar nesse processo, já que de acordo com a Farmacopéia (2010) a tretinoína é praticamente insolúvel em água, solúvel em clorofórmio e metanol, pouco solúvel em éter, muito pouco solúvel em etanol.

Entanto, a solubilidade do ativo em clorofórmio e metanol inviabiliza o estudo, já que se trata de solvente com elevada toxicidade para o objetivo deste estudo. Assim a estratégia traçada foi a de incorporar quantidades seriadas de acetona (C_3H_6O) para auxiliar na solubilidade do ativo, pois se trata de solvente de menor toxicidade e extremamente volátil.

Assim, foram testadas algumas quantidades de acetona, promovendo-se agitação tanto para auxiliar na solubilização do ativo, quanto para que o solvente fosse totalmente evaporado. Para que houvesse o controle da evaporação do solvente em questão, era realizada a pesagem antes de adicioná-lo e de 5 em 5 minutos de agitação, para se conhecer o momento em que o peso reestabelecesse àquele inicial, indicando que o solvente havia evaporado.

Após o uso da acetona, conseguiu-se por fim a obtenção da microemulsão desejada

Podemos observar que um ponto de extrema importância para auxiliar na obtenção da estabilidade deste sistema microemulsionado, além da escolha correta dos componentes, avaliando a solubilidade do ativo, foi o modo de preparo da microemulsão.

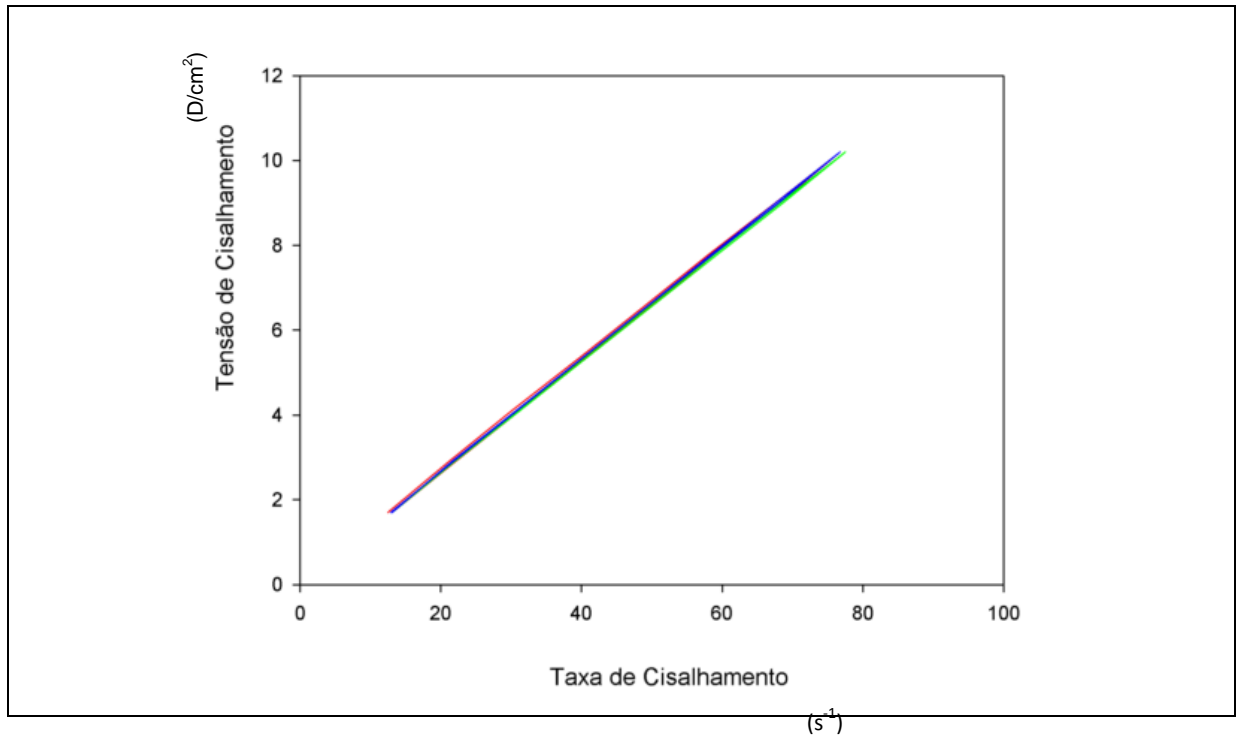
6.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO QUÍMICA DA MICROEMULSÃO SELECIONADA

A microemulsão desenvolvida e selecionada foi submetida a análise de suas características físico químicas, e na tabela 2 é apresentado alguns dos resultados obtidos. Na figura 21, é apresentado o gráfico do comportamento reológico.

Tabela 2. Caracterização físico-química da microemulsão desenvolvida. Os valores são representados pela média e o desvio padrão (n=3)

Parâmetro Físico-químico	Resultado
Ph	6,41 ($\pm 0,1734$)
Condutividade	25,6 ($\pm 3,579$) $\mu\text{s/cm}$
Viscosidade	755,4 cP
Densidade	1,024 ($\pm 0,0018$) g/ml
Tamanho das gotículas	3,426 ($\pm 0,0611$) nm
Índice de polidispersividade	0,189 ($\pm 0,02$)
Potencial Zeta	-0,837 ($\pm 0,2965$) mV

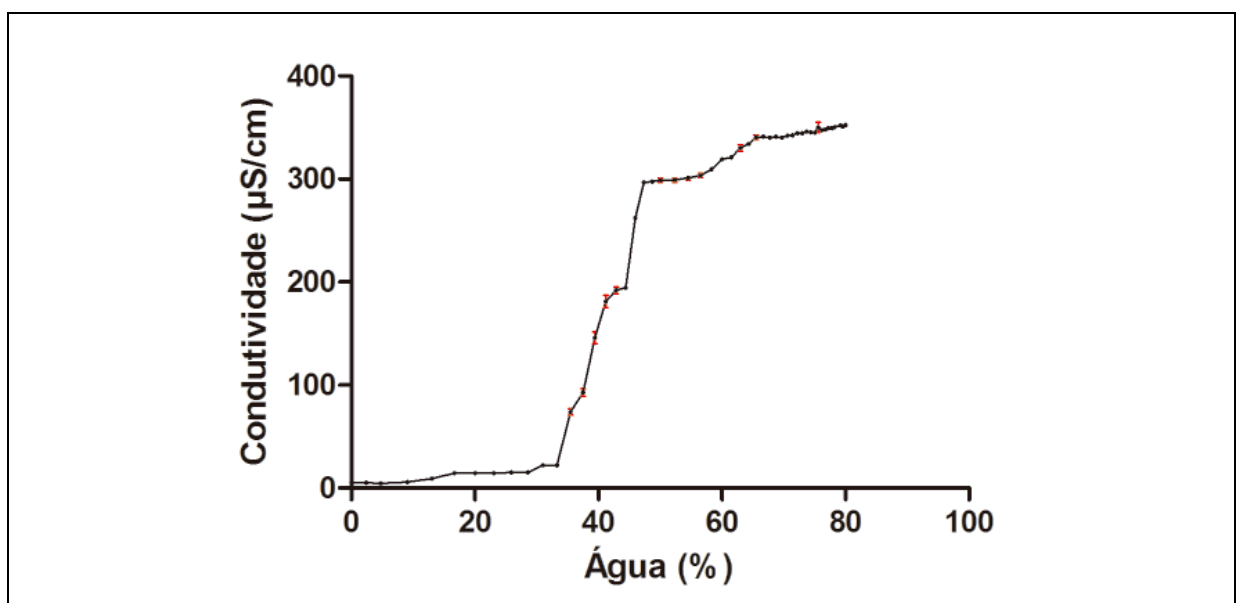
Figura 21. Comportamento reológico da microemulsão desenvolvida



A condutividade foi estudada com mais detalhes na microemulsão e foi realizada uma análise da condutividade em função da adição gradativa de água.

Analisando a figura 22, tendo-se em vista a composição da microemulsão, pode-se concluir que os resultados obtidos sugerem que a microemulsão é do tipo A/O.

Figura 22. Comportamento da condutividade da microemulsão selecionada com a adição gradativa de água. Os valores são representados pela média e desvio padrão.



6.3 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE PRELIMINAR

6.3.1 Centrifugação

Após a submissão da microemulsão ao processo de centrifugação, seguindo os parâmetros descritos na metodologia, a mesma se comportou como um sistema disperso de fase única, ou seja, não houve separação de fases após o processo, e também não houve precipitação de substâncias, mantendo assim suas características macroscópicas inalteradas.

6.4 OBTENÇÃO DA MICROEMULSÃO CONTENDO ÁCIDO RETINÓICO A 1%

Na tabela 3 está apresentada a formulação obtida:

Tabela 3. Formulação da microemulsão contendo ácido retinóico a 1%

Componente	Concentração
Ácido retinóico	200 mg
PEG 40	5,6 g
Cetiol V	1,79 g
SPAN 80	5,9 g
Tween 20	5 g
Água	1,71 g

6.5 DOSEAMENTO DO ÁCIDO RETINÓICO NA MICROEMULSÃO

O teor do ácido retinóico na microemulsão foi determinada por espectrofotometria, conforme descrita na metodologia, e os resultados encontram-se na tabela 4.

Tabela 4. Valores da absorvância da solução padrão, da amostra (microemulsão) e o teor de ácido retinóico contido na amostra

Doseamento do ácido retinóico			
	Padrão	Amostra	Teor (%)
Média	0,683	0,641	93,899
Desvio	(±0,006)	(±0,037)	(±5,368)

6.6 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ÁCIDO RETINÓICO A 1% EM MICROEMULSÃO POR ESPECTOFOTOMETRIA NA REGIÃO UV.

6.6.1 Especificidade e seletividade

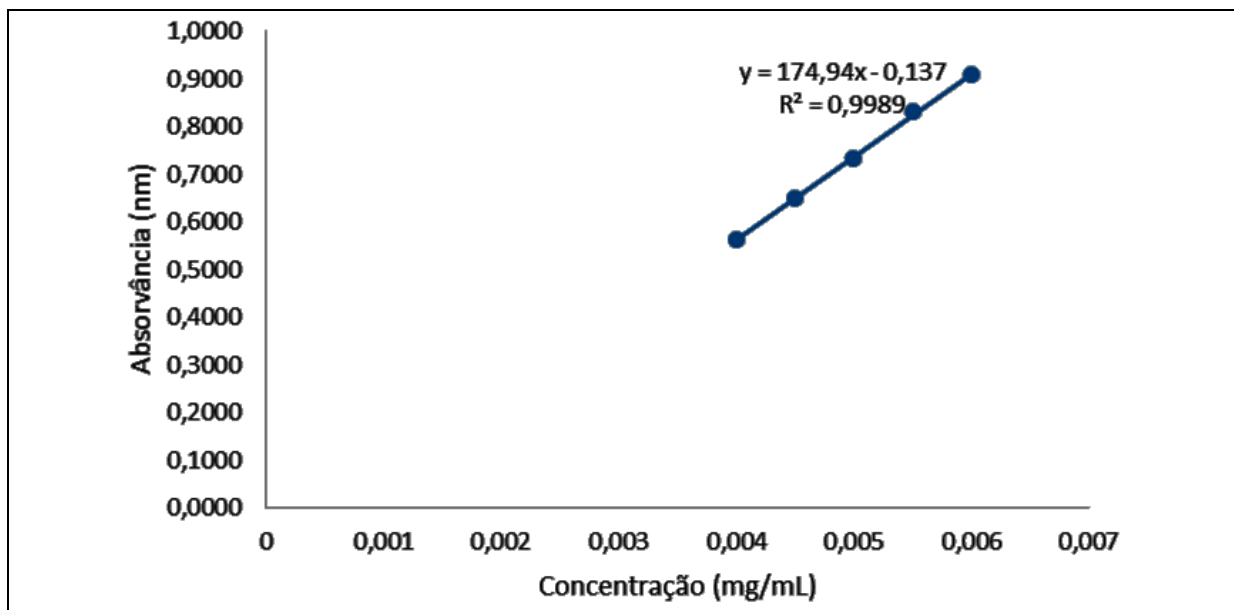
Na tabela 5, segue os resultados da especificidade e seletividade.

Tabela 5. Diferenças entre a absorvância e teor do ácido retinóico nas solução padrão, amostra e placebo

	Padrão	Amostra	Placebo
Média (ABS)	0,68(±0,0148) ABS	0,65 (±0,0055) ABS	0,0 (±0,0002) ABS
D.P.R	2,15	0,86	3,27
Média (%)	97,35% (±0,97)	94,71%(±0,49)	0,09% (±0,0014)
D.P.R	1,01	0,52	1,63

6.6.2 Linearidade

Figura 23. Linearidade do método



A linearidade do método foi mensurada por análise de variância, obtendo-se resultados significativos para linearidade e valores não significativos para desvio de linearidade ($p > 0,05$), coeficiente de determinação (r^2) da curva média igual a 0,9989 e coeficiente de correlação (r) igual a 0,9994. O Intervalo linear foi de 0,004 a 0,006 mg/m; limite de detecção foi de 0,04 μ g/mL e o limite de quantificação foi de 0,127 μ g/mL.

6.6.3 Precisão

6.6.3.1 Repetibilidade (precisão intracorrida)

Na tabela 6, encontram os resultados das médias do teor da amostra de nove determinações com as concentrações de 80%, 100% e 120% realizadas por um analista em um dia (manhã, tarde e noite).

Tabela 6. Teor de ácido retinóico da amostra nas concentrações 80%, 100% e 120%

	80%	100%	120%
Média	98,4% ($\pm 0,071$)	94,03% ($\pm 0,0057$)	96,01% ($\pm 0,0058$)
D.P.R	1,28	0,85	0,68

6.6.3.2 Precisão intermediária

Na tabela 7 são apresentadas as médias dos resultados da precisão intermediária.

Tabela 7. Tabela demonstrando as médias do teor de ácido retinóico da amostra nas concentrações 80%, 100% e 120%, vistas por dois analistas em dois dias diferentes

	80%	100%	120%
Analista 1			
Média	98,82% ($\pm 0,00178$)	99,14% ($\pm 0,0049$)	93,28% ($\pm 0,009$)
D.P.R	0,319	0,7	1,12
Analista 2			
Média	96,62% ($\pm 0,010$)	91,61% ($\pm 0,015$)	89,64% ($\pm 0,006$)
D.P.R	1,9	2,3	0,84

6.6.3.3 Reprodutibilidade

Na tabela 8 são apresentadas as médias dos resultados da reprodutibilidade.

Tabela 8. Teor do ácido retinóico da amostra nas concentrações 80%, 100% e 120%, observadas por dois analistas em dois laboratórios

	80%	100%	120%
Analista 1			
Média	98,7% ($\pm 0,0012$)	99,28% ($\pm 0,005$)	93,28% ($\pm 0,009$)
D.R.P	0,32	0,706	1,121
Analista 2			
Média	104,26% ($\pm 0,015$)	98,29% ($\pm 0,01$)	97,3% ($\pm 0,01$)
D.R.P	2,57	1,5	1,18

6.6.4 Exatidão

Na tabela 9 estão os resultados da exatidão.

Tabela 9. Teor da amostra contendo ácido retinoico e a exatidão nas concentrações 80%, 100% e 120%

	80%	100%	120%
Média	80,08%	100,73%	122,83%
Desvio	0,25	0,15	0,66
D.P.R	0,31	0,15	0,53
Exatidão	100,09	100,73	102,36

* $t_{calculado}$ (0,3242) $t_{tabelado}$ (2,9199)

** $t_{calculado}$ (0,0068) $t_{tabelado}$ (2,9199)

*** $t_{calculado}$ (0,0245) $t_{tabelado}$ (2,9199)

6.6.5 Robustez

Nas tabelas 10, 11 e 12 é apresentado o comportamento da robustez em relação a três variáveis: variação no preparo da amostra, temperatura e comprimento de onda.

Tabela 10. Teor de ácido retinóico da amostra nos tempos 0 e 60'

	Variação no preparo da Amostra		
	Média	Desvio	D.P.R
Tempo 0	92,6%	0,006	0,939
Tempo 60'	92,32%	0,002	0,309

$t_{calculado}$ (0,3614) $t_{tabelado}$ (2,9199)

Tabela 11. Teor de ácido retinóico da amostra em temperatura ambiente e 10' em 50 °C

	Variação de Temperatura		
	Média	Desvio	D.P.R
Temperatura Ambiente	91,76%	0,005	0,816
10' em 50 °C	94,88%	0,015	2,279

$t_{calculado}$ (0,0511) $t_{tabelado}$ (2,9199)

Tabela 12. Teor de ácido retinóico da amostra em relação a diferenças no comprimento de onda

Λ	Variação +/-2 nm		
	Média	Desvio	D.P.R
363	90,48%	0,003	0,494
365	92,18%	0,005	0,816
367	92,18%	0,005	0,798

$F_{calculado}$ (0,3591) $F_{tabelado}$ (5,1433)

6.7 ESTUDO DE PERMEAÇÃO CUTÂNEA *IN VITRO*

A avaliação da permeação cutânea foi realizada com o objetivo de avaliar a quantidade de fármaco que permeava através da pele de orelha de porco. O teor do fármaco permeado foi de apenas 0,86% para o período de 6 horas de aplicação.

6.8 AVALIAÇÃO CLÍNICA DA EFICÁCIA DO *PEELING* DE ÁCIDO RETINÓICO 1% EM MICROEMULSÃO EM PACIENTES PORTADORAS DE MELASMA

Observou-se por meio das comparações intragrupos que a cada avaliação houve redução significativa do índice MASI nos três grupos, indicando efeito de todos os tratamentos, inclusive do placebo, contra o melasma (Tabela 13). Entretanto, verificou-se por meio das comparações intergrupos que apenas o grupo tratado com *peeling* de ácido retinóico 1% em microemulsão diferiu significativamente do grupo placebo nas avaliações após a *baseline*, demonstrando que o *peeling* com ácido retinóico a 1% em microemulsão é mais eficiente do que o método convencional (*peeling* com ácido retinóico a 1%) no tratamento do melasma. Em termos percentuais, observou-se que, após 60 dias, o *peeling* com ácido retinóico a 1% em microemulsão proporcionou redução média de 62% no índice MASI, contra 26% do tratamento convencional e 12% do placebo.

Tabela 13. Comparação entre os tratamentos e acordo com o índice MASI e os períodos de avaliação

Grupos	Índice MASI					p-valor*
	Baseline	15 dias	30 dias	45 dias	60 dias	
AR1%	15,7 ^a ± 10,4	14,8 ^{b,AB} ± 10,3	13,9 ^{c,A} ± 10,1	12,8 ^{d,A} ± 9,8	11,6 ^{e,A} ± 9,3	< 0,001
AR1%M	14,1 ^a ± 8,5	11,0 ^{b,A} ± 7,3	8,4 ^{c,B} ± 6,28	6,9 ^{d,B} ± 5,2	5,3 ^{e,B} ± 4,5	< 0,001
Placebo	18,7 ^a ± 10,2	18,0 ^{b,B} ± 10,4	17,5 ^{c,A} ± 10,1	16,8 ^{d,A} ± 9,6	16,4 ^{e,A} ± 9,53	< 0,001
p-valor [†]	0,309	0,043	0,005	0,001	< 0,001	

* Teste de Friedman; † Teste Kruskal-Wallis.

MASI, índice de área e gravidade do melasma; AR1%, ácido retinóico 1%; AR1%M, ácido retinóico 1% em microemulsão.

Valores seguidos por letras diferentes (minúscula na horizontal e maiúscula na vertical) são estatisticamente diferentes pelos testes de Wilcoxon e Mann-Whitney, respectivamente.

O tratamento com ácido retinóico 1% em microemulsão foi o único capaz de melhorar todos os aspectos da qualidade de vida dos portadores de melasma, exceto o senso de liberdade os dos portadores de melasma (Tabela 14); o tratamento convencional só não melhorou o aspecto depressão e o placebo promoveu melhora apenas em quatro aspectos (aparência, frustração, constrangimento e demonstração de afeto). Além disso, o tratamento

com ácido retinóico 1% em microemulsão foi mais eficiente do que o tratamento convencional em três aspectos (frustração, constrangimento e relacionamento) e do que o placebo em oito aspectos (aparência, frustração, constrangimento, sentimento depressivo, relacionamento, atração, sentimento de importância e senso de liberdade). Já o tratamento convencional foi mais eficiente do que o placebo em apenas dois aspectos (sentimento de importância e senso de liberdade).

Na figura 25 está apresentado os resultados do aspecto clínico das pacientes desse estudo.

Tabela 14. Comparação entre os tratamentos, de acordo com o índice MelasQoL e os períodos de avaliação

Item	Zero	Pós-tratamento	p-valor*
1. Aparência			
AR1%	5,70 ± 1,13	4,80 ± 0,83 ^{ab}	< 0,001
AR1%M	5,90 ± 1,02	3,90 ± 1,45 ^a	< 0,001
Placebo	5,60 ± 1,19	5,15 ± 1,39 ^b	0,014
p-valor [†]	0,726	0,005	
2. Frustração			
AR1%	5,40 ± 1,35	4,75 ± 1,12 ^a	0,001
AR1%M	6,00 ± 0,97	3,65 ± 1,10 ^b	< 0,001
Placebo	5,65 ± 1,04	5,40 ± 0,94 ^a	0,025
p-valor [†]	0,327	< 0,001	
3. Constrangimento			
AR1%	5,35 ± 1,23	4,60 ± 0,88 ^a	0,001
AR1%M	5,50 ± 1,32	3,45 ± 1,23 ^b	< 0,001
Placebo	5,25 ± 1,33	4,90 ± 1,21 ^a	0,008
p-valor [†]	0,794	0,001	
4. Depressão			
AR1%	3,60 ± 1,54	3,45 ± 1,36 ^{ab}	0,083
AR1%M	3,70 ± 1,69	2,75 ± 1,48 ^a	0,007
Placebo	4,25 ± 1,71	4,25 ± 1,71 ^b	1,000
p-valor [†]	0,333	0,011	
5. Relacionamento			
AR1%	4,20 ± 1,36	3,80 ± 1,15 ^a	0,005
AR1%M	4,30 ± 1,22	2,60 ± ,50 ^b	0,001
Placebo	3,95 ± 1,40	3,85 ± 1,31 ^a	0,157
p-valor [†]	0,694	0,013	
6. Desejo			
AR1%	4,50 ± 1,61	3,95 ± 1,23 ^a	0,001
AR1%M	4,50 ± 0,89	3,75 ± 1,02 ^a	0,004
Placebo	3,95 ± 1,85	3,80 ± 1,70 ^a	0,083
p-valor [†]	0,415	0,832	
7. Demonstração de afeto			
AR1%	3,70 ± 1,90	3,45 ± 1,57 ^a	0,025
AR1%M	4,05 ± 1,67	3,45 ± 1,32 ^a	0,010
Placebo	3,85 ± 1,79	3,65 ± 1,57 ^a	0,046
p-valor [†]	0,736	0,887	

Tabela 14. Comparação entre os tratamentos, de acordo com o índice MelasQoL e os períodos de avaliação.

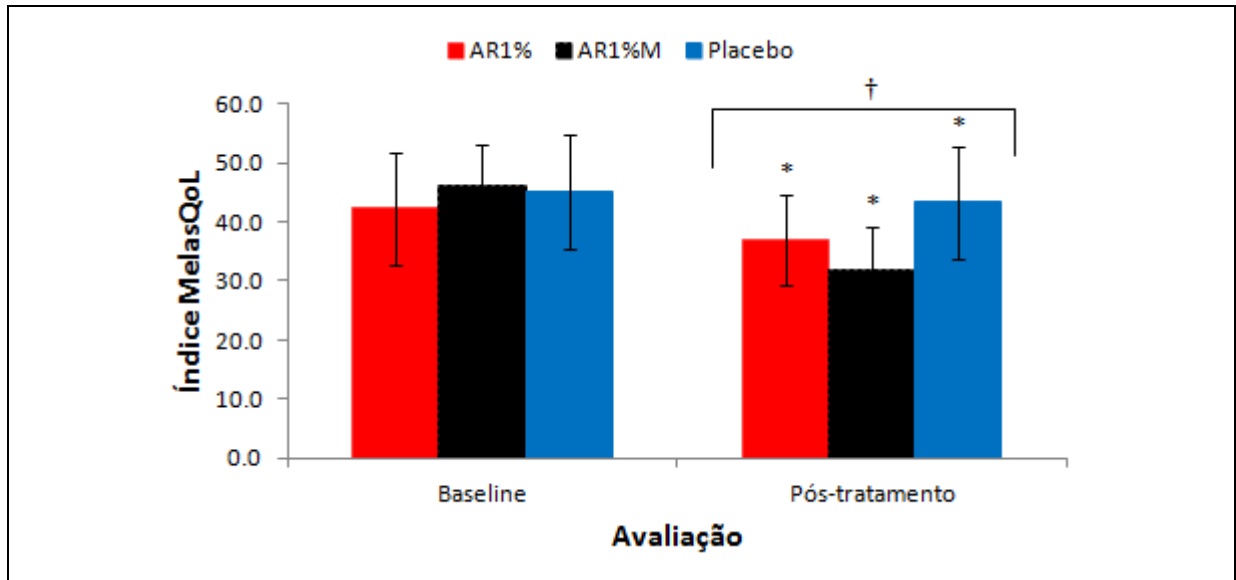
Item	Zero	Pós-tratamento	p-valor*
(continua)			
8. Atração			
AR1%	4,00 ± 2,03	3,70 ± 1,698 ^{ab}	0,014
AR1%M	5,05 ± 1,10	3,10 ± 1,25 ^a	< 0,001
Placebo	4,70 ± 1,98	4,55 ± 1,88 ^b	0,083
p-valor [†]	0,211	0,025	
9. Sentimento de importância			
AR1%	3,10 ± 1,71 ^a	2,45 ± 1,43 ^a	0,006
AR1%M	3,85 ± 1,31 ^{ab}	2,40 ± 0,94 ^a	< 0,001
Placebo	4,30 ± 1,53 ^b	4,25 ± 1,52 ^b	0,564
p-valor [†]	0,038	< 0,001	
10. Senso de liberdade			
AR1%	3,55 ± 1,88	2,80 ± 1,51 ^a	0,002
AR1%M	4,00 ± 1,26	2,70 ± 1,13 ^a	0,083
Placebo	4,35 ± 1,79	4,20 ± 1,70 ^b	0,083
p-valor [†]	0,289	0,006	
Índice MelasQoL			
AR1%	42,40 ± 9,53	37,00 ± 7,61 ^a	< 0,001
AR1%M	46,15 ± 6,95	32,00 ± 7,04 ^b	< 0,001
Placebo	45,20 ± 9,80	43,30 ± 9,39 ^c	< 0,001
p-valor [†]	0,320	< 0,001	

MelasQoL, *Melasma Quality of Life Scale*; AR1%, ácido retinóico 1%; AR1%M, ácido retinóico 1% em microemulsão. * Teste Wilcoxon. † Teste Kruskal-Wallis.

Valores seguidos por letras diferentes na vertical são estatisticamente diferentes pelo teste de Mann-Whitney.

Foi observada redução significativa do índice MelasQoL (soma de todos os aspectos) nos três grupos, indicando efeito de todos os tratamentos, inclusive do placebo, na qualidade de vida global dos portadores de melasma (Tabela 14 e Figura 24). Entretanto, o *peeling* de ácido retinóico 1% em microemulsão foi o tratamento que promoveu o maior efeito na qualidade de vida, seguido pelo tratamento convencional com ácido retinóico. Em termos percentuais, observou-se que, após o tratamento, o *peeling* com ácido retinóico a 1% em microemulsão proporcionou redução média de 30% no índice MelasQoL, contra 13% do tratamento convencional e apenas 4% do placebo.

Figura 24. Efeito dos tratamentos sobre a qualidade de vida dos portadores de melasma

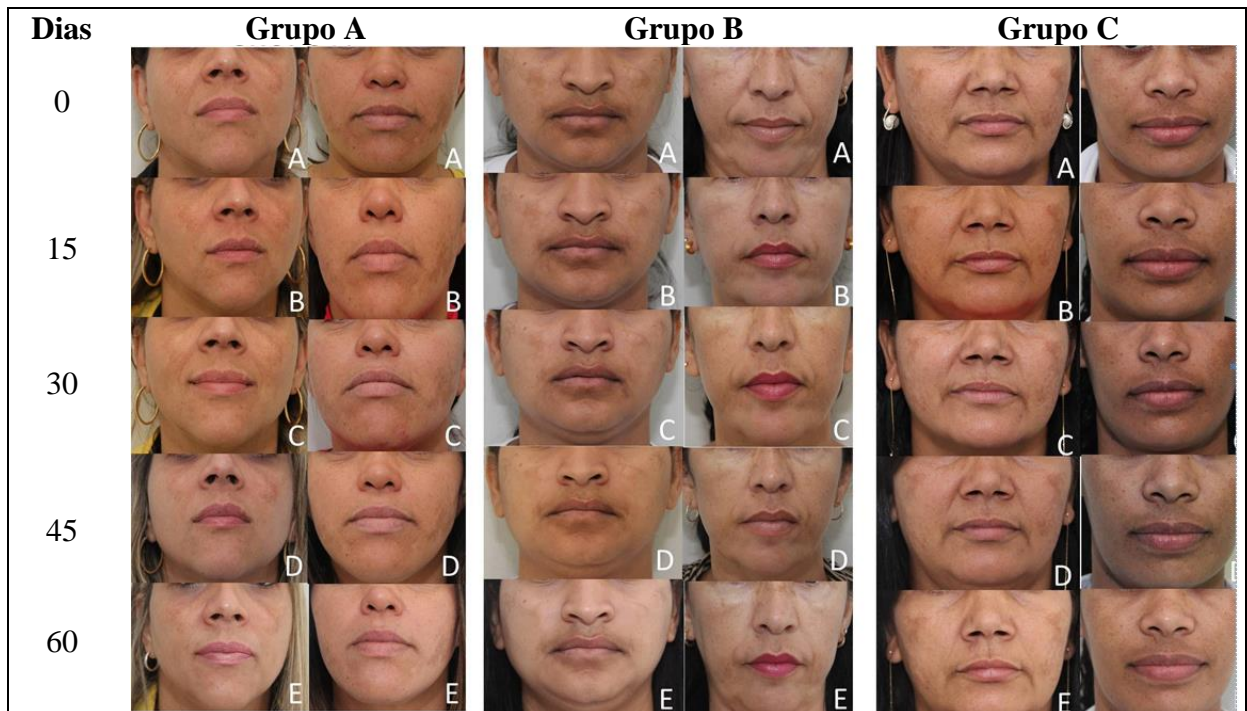


MelasQoL, *Melasma Quality of Life Scale*; AR1%, ácido retinóico 1%; AR1%M, ácido retinóico 1% em microemulsão.

* p-valor < 0,001 (Teste Wilcoxon) em comparação com a *baseline*.

† p-valor < 0,001 (Teste Kruskal-Wallis) para comparação intergrupos: AR1% ≠ AR1%M e placebo; AR1%M ≠ placebo (teste Mann-Whitney).

Figura 25. Aspecto clínico da face das pacientes após aplicação dos peelings e placebo; A. Peeling ácido retinóico a 1% (AR1%); B. Peeling ácido retinóico a 1% em microemulsão (AR 1%M) e C. Placebo



6.8.1. Determinação hemato-bioquímica

Em relação aos exames laboratoriais, não houve alterações significativas entre o dia zero e após o tratamento (dia 60).

As tabelas 15 a 23 conem um comparativo dos os exames hematobioquímicos nos grupos A, B e C nos dias zero e 60.

Tabela 15. Grupo A – Comparação dos exames (Hb, Ht, L, PLA) nos dias zero e 60.

Pacientes	Hb ₀	Hb ₆₀	Ht ₀	Ht ₆₀	L ₀	L ₆₀	PLA ₀	PLA ₆₀
1	14,1	14	40	45	6000	6000	199000	200000
2	14,3	14,7	41	42	8000	7200	202000	205000
3	14	14,8	42	45	5600	7000	165000	169000
4	13,5	14,6	39	43	7900	6200	206000	213000
5	13,2	13,4	39	40	5600	5700	241000	258000
6	11,8	12,7	35	38	5800	5500	275000	242000
7	13	12,3	38	37	9300	5400	262000	256000
8	12,5	11,6	38	35	7300	7900	381000	351000
9	14,8	14,8	42	44	5400	7000	151000	153000
10	15,1	14	44	42	6100	6500	241000	276000
11	9,9	10,8	31	33	6600	7200	390000	413000
12	13,5	13,2	40	39	8100	6400	231000	243000
13	13,2	13,1	39	39	6300	7600	273000	300000
14	12,5	11,9	37	36	6000	6600	235000	199000
15	14,2	14,3	42	43	5300	6300	205000	225000
16	13,4	13,8	40	41	6200	5000	158000	150000
17	13,9	13,6	41	40	10700	9800	285000	237000
18	13,6	13,5	41	40	6500	9200	219000	217000
19	14,2	13,9	42	41	5500	6300	249000	257000
20	12,9	13,1	37	38	6100	4800	216000	220000
<i>t_{calculado}</i>	0,4281		0,0896		0,4586		0,5	

t_{tabelado}: 1,7295

Tabela 16. Grupo A – Comparação dos exames (COL, HDL, LDL, VLDL, TRI) nos dias zero e 60.

Pacientes	COL ₀	COL ₆₀	HDL ₀	HDL ₆₀	LDL ₀	LDL ₆₀	VLDL ₀	VLDL ₆₀	TRI ₀	TRI ₆₀
1	160	160	42	42	96	96	22	24	109	111,2
2	155	171	45	58	85	90	25	23	126,6	113
3	221	241	50	51	158	175	13	15	66	77
4	173	229	62	76	99	147	12	6	58	32
5	149	169	38	43	99	115	12	11	60	56
6	165	173	43	42	109	119	13	12	65	61
7	148	178	45	52	86	107	17	19	83	96
8	160	145	59	47	88	85	13	13	67	65
9	213	254	55	61	141	166	17	27	85	134
10	206	187	44	31	136	136	26	20	132	100
11	164	160	51	54	94	94	19	12	93	60
12	156	166	57	59	73	90	26	17	128	85
13	181	169	61	49	102	101	18	19	89	97
14	175	155	69	71	88	71	18	13	91	63
15	125	144	38	45	76	85	11	14	57	72
16	189	190	50	49	123	124	16	17	81	84
17	149	134	47	43	88	81	14	10	68	48
18	195	176	84	77	93	74	18	25	88	126
19	175	202	42	50	94	124	39	28	196	140
20	139	139	68	63	56	62	15	14	75	71
<i>t</i> _{calculado}		0,0747		0,3562		0,0194		0,1475		0,1452

*t*_{tabelado} 1,7291

Tabela 17. Grupo A – Comparação dos exames (F.A, GGT, TGO, TGP) nos dias zero e 60.

Pacientes	F.A. ₀	F.A. ₆₀	GGT ₀	GGT ₆₀	TGO ₀	TGO ₆₀	TGP ₀	TGP ₆₀
1	47	45	50	50	22	19	30	22
2	97	95	31	22	24	48	28	44
3	50	50	44	36	22	20	30	33
4	50	54	29	31	17	20	27	29
5	98	90	53	80	31	34	41	68
6	80	69	24	29	24	22	28	20
7	78	59	16	18	22	21	20	33
8	75	69	23	21	21	22	19	22
9	53	56	24	25	28	22	28	22
10	75	63	36	49	33	34	42	37
11	86	76	11	10	21	19	17	14
12	45	49	17	17	19	18	19	20
13	50	45	21	18	29	25	32	30
14	61	58	20	18	23	20	19	24
15	56	53	13	13	22	18	21	18
16	73	72	15	17	27	33	27	33
17	78	75	51	41	29	24	23	24
18	71	64	17	16	22	23	27	18
19	77	71	21	19	26	27	27	35
20	46	38	25	25	19	19	26	22
<i>t</i> _{calculado}	0,0007		0,3487		0,4034		0,185	

*t*_{tabelado} 1,7291

Tabela 18. Grupo B – Comparação dos exames (Hb, Ht, L, PLA) nos dias zero e 60.

Pacientes	Hb ₀	Hb ₆₀	Ht ₀	Ht ₆₀	L ₀	L ₆₀	PLA ₀	PLA ₆₀
1	14,2	13,4	42	41	7900	6700	322000	270000
2	13,2	12,7	38	37	5600	5600	232000	245000
3	13,7	13,4	41	40	5700	5600	250000	278000
4	13,4	13,4	39	39	7400	6100	228000	223000
5	13,4	13	40	39	9100	6400	257000	218000
6	13,2	12,8	39	38	4100	79000	161000	185000
7	12,9	12,6	39	37	7100	5900	214000	242000
8	14,8	14,6	43	43	8600	9300	303000	310000
9	13,1	13,3	38	39	9400	8600	289000	314000
10	13,9	13,3	41	40	7900	7300	150000	150000
11	12,9	12,9	38	39	5900	4600	292000	228000
12	14,3	14,1	42	41	5500	6200	293000	257000
13	13,3	13,1	40	40	5800	6300	192000	187000
14	14,7	14,7	44	44	1750	1750	324000	324000
15	12,9	12,8	38	39	5000	5000	185000	185000
16	13,9	13,5	42	39	9700	10300	202000	215000
17	13,2	13,2	39	39	6400	6400	242000	242000
18	12,8	12,8	38	38	9500	9500	285000	285000
19	14,3	13,4	42	40	7200	8300	223000	211000
20	13	13	39	39	9400	9600	179000	330000
<i>t</i> _{calculado}		0,0004		0,0151		0,1838		0,3493

*t*_{tabelado} 1,7291

Tabela 19. Grupo B – Comparação dos exames (COL, HDL, LDL, VLDL, TRI) nos dias zero e 60.

Pacientes	COL ₀	COL ₆₀	HDL ₀	HDL ₆₀	LDL ₀	LDL ₆₀	VLDL ₀	VLDL ₆₀	TRI ₀	TRI ₆₀
1	194	172	56	46	113	96	25	30	125	152
2	98	154	46	45	41	101	11	8	54	39
3	177	184	42	42	117	126	18	16	88	81
4	153	162	55	58	82	90	16	14	80	70
5	168	159	45	50	101	98	22	11	111	53
6	173	174	46	48	110	118	17	8	86	41
7	156	142	58	48	82	73	16	21	80	107
8	187	189	47	51	116	113	24	25	119	126
9	108	120	48	48	47	58	13	14	67	70
10	181	196	44	43	119	142	18	11	92	56
11	249	240	80	85	129	124	40	31	201	157
12	203	219	52	57	135	147	16	15	79	176
13	176	132	45	42	122	80	9	10	46	50
14	148	148	40	40	100	100	10	10	80	850
15	196	180	60	54	120	114	16	12	78	61
16	175	195	53	59	101	107	21	29	107	146
17	176	176	30	30	115	115	31	31	156	156
18	148	148	39	39	101	101	8	8	41	41
19	152	154	25	31	93	108	34	15	170	76
20	242	173	60	52	168	106	14	15	72	76
<i>t</i> _{calculado}	0,3532		0,448		0,4816		0,0621		0,2115	

*t*_{tabela} 0 1,7291

Tabela 20. Grupo B – Comparação dos exames (F.A, GGT, TGO, TGP) nos dias zero e 60.

Pacientes	F.A. ₀	F.A. ₆₀	GGT ₀	GGT ₆₀	TGO ₀	TGO ₆₀	TGP ₀	TGP ₆₀
1	56	51	28	22	22	24	23	30
2	73	59	52	31	27	21	54	35
3	62	54	15	13	23	24	27	22
4	70	61	13	10	27	23	18	27
5	79	79	57	47	23	26	21	24
6	70	66	25	11	24	20	26	15
7	57	53	13	14	22	21	20	26
8	72	72	35	31	33	33	36	44
9	47	54	27	29	20	19	22	27
10	81	83	56	45	27	26	30	29
11	61	50	14	10	16	18	11	23
12	80	178	86	125	37	27	62	42
13	60	52	54	50	23	10,8	32	34
14	70	70	37	37	26	26	25	25
15	87	82	77	71	32	28	41	39
16	48	50	31	19	24	21	28	27
17	67	67	16	16	24	24	38	38
18	56	56	31	31	22	22	23	23
19	69	74	45	54	26	31	34	38
20	82	83	19	18	23	18	18	29
<i>t</i> _{calculado}	0,3275		0,1916		0,0288		0,4202	

*t*_{tabelado} 1,7291

Tabela 21. Grupo C – Comparação dos exames (Hb, Ht, L, PLA) nos dias zero e 60.

Pacientes	Hb ₀	Hb ₆₀	Ht ₀	Ht ₆₀	L ₀	L ₆₀	PLA ₀	PLA ₆₀
1	13,8	14,4	42	43	7800	7805	229000	239000
2	13,1	12,1	39	38	7100	7190	232000	262000
3	12,7	11,5	39	37	5200	5300	231000	251000
4	13	12,6	38	38	8400	7800	190000	180000
5	14,4	13,5	42	42	7500	7900	253000	243000
6	12,4	12,2	38	38	7000	6800	314000	304000
7	14,2	14,5	42	42	6200	6400	199000	189000
8	14	14,3	41	41	6400	6500	315000	325000
9	14,6	14,8	43	43	7900	8000	266000	256000
10	13,3	13,2	40	40	6600	7000	280000	270000
11	13,6	13	41	41	8800	8500	288000	298000
12	13,5	12,9	41	40	1020	9000	305000	325000
13	14,3	14,1	42	41	5000	4550	197000	187000
14	14,1	14,5	42	43	6700	6800	290000	280000
15	14	14,3	41	41	4800	4800	237000	227000
16	14,3	14,6	42	42	5000	5400	217000	207000
17	12,3	12,7	36	36	6800	7100	258000	268000
18	13,1	12,8	40	40	9200	8800	310000	300000
19	13,4	12,9	40	40	7700	7200	353000	343000
20	14,7	14,8	43	43	8500	8600	348000	368000
<i>t</i> _{calculado}	0,0998		0,1649		0,1732		0,4372	

*t*_{tabelado} 1,7291

Tabela 22. Grupo C – Comparação dos exames (COL, HDL, LDL, VLDL, TRI) nos dias zero e 60.

Pacientes	COL ₀	COL ₆₀	HDL ₀	HDL ₆₀	LDL ₀	LDL ₆₀	VLDL ₀	VLDL ₆₀	TRI ₀	TRI ₆₀
1	194	195	71	61	128	106	21	17	106	84
2	181	186	88	90	52	75	28	18	141	88
3	196	186	50	48	135	130	19	16	95	81
4	133	123	78	68	33	33	22	22	111	111
5	198	188	82	78	100	99	13	17	67	86
6	199	189	39	49	117	122	42	38	210	190
7	179	168	64	74	92	98	35	17	176	86
8	208	199	42	52	144	144	22	22	112	112
9	187	177	50	49	120	120	17	17	83	83
10	158	168	62	28	97	80	19	16	97	79
11	135	126	29	30	65	83	32	23	159	116
12	216	208	63	62	146	133	16	20	85	101
13	193	185	60	59	68	113	25	20	124	100
14	183	173	51	51	111	118	22	14	111	71
15	169	159	90	89	90	55	17	24	86	120
16	205	204	47	49	133	141	15	17	73	85
17	202	198	62	63	121	126	47	14	237	70
18	129	139	45	48	87	72	8	12	41	60
19	201	201	37	39	145	120	40	44	199	219
20	174	154	47	47	99	114	13	13	66	67
<i>t</i> _{calculado}	0,0017		0,2952		0,4952		0,0473		0,0437	

*t*_{tabelado} 1,7291

Tabela 23. Grupo C – Comparação dos exames (F.A, GGT, TGO, TGP) nos dias zero e 60

Pacientes	F.A. ₀	F.A. ₆₀	GGT ₀	GGT ₆₀	TGO ₀	TGO ₆₀	TGP ₀	TGP ₆₀
1	65	65	12	16	24	18	20	29
2	56	55	16	12	26	25	31	24
3	70	63	23	20	27	26	26	19
4	73	73	104	104	40	40	52	52
5	41	33	20	17	27	29	31	30
6	79	78	30	29	23	19	30	32
7	81	75	47	39	23	17	24	33
8	59	59	35	35	30	30	19	19
9	60	60	29	29	26	26	35	35
10	54	57	12	11	25	25	25	25
11	63	52	33	23	25	18	34	30
12	66	69	21	22	27	20	29	27
13	55	46	27	43	24	23	25	40
14	55	59	20	16	20	19	22	26
15	62	52	16	15	32	23	32	24
16	61	62	22	26	22	21	24	34
17	55	57	53	38	37	43	42	80
18	69	67	35	26	24	19	28	30
19	78	74	33	28	18	16	16	26
20	71	74	16	18	30	23	30	33
<i>t</i> _{calculado}	0,0286		0,105		0,0037		0,0631	

*t*_{tabelado} 1,7291

7 *Discussão*

7.1 OBTENÇÃO DAS MICROEMULSÕES CONTENDO ÁCIDO RETINÓICO 1,0%

7.1.1 Teste de solubilidade do ativo

A solubilidade do ativo nos componentes da formulação é procedimento importante para se iniciar o desenvolvimento de uma formulação, uma vez que evidencia a capacidade de dado solvente em dissolver uma determinada substância a certas condições de temperatura, pressão e pH, tendo como limite o equilíbrio na saturação (PEIXOTO, 2010; AULTON, 2002), e com isso, permite estabelecer quais os componentes a serem utilizados na busca da microemulsão (ROSSI *et al.*, 2007).

Para todos os tensoativos, co-tensoativos e óleos foram necessários a utilização de 5 ml de solvente, exceto no Mackaderm microexpres[®], em que 4 ml deste já foi suficiente para solubilizar 40 mg do ativo, porém, este reagente não foi utilizado na confecção dos diagramas, pois foi menos solúvel.

Assim, em se tratando da incorporação de um fármaco em uma base farmacêutica, esta combinação deverá se apresentar com características e ação satisfatória. Após esta análise, considerando os solventes que apresentaram melhores resultados, obtendo quase totalidade de dissolução do ativo, foram selecionados Tween 20, Span 80, PEG 400, PEG 40 e Cetiol V,

7.1.2 Construção do diagrama de fases pseudo-ternário e seleção da microemulsão

Após o teste de solubilidade e escolhidos os tensoativos e óleos a serem utilizados, foram construídos quatro diagrama de fases, alternando sua composição quantitativa e qualitativa conforme apresentado nos resultados.

O diagrama nº1 foi composto de uma mistura 1:1:1 de Span 80, Tween 20 e PEG 400 e nota-se que houve um predomínio de sistemas emulsionados, mas também foi possível obter microemulsões. Porém, este diagrama não foi escolhido porque não foi possível incorporar o ácido retinóico a 1% nos sistemas microemulsionados obtidos neste diagrama, uma vez que apresentaram instabilidade. Seguindo para o segundo diagrama a estratégia adotada foi aumentar a proporção utilizada de PEG 400, uma vez que houve boa solubilização neste reagente. Sendo assim, a segunda mistura foi constituída dos mesmos componentes que o

diagrama nº1, apenas alterando a proporção dos tensoativos/cotensoativos para 1:2:1, respectivamente de Span 80, Tween 20 e PEG 400, porém, no diagrama 2 houve um predomínio de separação de fases e pontos isolados de formação de microemulsão. Partiu-se então para o diagrama 3 onde substituiu-se o PEG 400 (co-tensoativo) para o PEG 40 (tensoativo), e manteve-se a proporção tensoativos/cotensoativos e óleo 1:1:1. Essa estratégia foi adotada porque, no teste de estabilidade, o PEG 40 apresentou uma ótima solubilização do ácido retinóico. Neste diagrama, foi obtido uma área maior de microemulsão, formação proporcionada com o aumento de tensoativos/cotensoativos. O diagrama nº4 (Figura 19), além dos componentes da base microemulsionada, também possuía o ácido retinóico em sua composição, para que se pudesse observar se haveria uma melhor perspectiva de incorporação do ativo de formação de regiões de microemulsão. No entanto, a maior parte desse diagrama mostrou que os sistemas eram instáveis e apresentavam-se turvos. Isso pode ser explicado pela menor quantidade de tensoativos/cotensoativos que não foi capaz de estabilizar o sistema contendo água e óleo. A teoria da tensão superficial relata que para a formação de uma microemulsão é necessário que a tensão superficial esteja muito baixa, isto resulta em um aumento da absorção do tensoativo na área interfacial resultando desta forma numa pressão bidimensional que ocasiona diminuição da tensão superficial. Logo, a aproximação da tensão superficial a zero resulta numa maior dispersão de uma fase na outra levando a formação de uma microemulsão (DAMASCENO, 2010).

Ao se avaliar todos os diagramas, pôde-se observar que o diagrama nº 3 foi o que apresentou uma maior área de microemulsão, sendo, portanto, escolhido esta constituição do diagrama para selecionar a microemulsão e incorporar o ácido retinóico.

Assim, a partir da análise do diagrama nº3, foram então selecionadas 24 composições diferentes de microemulsões para serem reproduzidas e inicialmente analisadas macroscopicamente e quanto ao tamanho de partículas, para que, a partir dos resultados obtidos, fosse selecionada a melhor microemulsão para análises posteriores.

Em cada microemulsão foi adicionado o ácido retinóico e em quase todos os testes houve uma dificuldade na incorporação do ativo e na manutenção de um sistema estável. Para a formação espontânea de um sistema microemulsionado, a tensão superficial e a energia livre devem tender a zero, logo o sistema se torna termodinamicamente estável. (DAMASCENO, 2010).

Após esta avaliação inicial, o sistema que permaneceu estável por mais tempo foi a microemulsão “R” (Tabela 1), que caracteriza uma microemulsão com proporção de tensoativos/co-tensoativos e óleo de 9:1 no diagrama de fases nº 3.

O perfil que caracteriza a estabilidade desta microemulsão pode ser entendido pela proporção de tensoativo/co-tensoativo e óleo, que por ser 9:1, demonstra maior concentração de tensoativos/co-tensoativos, o que gera uma tendência de manter o sistema mais estável, pois um maior número de moléculas deste componente se desloca para a superfície óleo/água, preenchendo este espaço e reduzindo a tensão superficial entre as duas fases, promovendo maior tendência de estabilidade do sistema (DALTIM, 2011).

7.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA MICROEMULSÃO DESENVOLVIDA

Mediante a seleção do sistema microemulsionado, a formulação do *peeling* contendo ácido retinóico a 1% foi possível e seguiu-se com a caracterização do mesmo.

O pH é uma grandeza que indica o grau de acidez, neutralidade ou alcalinidade de uma substância. O pH mede a quantidade de (H^+) e (OH^-) existente em um meio (FELTRE, 2005). Quando a concentração de (H^+) aumenta, o pH diminui, conferindo características de acidez, sendo que quando a concentração de (H^+) diminui, o meio torna-se alcalino (PEYREFITTE; MARTINI; CHIVOT, 1998).

Segundo Barata (1995), para que uma pele seja saudável, é necessário manter o equilíbrio ácido-básico. A pele apresenta um pH levemente ácido (4,6-5,8), que contribui para que ocorra proteção bactericida e fungicida em sua superfície (LEONARDI; GASPAR; CAMPOS, 2002).

Grande parte dos autores descreve que a maioria dos produtos destinados a pele devem ter como pH ideal o mais próximo ao da pele, para que não ocorram modificações nos mecanismos de defesa e irritação cutânea (KEDE; SABATOVICH, 2004).

O produto desenvolvido aproxima-se do pH fisiológico da pele, e devido a isso, ocorre minimização dos efeitos colaterais que poderiam ocorrer caso o pH da microemulsão se distanciasse do da pele.

A condutividade é uma ferramenta sensível e frequentemente utilizada na investigação de mudanças estruturais em macro e microemulsões (MO *et al.*, 2000). Medidas de condutividade apresentam-se como um importante meio na determinação de domínios

contínuos aquosos ou oleosos em um sistema microemulsionado (LAWRENCE; REES, 2000).

A medição da condutividade de uma microemulsão permite estimar a capacidade da fase contínua (fase externa ou dispersante) ser formada por água ou óleo. Portanto, através dessa afirmação pode-se indicar se o sistema se trata de uma microemulsão O/A ou A/O. Isso se deve ao fato de que, uma microemulsão O/A tem efeito condutor, enquanto que a microemulsão A/O tem efeito isolante (NAQUI *et al.*, 2011). Assim, o valor encontrado da condutividade dessa microemulsão foi baixo, o que confere características de uma microemulsão A/O.

Define-se reologia como a ciência de deformação e fluidez de sólidos, líquidos e gasosos, quando os mesmos são submetidos a tensões, sob determinadas condições termodinâmicas ao longo de um intervalo de tempo (WOOD, 2001). Tensão de cisalhamento é definida como uma força aplicada tangencialmente em uma área correspondente a interface entre a placa ou cilindro que aplicará o cisalhamento, e o líquido. A velocidade do escoamento, que pode ser mantida constante, é controlada pela resistência do líquido, ou seja, por sua viscosidade. A taxa de cisalhamento pode ser entendida como deslocamento de partículas ou plano de fluidos em relação à distância entre eles refabaixo.

A correlação entre tensão de cisalhamento e taxa de cisalhamento define o comportamento reológico de um fluido que pode ser expresso graficamente em um diagrama com tensão de cisalhamento na ordenada e taxa de cisalhamento na abcissa. Este diagrama é chamado de curva de fluxo. A viscosidade é assumida como constante e independente da taxa de cisalhamento (líquido Newtoniano). Analisando o comportamento reológico dessa microemulsão pelo gráfico (Figura 21), pode-se observar que a tensão de cisalhamento é diretamente proporcional a taxa de cisalhamento, ou seja, a viscosidade relativa é constante e independe da força aplicada à formulação, representando um comportamento Newtoniano.

Para um maior fornecimento de informações e controle de qualidade do produto, a densidade foi de 1,024 ($\pm 0,0018$) g/ml.

A técnica para determinação do diâmetro das gotículas da microemulsão, o espalhamento dinâmico da luz, utiliza a flutuação da intensidade da luz espalhada por gotículas em suspensão, sob o movimento Browniano no tempo, para se obter a distribuição heterodinâmica do tamanho (XU, 2008). A partir desse princípio, as gotículas maiores movimentam-se mais lentamente, conseqüentemente, a intensidade da luz flutua lentamente,

enquanto que as gotículas menores movimentam-se mais rapidamente, resultando na flutuação mais rápida da intensidade da luz. O equipamento é responsável pela correlação desses dois parâmetros para o cálculo do diâmetro das gotículas (SOARES, 2009).

Portanto, caracterizou-se o tamanho da microemulsão contendo ácido retinóico a 1% como 3,42 nm, confirmando assim sua natureza nanométrica, isto é, o tamanho da gotícula menor do que 100 nm (ANSEL *et al.*, 1999).

O potencial elétrico em torno da gotícula no plano de cisalhamento é chamado potencial Zeta, e pode ser quantificado através da observação da mobilidade eletroforética das gotículas submetidas a um campo elétrico (XU, 2008). De certo modo, o potencial Zeta é um indicador para prever e controlar a estabilidade dos sistemas coloidais. Quanto maior for o valor absoluto deste potencial, mais carregada estará a superfície da gotícula. Portanto, pode-se inferir que essa concentração de cargas favorecerá as interações repulsivas entre as gotículas, levando a formação de sistemas mais estáveis, por diminuir a tendência à agregação, resultando em uma distribuição do tamanho das gotículas em suspensão mais uniforme (HANS; LOWMAN, 2002).

Diante dos resultados obtidos, nota-se que o sistema possui uma superioridade de cargas negativas e distantes de zero, favorecendo assim a estabilidade do produto.

7.3 TESTE DE ESTABILIDADE PRELIMINAR

7.3.1 Centrifugação

O teste preliminar de centrifugação é uma ferramenta que nos permite avaliar, em um curto espaço de tempo, possíveis instabilidades físicas e químicas que possam atingir as formulações. Quando a microemulsão é submetida a centrifugação, a separação de fases pode ocorrer por cremação ou coalescência. A lei de Stokes, que descreve a velocidade de sedimentação das gotículas sendo diretamente proporcional ao tamanho destas na fase interna mostrando que a cremação é função da gravidade e que um aumento na gravidade acelera a separação (DI MANBRO, 2001; SILVA; SOARES, 1996).

Desta forma, neste teste, pôde-se constatar que não houve a separação de fases após a microemulsão ter sido submetida a centrifugação, e também não aconteceu a sedimentação de componentes da formulação, mantendo seu aspecto homogêneo.

7.4 DOSEAMENTO DO ÁCIDO RETINÓICO NA MICROEMULSÃO

Controle de qualidade é uma ferramenta indispensável para verificar a conformidade de fármacos, medicamentos, insumos, dentre outros com as especificações estabelecidas. Dentre as técnicas aplicadas ao controle de qualidade, pode-se citar os métodos instrumentais (como exemplo: cromatografia, espectrofotometria, absorção atômica). Nesse estudo foi utilizado a espectrofotometria de absorção molecular para o doseamento do ácido retinóico no sistema obtido.(VIEIRA; ALVEZ; BARBIERI, 2008).

Conforme a Farmacopéia (2010), o ácido retinóico contém uma concentração de no mínimo 90% e máximo de 120% da quantidade declarada. Neste estudo, a concentração na microemulsão para peeling foi de 93,899%, cumprindo o teste.

7.5 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ÁCIDO RETINÓICO A 1% EM MICROEMULSÃO POR ESPECTOFOTOMETRIA NA REGIÃO UV

Validação é o processo pelo qual se estabelece evidência documentada, através de estudos laboratoriais, de que as características de desempenho ou parâmetros analíticos do método alcançam os requisitos para as aplicações analíticas pretendidas. Atualmente a validação das metodologias analíticas é requisito fundamental no processo de registro de medicamentos. O objetivo da validação é assegurar a reprodutibilidade dos resultados e o estabelecimento de limites de aceitação de erro analítico, através da aplicação sistemática de testes de precisão e exatidão. No processo de validação de uma metodologia analítica é necessário avaliar alguns parâmetros: especificidade, linearidade, intervalo, precisão, sensibilidade, limite de quantificação, exatidão, adequados à análise (RANDAU et al., 2005).

A Especificidade é a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (BRASIL,2003) . De acordo com os resultados apresentados na tabela 5, a absorvância da solução padrão foi similar à solução da amostra, em contraste com o placebo que foi zero. Desta forma, assegura-se que o método é específico no comprimento de onda utilizado para as análises, portanto, não havendo interferência dos demais componentes.

Linearidade é a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado. O critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação (r) deve ser 0,99 (BRASIL, 2003). Neste estudo foi atendido, como pode ser demonstrado na figura 23, que a concentração do fármaco foi diretamente proporcional a absorvância, demonstrando a presença do analito com o aumento da concentração do fármaco.

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. Esta é considerada em três níveis. São elas: Repetibilidade (precisão intra-corrída): concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação. A repetibilidade do método é verificada por, no mínimo, 9 (nove) determinações, contemplando o intervalo linear do método, ou seja, 3 (três) concentrações, baixa, média e alta, com 3 (três) réplicas cada ou mínimo de 6 determinações a 100% da concentração do teste. Os valores obtidos contemplam os limites máximos de 5,0%, conforme recomendação da RE 899, de 29/05/2003. Precisão intermediária (precisão inter-corrídas): concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes. Para a determinação da precisão intermediária recomenda-se um mínimo de 2 dias diferentes com analistas diferentes. Os valores obtidos contemplam os limites máximos de 5,0%, conforme recomendação da RE 899, de 29/05/2003 (BRASIL, 2003). Nesse estudo, houve concordância entre os resultados em dois dias diferentes com 2 analistas diferentes. Reprodutibilidade (precisão inter-laboratorial): concordância entre os resultados obtidos em laboratórios diferentes como em estudos colaborativos, geralmente aplicados à padronização de metodologia analítica, por exemplo, para inclusão de metodologia em farmacopeias (BRASIL, 2003). Estes dados não precisam ser apresentados para a concessão de registro. A precisão de um método analítico pode ser expressa como o desvio padrão ou desvio padrão relativo (coeficiente de variação) de uma série de medidas. Neste estudo, houve concordância entre os resultados obtidos em dois laboratórios diferentes.

Exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro. O valor da exatidão médio foi de 80,08% para a concentração de 80%, 100,73% para a concentração de 100% e 102,36% para 120%, resultado que traduz o valor verdadeiro da amostra.

A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. Verificou-se o comportamento dos

resultados em relação a três variáveis: comprimento de onda, temperatura e variações em relação ao tempo de preparo da amostra (BRASIL, 2003). Analisando as tabelas 10, 11 e 12, não houve diferença entre as variações que foram submetidas às amostras.

7.6 ESTUDO DA PERMEACÃO CUTÂNEA *IN VITRO*

O teste *in vitro* de liberação de fármacos é uma ferramenta muito importante na indústria farmacêutica, tanto no desenvolvimento de produtos quanto no controle de qualidade de rotina. Pode ser definido, de forma simplificada como o processo pelo qual o fármaco é liberado de sua forma farmacêutica e se torna disponível para ser absorvido pelo organismo (CHOWDARY *et al.*, 1987).

A literatura científica descreve métodos *in vitro* que mimetizam o processo de liberação e penetração transdérmicas *in vivo* com e sem membranas (artificiais ou biológicas) e diferentes tipos de células de difusão das quais a *Vertical diffusion cell* (VDC) de Franz em sistema estático e fluxo contínuo, tem sido a mais empregada no desenvolvimento farmacotécnico, caracterização biofarmacêutica e controle de qualidade (SHA *et al.*, 1994).

A célula de Franz é caracterizada por ser uma célula de difusão estática, de dose finita, onde a pele é montada em VDC e a derme fica em contato com a solução receptora. Uma quantidade de formulação a ser estudada é aplicada sobre a pele, mimetizando as condições *in vivo* (BROUNAUGH; STEWART, 1985).

As peles de orelha de porco foram selecionadas por serem de fácil aquisição e manipulação, histológica e bioquimicamente, similares a pele humana e com características de permeabilidade cutânea bem próximas a esta (ANDEGA; KANIKKANNA; SINGH, 2001).

No presente estudo de permeação percutânea, foi utilizado o modelo de célula de Franz para avaliar a ocorrência de permeação do ácido retinóico em microemulsão para a solução receptora.

A concentração de ácido retinóico da solução receptora foi baixa quando comparada a concentração de ácido retinóico na microemulsão. Através desses achados, pode-se concluir que houve pouca permeação da microemulsão para o meio receptor, permanecendo o produto, na maior parte do tempo na pele. Portanto, o ácido retinóico veiculado em microemulsão para

peeling provavelmente é pouco absorvido e permanece a maior parte o tempo em contato com ele.

7.7 AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DO *PEELING* DE ÁCIDO RETINÓICO A 1% EM MICROEMULSÃO EM PACIENTES PORTADORAS DE MELASMA

Os resultados indicam que o *peeling* com ácido retinóico a 1% em microemulsão foi mais eficiente do que o *peeling* em formulação convencional a 1% no tratamento do melasma.

Magalhães et al. (2011b) tiveram como objetivo em seu estudo avaliar o efeito do *peeling* de ácido retinóico em pacientes portadoras de melasma. Para tal foram avaliadas 30 pacientes as quais foram submetidas à aplicação de *peelings* de ácido retinoico a 5% ou 10% seguido da avaliação do índice MASI e avaliação da qualidade de vida, através do MelasQoL. Os resultados encontrados por esses autores foi que o *peeling* de ácido retinóico a 5% e 10% promoveu redução na ordem de 42% do melasma. Esses resultados foram maiores que no presente estudo quando da utilização do *peeling* de ácido retinóico a 1% em veículo convencional qual promoveu melhora na ordem 26,1%, demonstrando ai a influência da concentração na efetividade do produto. No entanto, vale ressaltar que com aumento da concentração do ácido retinóico tem-se aumento de efeitos colaterais como eritema, prurido, descamação dentre outros. A utilização do ácido retinóico para *peeling* em microemulsão promoveu melhoria do melasma com. Esses resultados são de importância clínica, uma vez que com menor concentração haverá um maior clareamento da pele e também menos efeitos colaterais como já discutido anteriormente.

Além do melhor resultado final, após a segunda aplicação, ou seja, no 30º dia, pôde-se observar que houve uma redução significativa do MASI, quando comparado ao *peeling* de ácido retinóico a 1% em formulação convencional e ao placebo. Isso sugere que o *peeling* em microemulsão também obteve um bom resultado em um menor número de aplicações.

Houve também uma melhora do grupo tratado com o placebo durante o tratamento. Isso pode ser atribuído a um melhor cuidado que as pacientes passaram a ter com a pele, isso é, iniciaram o uso regular do filtro solar em sua rotina.

Esses resultados sugerem que o *peeling* em microemulsão pode ter atravessado de forma mais eficiente à barreira da pele e provavelmente ter ficado retido na epiderme viável quando comparado ao *peeling* padrão. A grande vantagem da utilização da nanotecnologia para formulação de *peelings* é o seu maior poder de permeação na pele quando comparado aos

peelings convencionais, e com isso, pode-se obter melhores resultados usando uma concentração menor do produto.

Do ponto de vista da penetração, a pele age como uma barreira mecânica nanoporosa, perfurada por um grande número de canais ou caminhos quase semicirculares. A maioria das publicações estima 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 atravessa a pele por esses "microcanais" intercelulares, diversas técnicas têm sido propostas para melhorar esse percurso e transpor a arquitetura molecular representada pelos corneócitos e pelas múltiplas camadas de lipídios intercelulares. E, neste ponto, as nanopartículas participam ativamente (ANTÔNIO *et al.*, 2014). Portanto, este sistema de liberação de ativos para aplicação tópica visa: (1) facilitar a veiculação de produtos, aumentando a eficácia da formulação e melhorando a estética do produto final; (2) maximizar o tempo de permanência do composto na pele, minimizando sua absorção transdérmica; e (3) liberar os produtos em áreas específicas (ANTÔNIO *et al.*, 2014).

Ademais, foi verificada melhora significativa na qualidade de vida dos pacientes, medida através do MelasQoL. Os resultados do presente estudo corroboram com os achados de (Magalhães *et al.*, 2010) que ao testarem *peeling* de ácido láctico concluiu que o mesmo é eficaz e seguro no tratamento do melasma, como monoterapia. No entanto, os autores salientam limitações no estudo pelo fato de ser um estudo não controlado. No presente estudo, houve o cuidado de se realizar um estudo clínico controlado, randomizado e duplo cego.

Vários estudos têm utilizado questionários padronizados para avaliar a qualidade de vida (COSGROVE *et al.*, 2015; GAULIN *et al.*, 2015). Tais questionários podem elucidar questões que os pacientes não expõem, reconhecendo aspectos que devem ser trabalhados com maior ênfase. Os questionários de qualidade de vida podem ser utilizados para possibilitar uma avaliação mais objetiva dessa combinação de fatores subjetivos. O uso dos questionários na prática clínica permite identificar os aspectos mais influenciados por determinada condição de saúde e avaliar a efetividade da estratégia de intervenção utilizada no tratamento dos pacientes (DE TROYA-MARTIN *et al.*, 2015; VAN CRANENBURGH *et al.*, 2015). No presente estudo, associado ao índice MASI, utilizou-se o MelasQol com a proposta de avaliar a qualidade de vida antes e depois da aplicação dos *peelings*.

Cestari *et al.* (2006), propuseram um estudo que teve como objetivo validar o *melasma quality of life questionnaire for Brazilian Portuguese language*. Esse estudo demonstrou que esse questionário é um instrumento válido que pode ser usado para avaliar a qualidade de vida

em resposta ao tratamento do melasma em pacientes brasileiros. Baseado nos achados desses autores decidiu-se utilizar este instrumento. Apesar dessa avaliação, os resultados revelaram uma redução significativa do índice MelasQoL nos três grupos, indicando efeito de todos os tratamentos, inclusive do placebo, na qualidade de vida global dos portadores de melasma. Esses resultados podem ser justificados pelo fato das pacientes estarem se cuidando mais e terem recebido informações de como cuidar melhor da pele e de se proteger da exposição aos raios ultra-violetas. O índice de qualidade de vida foi maior nos pacientes do grupo onde recebeu a aplicação de *peeling* de ácido retinóico 1% em microemulsão, sugestivamente em decorrência da redução da mancha na pele.

7.7.1 Determinação hemato-bioquímica

Em relação aos exames laboratoriais, não houve diferença entre os resultados obtidos antes e após as aplicações dos *peelings*.

Pode haver hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia e elevação das enzimas hepáticas como efeito colateral do uso de retinóides, principalmente os de uso sistêmico (THIELITZ; KRAUTHEIM; GOLLNICK, 2006). Nesse estudo, foi comprovado que esses efeitos colaterais, que são comuns com o uso de retinóides, não ocorreu. Esses resultados indicam que, apesar do *peeling* ser microemulsionado e com capacidade de penetrar na epiderme viável, ele é pouco permeado através da pele e, com isso, menores efeitos colaterais sistêmicos são percebidos. Isso é importante pois trata-se de uma medicação segura, e que envolve poucos riscos a saúde dos indivíduos.

Assim, os resultados obtidos sugerem que o produto contendo ácido retinóico em microemulsão para *peeling* pode ser usado com segurança

8 Conclusão

Concluiu-se com a realização desse estudo que:

1. Foi possível obter a microemulsão contendo ácido retinóico a 1%.
2. Com a seleção da microemulsão, foi possível caracterizá-la e ela apresentou as seguintes características físico-químicas: pH: 6,41(\pm 0,1734), Tamanho de gotículas: 3,42 (\pm 0,0611) nm, pdi: 0,189 (\pm 0,02), Densidade: 1,024 (\pm 0,0018) g/ml, Viscosidade: 755,4Cp, Potencial Zeta: -0,837 (\pm 0,2965) mV, Condutividade: 25,6 (\pm 3,579) μ s/cm.
3. O doseamento de ácido retinóico na microemulsão foi de 93,89%.
4. Foi realizado o teste de estabilidade preliminar e o sistema manteve-se estável.
5. O teste de permeação cutânea *in vitro* foi realizado onde foi demonstrado permeação do ácido retinóico em microemulsão para a solução solução receptora.
6. Foi possível a obtenção da formulação, cujos componentes são: PEG 40, Cetiol V, Tween 20, Span 80, Ácido retinóico, Água.
7. No estudo clínico, o *peeling* de ácido retinóico a 1,0% em microemulsão mostrou-se ser mais eficaz no tratamento do melasma além de ter promovido melhora na qualidade de vida dos pacientes quando comparado ao *peeling* de ácido retinóico a 1%.
8. Com apenas 2 aplicações da microemulsão contendo ácido retinóico a 1,0% para o *peeling* já foi possível observar aproximadamente 40% de redução no melasma, contra apenas aproximadamente 11% para o ácido retinóico a 1,0% em veículo convencional o que sugere que com um menor número de aplicações já se pode visualizar um efeito benéfico desse tratamento.
9. O *peeling* de ácido retinóico a 1% em microemulsão mostrou-se mais eficaz mesmo usando menores concentrações de ácido retinóico quando comparado com os produtos convencionais.

10. Neste estudo clínico não houve alterações nos parâmetro hemato-bioquímicos dos voluntários, entre o dia zero e o dia 50, sugerindo eu, alémde eficaz a microemulsão a 1,0% para *peeling* também é segura para uso em humanos.

Referências

- AHMAD, H. M. Analysis of clinical efficacy, side effects, and laboratory changes among patients with acne vulgaris receiving single versus twice daily dose of oral isotretinoin. **Dermatol Ther.**, v. 5, Mar. 2015 doi: 10.1111/dth.12213. [Epub ahead of print].
- AISTER, T. S.; LUPTON, J. R. Laser therapy for cutaneous hyperpigmentation and pigmented lesions. **Dermatol Ther**, v. 14, p. 46-56, 2001.
- ALVAREZ-ROMÁN, R. *et al.* Skin penetration and distribution of polymeric nanoparticles. **J Control Release**, v. 99, p. 53-62, 2004.
- ANDEGA, S.; SANIKKANNAN, N.; SINGH, M. Comparison of the fatty alcohols on the permeation of melatonin between porcine and human skin. **J Control Release**, v. 77, n. 1, p. 17-25, 2001.
- ANSEL, M. C.; POPOVICH, N. G.; ALLEN, L. V. J. **Farmacotécnica: formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos**. 6. ed. São Paulo: Premier, 1999.
- ANTÔNIO, J. R. *et al.* Nanotecnologia em Dermatologia. **An Bras Dermatol.**, v. 89, n. 1, p. 129-40, 2014.
- ASZTERBAUM, M. *et al.* Ontogeny of the epidermal barrier to water loss in the rat: correlation of function with stratum corneum structure and lipid content. **Pediatr Res**, v. 31, n. 4 Pt 1, p. 308-17, Apr. 1992.
- AZZINI, R. G. **Desenvolvimento e avaliação *in vitro* e *in vivo* de emulsões contendo óleo de canola e ácido carboxílico**. 1999. 169p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.
- BAGATIN, E.; HASSUN, K.; TALARICO, S. Systemic review of chemical peels. **Surg & cosmetic dermat**, v. 1, n. 1, p. 37-46, 2009.
- BAGWE, R. P. *et al.* Improved drug delivery using microemulsions: Rationale, recent progress, and new horizons. **Crit Rev Ther Drug Carrier Syst**, v. 18, p. 77-140, 2001.
- BALDWIN, H. E. *et al.* 40 years of topical tretinoin use in review. **J Drugs Dermatol**, v. 12, n. 6, p. 638-42, Jun. 2013.
- BALL AREFIEV, K. L.; HANTASH, B. M. Advances in the treatment of melasma: a review of the recent literature. **Dermatol Surg**, v. 38, n. 7 Pt 1, p. 971-84, Jul. 2012.
- BARATA, E. A. **A cosmetologia: princípios básicos**. São Paulo: Tecno Press, 2003.
- BARONI, A. *et al.* Structure and function of the epidermis related to barrier properties. **Clin Dermatol**, v. 30, n. 3, p. 257-62, May/Jun. 2012.

BARROS, R. M. **Influência da densidade de carga e da massa molar da poliacrilamida na reologia de sistemas microemulsionados**. 2014. 125 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal-RN, 2014.

BARRY, B. H. Breaching the skin Barrier to drugs. **Nat Biotechnol**, v. 22, n. 2, p. 165-167, 2004.

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

BOONME, P. Applications of microemulsions in cosmetics. **J Cosmet Dermatol**, v. 5, p. 223-228, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução nº 899**, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalítico”.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia de estabilidade de produtos cosméticos**. Brasília: MS, 2004. v. 1. p. 45.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopéia brasileira**. 5. ed. Brasília: Anvisa, 2010. Parte I.

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

BROWN, V. L. *et al.* Melanomas in renal transplant recipients: the London experience, and invitation to participate in a european study. **Br J Dermatol**, v. 156, n. 1, p. 165-7, Jan. 2007.

BURNS, T. *et al.* **Rook`s textbook of dermatology**. John Wiley eSons, Inc., 2010.

CAJUEIRO *et al.* Isotretinoína e suas propriedades farmacológicas. **Revista Científica do ITPAC**, Araguaína, v.7, n.1, Pub.4, jan. 2014.

CAO, J.; QU, H.; CHENG, Y. Separation of flavonoids and phenolic acids in complex natural products by microemulsion electrokinetic chromatography using surfactant-coated and carboxylic single-wall carbon nanotubes as additives. **Electrophoresis**, v. 31, n. 10, p. 1689-96, May. 2010.

CAU, J. *et al.* Total laparoscopic aortic repair for occlusive and aneurysmal disease: first 95 cases. **Eur J Vasc Endovasc Surg**, v. 31, n. 6, p. 567-74, Jun. 2006.

CESTARI, T. F. *et al.* Validation of a melasma quality of life questionnaire for brazilian portuguese language: the MelasQoL-BP study and improvement of QoL of melasma patients after triple combination therapy. **Br J Dermatol**, v. 156 Suppl 1, p. 13-20, Dec. 2006.

CHAPMAN, M. S. Vitamin A: history, current uses, and controversies. **Semin Cutan Med Surg.**, v. 31, p.:11-16, 2012.

CHAUDHARY, S.; DAYAL, S. Efficacy of combination of glycolic acid peeling with topical regimen in treatment of melasma. **J Drugs Dermatol**, v. 12, n. 10, p. 1149-53, Oct. 2013.

CHOWDARY, K. P. R.; RAJYALAKSHMI, Y. Dissolution rate in modern pharmacy. **East Pharm. New Delhi**, v. 30, n. 350, p. 51-54, 1987.

CLARK, E.; SCERRI, L. Superficial and medium-depth chemical peels. **Clin Dermatol**, v. 26, n. 2, p. 209-18, Mar./Apr. 2008.

CONSTANTINIDES, P. P.; YIV, S. H. Particle-size determination of phase-inverted water-in-oil microemulsions under different dilution and storage-conditions. **Int J Pharm**, v. 115, p. 225-34, 1995.

COSGROVE, S. B. *et al.* Long-term compassionate use of oclacitinib in dogs with atopic and allergic skin disease: safety, efficacy and quality of life. **Vet Dermatol**, Feb. 2015.

CUCE, L. C. *et al.* Tretinoin peeling. **Dermatol Surg**, v. 27, n. 1, p. 12-4, Jan. 2001.

DALTIN, D. **Tensoativos: química, propriedades e aplicações**, São Paulo: Blucher, 2011.

DAMASCENO, B. P. G. L. **Sistemas microemulsionados como carreador lipídico para fármacos insolúveis**. 2010. 61 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Rio Grande do Norte, 2010.

DAMASCENO, B. P. G. L.. *et al.* Microemulsão: um promissor carreador para moléculas insolúveis. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 32, n. 1, p. 9-18, 2011,

DARLENSKI, R.; SURBER, C.; FLUHR, J. W. Topical retinoids in the management of photodamaged skin: from theory to evidence-based practical approach. **Br J Dermatol**, v. 163, n. 6, p. 1157-65, Dec. 2010.

DE TROYA-MARTIN, M. *et al.* A spanish version of the skin cancer index: a questionnaire for measuring quality of life in patients with cervicofacial nonmelanoma skin cancer. **Br J Dermatol**, v. 172, n. 1, p. 160-8, Jan. 2015.

DI MAMBRO, V. M. **Desenvolvimento de formulações com superóxido dismutase: avaliação da estabilidade física das formulações e da atividade enzimática**. 2001. 138p. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2001.

DOGRA, S.; KANWAR, A. J.; PARSAD, D. Adapalene in the treatment of melasma: a preliminary report. **J Dermatol**, v. 29, n. 8, p. 539-40, Aug. 2002.

DRAELOS, Z. D. Skin lightening preparations and the hydroquinone controversy. **Dermatol Ther**, v. 20, n. 5, p. 308-13, Sep./Oct. 2007.

EJAZ, A. *et al.* Comparison of 30% salicylic acid with Jessner's solution for superficial chemical peeling in epidermal melasma. **J Coll Physicians Surg Pak**, v. 18, n. 4, p. 205-8, Apr. 2008.

FAGHIHI, G.; SHAHINGOHAR, A.; SIADAT, A. H. Comparison between 1% tretinoin peeling versus 70% glycolic acid peeling in the treatment of female patients with melasma. **J Drugs Dermatol**, v. 10, n. 12, p. 1439-42, Dec. 2011.

FELTRE, R. **Química geral**. São Paulo: Moderna, 2005, v. 1.

FERNANDES, C. **Estudo de equivalência farmacêutica de comprimidos de lamivudina 150 mg**. 2001. 203p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, 2001.

FERREIRA, R. V. **Síntese e caracterização de nanopartículas magnéticas funcionalizadas com núcleo magnético de magnetita**. 2009. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009.

FITZPATRICK, T. B. *et al.* **Tratado de dermatologia**. Rio de Janeiro: Revinter, 2005.

FITZPATRICK, T. B.; MOSHER, D. B. Pigmentação cutânea e distúrbios o metabolismo da melanina. In: ISSELBACHER, Kurt J. et al. **Medicina Interna**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1983. v. 1. P. 276-284.

FLEISCHER JR., A. B. *et al.* The combination of 2% 4-hydroxyanisole (Mequinol) and 0.01% tretinoin is effective in improving the appearance of solar lentigines and related hyperpigmented lesions in two double-blind multicenter clinical studies. **J Am Acad Dermatol**, v. 42, n. 3, p. 459-67, Mar. 2000.

FRIBERG, S. E.; BOTHOREL, P. **Microemulsions: structure and dynamics**. CRC: Boca Raton, 1988.

FUNASAKA, Y. et al. Modulation of melanocyte-stimulating hormone receptor expression on normal human melanocytes: evidence for a regulatory role of ultraviolet B, interleukin-1alpha, interleukin-1beta, endothelin-1 and tumour necrosis factor-alpha. **Br J Dermatol**, v. 139, p. 216-24, 1998.

FURLANETTO, S. *et al.* Microemulsion electrokinetic chromatography: an application for the simultaneous determination of suspected fragrance allergens in rinse-off products. **Talanta**, v. 83, n. 1, p. 72-7, Nov. 2010.

GADELHA, A. R.; COSTA, I. M. C. **Cirurgia dermatológica em consultório**. São Paulo: Atheneu, 2009.

GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. **Tratado de histologia em cores**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.

GAULIN, C.; SEBARATNAM, D. F.; FERNANDEZ-PENAS, P. Quality of life in non-melanoma skin cancer. **Australas J Dermatol**, v. 56, n. 1, p. 70-6, Feb. 2015.

GHERSETICH, I. *et al.* Melasma: treatment with 10% tretinoin peeling mask. **J Cosmet Dermatol**, v. 9, n. 2, p. 117-21, Jun. 2010.

GILLBRO, J. M.; OLSSON, M. J. The melanogenesis and mechanisms of skin-lightening agents--existing and new approaches. **Int J Cosmet Sci**, v. 33, n. 3, p. 210-21, Jun. 2011.

GRIFFITHS, C. E. et al. Topical tretinoin (retinoic acid) improves melasma. A vehicle-controlled, clinical trial. **Br J Dermatol**, v. 129, n. 4, p. 415-21, Oct. 1993.

- GRIMES, P. E.; YAMADA, N.; BHAWAN, J. Light microscopic, immunohistochemical, and ultrastructural alterations in patients with melasma. **Am J Dermatopathol** v. 27, p. 96-101, 2005.
- GUPTA, S. *et al.* Nanocarriers and nanoparticles for skin care and dermatological treatments. **Indian Dermatol Online J.**, v. 4, n. 4, p. 267-72, Oct. 2013. doi: 10.4103/2229-5178.120635.
- HANDEL, A. C.; MIOT, L. D. B.; MIOT, H. A. Melasma: a clinical and epidemiological review. **An Bras Dermatol.**, Rio de Janeiro, n. 5. p. 771-782, set./out. 2014.
<http://dx.doi.org/10.1590/abd1806-4841.20143063>
- HANS, M. L.; LOWMAN, A. M. Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. **Current Opinion in Solid State & Material Science**, v. 6, n. 4, p. 319-327, 2002.
- HEARING, V. J. Biogenesis of pigment granules: a sensitive way to regulate melanocyte function. **J Dermatol Sci**, v. 37, n. 1, p. 3-14, Jan. 2005.
- ITO, S. The IFPCS presidential lecture: a chemist's view of melanogenesis. **Pigment Cell Res**, v. 16, n. 3, p. 230-6, Jun. 2003.
- JAMES, W. D.; BERGER, T. G.; ELSTON, D. M. **Andrews doenças da pele dermatologia clínica**. São Paulo: Elsevier, 2007. 957.
- JATO, J. L. V. **Tecnologia farmacêutica**: aspectos fundamentais de los sistemas farmacêuticos y operaciones basicas. Madri: Sintesis, 1997. v. 1.
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.
- KANG, W. H. *et al.* Melasma: histopathological characteristics in 56 Korean patients. **Br J Dermatol**, v. 146, p. 228-37, 2002.
- KAWAKAMI, K. *et al.* Microemulsion formulation for enhanced absorption of poorly soluble drugs - I. Prescription design. **J Controlled Release**, v. 17, p. 65-74, 2002.
- KEDE, M. P. V.; SABATOVICH, O. **Dermatologia estética**. São Paulo, SP: Atheneu, 2004.
- KIM, E. H. *et al.* The vascular characteristics of melasma. **J of derm science**, v. 46, p. 111-6, 2007.
- KIM, Y. J.; UYAMA, H. Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition mechanism and perspective for the future. **Cell Mol Life Sci**, v. 62, n. 15, p. 1707-23, Aug. 2005.
- KIMURA, K. *et al.* Characterization of retinoic acid-inducible gene-I (RIG-I) expression corresponding to viral infection and UVB in human keratinocytes. **J Dermatol Sci**, v. 66, n. 1, p. 64-70, Apr. 2012.
- KLIGMAN, A. M.; WILLIS, I. A new formula for depigmenting human skin. **Arch Dermatol**, v. 111, n. 1, p. 40-8, Jan. 1975.

LAWRENCE, M. J.; REES, G. D. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. **Advanced Drug Delivevry Reviews**, v. 45, n. 1, p. 89-121, 2000.

LAWRENCE, M. J.; REES, G. D. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. **Adv Drug Del Rev**, v. 45, p. 89-121, 2000.

LEENUTAPHONG, V.; NETTAKUL, A.; RATTANASUWON, P. Topical isotretinoin for melasma in Thai patients: a vehicle-controlled clinical trial. **J Med Assoc Thai**, v. 82, n. 9, p. 868-75, Sep. 1999.

LEONARDI, G. R. **Cosmetologia aplicada**. São Paulo: Med Farma, 2004.

LEONARDI, G. R.; GASPAR, L. R.; CAMPOS, P. M. B. G. Estudo da variação do pH da pele humana exposta à formulação cosmética crescida ou não das vitaminas A, E ou de ceramida, por metodologia não invasiva. **An Bras Dermatol**, Rio de Janeiro, v. 77, n. 5, p. 563-569, set./out. 2002.

LIEBERMAN, R.; MOY, L. Estrogen receptor expression in melasma: results from facial skin of affected patients. **J Drugs Dermatol**, v. 7, n. 5, p. 463-5, May. 2008.

LIEU, T. J.; PANDYA, A. G. Melasma quality of life measures. **Dermatol Clin**, v. 30, n. 2, p. 269-80, Apr. 2012.

LIN, J. Y.; FISHER, D. E. Melanocyte biology and skin pigmentation. **Nature**, v. 445, n. 7130, p. 843-50, Feb. 2007.

LIRA, A. A. M. **Desenvolvimento, caracterização e avaliação de sistemas microestruturados para veiculação de ácido retinóico na pele**. 2007. 163p. Tese (Doutorado em Ciência Farmacêutica) - USP, Ribeirão Preto, 2007.

LUPI, O.; CUNHA, P. R. **Rotinas de diagnóstico e tratamento da sociedade brasileira de dermatologia**. Rio de Janeiro: Gen, 2012.

LUTFI, R. J. *et al.* Association of melasma with thyroid autoimmunity and other thyroidal abnormalities and their relationship to the origin of the melasma. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 61, n. 1, p. 28-31, Jul. 1985.

MAEDA, K. *et al.* Effect of pituitary and ovarian hormones on human melanocytes in vitro. **Pigment Cell Res**, v. 9, n. 4, p. 204-12, Aug. 1996.

MAGALHÃES, G. M. *et al.* Lactic acid chemical peel in the treatment of melasma: clinical evaluation and impact on quality of life. **Surg Cosmet Dermatol**, v. 2, n. 3, p. 173-9, 2010.

MAGALHÃES, G. M.. Double-blind randomized study of 5% and 10% retinoic acid peels in the treatment of melasma: clinical evaluation and impact on the quality of life. **Surg Cosmet Dermatology**, v. 3, p. 17-22, 2011a.

MAGALHÃES, G. M.. Double-blind randomized study of 5% and 10% retinoic acid peels in the treatment of melasma: clinical evaluation and impact on the quality of life. **Surg Cosmet Dermatol** v. 3, n. 1, p. 17-22, 2011b.

MIOT, L. D. B. *et al.* Fisiopatologia do melasma. **An. Bras. Dermatol**, Rio de Janeiro, v. 84, n. 6, p. 623-35, Nov./Dec. 2009. <http://dx.doi.org/10.1590/S0365-05962009000600008>

MO, C.; ZHONG, M.; ZHONG, Q. Investigation of structure and structural transition in microemulsion systems of sodium dodecylsulfonate + n-heptane + n-butanol + water by cyclic voltammetric and electrical conductivity measurements. **J Electroanal Chem**, v. 493, n. 1/2, p. 100-107, 2000.

MORAIS, O. O. *et al.* The use of ablative lasers in the treatment of facial melasma. **An Bras Dermatol**, v. 88, n. 2, p. 238-42, Mar./Apr. 2013.

MOSER, K. *et al.* Passive skin penetration enhancement and its quantification in vitro. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 52, p. 103-112, 2001.

NAOUI, W. *et al.* Microemulsion microstructure influences the skin delivery of an hydrophilic drug. **Pharm. Res**, v. 28, p. 1683-1695, 2011.

NAZZARO-PORRO, M. Azelaic acid. **J Am Acad Dermatol**, v. 17, n. 6, p. 1033-41, Dec. 1987.

NOY, N. Between death and survival: retinoic acid in regulatio of apoptosis. **Annu Rev. Nutr.**, v. 30, p. 201-217, 2010.

OLIVEIRA, A. G. de *et al.* Microemulsões: estrutura e aplicações como sistema de liberação de fármacos. **Quim. Nova**, v. 27, n. 1, p. 131-138, 2004.

PANDYA, A. G. *et al.* Reliability assessment and validation of the melasma area and severity index (MASI) and a new modified MASI scoring method. **J Am Acad Dermatol**, v. 64, n. 1, p. 78-83, 83 e1-2, Jan. 2011.

PAUL, B. K.; MOULIK, S. P. Uses and applications of microemulsions. **Current Sci**, v. 80, p. 990-1001, 2001.

PEIXOTO, E. P. **Previsão da solubilidade de fármacos orgânicos em água, baseado na relação quantitativa entre estrutura molecular e propriedades *in silico***. 2010. 55p. Dissertação (Mestrado em Ciências Molecular) - Universidade Estadual de Goiás. Anápolis, GO, 2010.

PEYREFITTE, Y.; MARTINE, C. M.; CHIVOT, M. **Estética cosmética: cosmetologia biologia geral, biologia da pele**. São Paulo: Organização Andrei, 1998. cap. 3. p. 325-482.

PICARDO, M.; CARRERA, M. New and experimental treatments of cloasma and other hypermelanoses. **Dermatol Clin**, v. 25, n. 3, p. 353-62, Jul. 2007.

RANDAU, K. P. *et al.* Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para anti-retroviral zidovudina (AZT)-matéria-prima. **Acta Farm. Bonaerense**, v. 24, n. 1, p. 104-8, 2005.

RENDON, M. *et al.* Treatment of melasma. **J Am Acad Dermatol**, v. 54, n. 5 Suppl 2, p. S272-81, May. 2006.

RIGOPOULOS, D.; GREGORIOU, S.; KATSAMBAS, A. Hyperpigmentation and melasma. **J Cosmet Dermatol**, v. 6, n. 3, p. 195-202, Sep. 2007.

ROMERO, C. et al. Retinoic acid as modulator of UVB-induced melanocyte differentiation. Involvement of the melanogenic enzymes expression. **J Cell Sci**, v. 107 (Pt 4), p. 1095-103, Apr. 1994.

ROSSI, C. G. F. T. *et al.* Microemulsões: uma abordagem básica e perspectivas para aplicabilidade industrial. **Rev. Univ. Rural. Sér. Ci. Exatas e da Terra, Seropédica, RJ, Edur**, v. 26, n. 1-2, p. 45-66, jan./dez. 2007.

SAFOURY, O. S. *et al.* A study comparing chemical peeling using modified Jessner's solution and 15% trichloroacetic Acid versus 15% trichloroacetic acid in the treatment of melasma. **Indian J Dermatol**, v. 54, n. 1, p. 41-5, 2009.

SAMPAIO, S. A. P.; RIVITTI, E. A. **Dermatologia**. São Paulo: Artes Medicas, 2007.

SANCHEZ, N. P. *et al.* Melasma: a clinical, light microscopic, ultrastructural, and immunofluorescence study. **J Am Acad Dermatol**, v. 4, n. 6, p. 698-710, Jun. 1981.

SHAH, D. O. (Ed.). **Micelles, microemulsions, and monolayers: science and technology**. New York: Marcel Dekker, 1998.

SHAPIRO, S. *et al.* Use of topical tretinoin and the development of noncutaneous adverse events: evidence from a systematic review of the literature. **J Am Acad Dermatol.**, v. 65, n. 6, p. 1194-201, Dec. 2011.

SHARQUIE, K. E.; AL-TIKREETY, M. M.; AL-MASHHADANI, S. A. Lactic acid chemical peels as a new therapeutic modality in melasma in comparison to Jessner's solution chemical peels. **Dermatol Surg**, v. 32, n. 12, p. 1429-36, Dec. 2006.

SHETH, V. M.; PANDYA, A. G. Melasma: a comprehensive update: part I. **J Am Acad Dermatol**, v. 65, n. 4, p. 689-97; quiz 698, Oct. 2011a.

SHETH, V. M.; PANDYA, A. G. Melasma: a comprehensive update: part II. **J Am Acad Dermatol**, v. 65, n. 4, p. 699-714; quiz 715, Oct. 2011b.

SHIM, J. *et al.* Transdermal delivery of minoxidil with block copolymer nanoparticles. **J Control Release**, v. 97, p. 477-484, 2004.

SILVA, E. C.; SOARES, I. C. Tecnologia de emulsões. **Cosmetics & Toietries**, v. 8, n. 5, p. 37-46, 1996.

SILVA, J. A.; BEDOR, D. J. C.; DAMASCENO, B. P. G. L.; OLIVEIRA, A. G. E.; EGITO, E. S. T.; SANTANA, D. P. Physicochemical Characterization and Developmente of Microemulsion System for Transdermal Use. **JDisoers Sci Technol.**, v. 31, n. 1, p. 1-8, 2010.

SILVER, F. H.; FREEMAN, J. W.; DEVORE, D. Viscoelastic properties of human skin and processed dermis. **Skin Res Technol**, v. 7, n. 1, p. 18-23, Feb. 2001.

SINTOV, A. C.; SHAPIRO, L. New microemulsion vehicle facilitates percutaneous penetration. **Jornal of Controlled Release**, v. 95, n. 2, p.173-174, 2004.

SIVAYATHORN, A. Melasma in orientals. **Clin Drug Invest**, v. 10, n. 2, p. 34-40, 1995.

SOARES, M. V. **Desenvolvimento e avaliação de nanopartículas de poli-ε-caprolactona contendo zinco (II) ftalocianina para uso na terapia fotodinâmica do câncer**. 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

STEINER, D. *et al.* Treatment of melasma: systemic review. **Surg Cosmet Dermatol**, v. 1, n. 2, p. 87-94, 2009.

SULAIMON, S. S.; KITCHELL, B. E. The biology of melanocytes. **Vet Dermatol**, v. 14, n. 2, p. 57-65, Apr. 2003.

SURGICAL and Cosmetic Dermatology, v. 3, n. 1, p. 115-119, 2009.

THIELITZ, A.; GOLLNICK, H. Topical retinoids in acne vulgaris: update on efficacy and safety. **Am J Clin Dermatol**, v. 9, n. 6, p. 369-81, 2008. doi: 10.2165/0128071-200809060-00003.

THIELITZ, A.; KRAUTHEIM, A.; GOLLNICK, H. Update in retinoid therapy of acne. **Dermatol Ther**, v. 19, issue 5, p. 272-279, Sep. 2006. DOI: 10.1111/j.1529-8019.2006.00084.x

THODY, A. J.; GRAHAM, A. Does alpha-MSH have a role in regulating skin pigmentation in humans? **Pigment Cell Res**, v. 11, n. 5, p. 265-74, Oct. 1998.

VACHIRAMON, V.; SAHAWATWONG, S.; SIRITHANABADEEKUL, P. Treatment of melasma in men with low-fluence q-switched neodymium-doped yttrium-aluminum-garnet laser versus combined laser and glycolic acid Peeling. **Dermatol Surg**, Mar. 2015.

VAN CRANENBURGH, O. D. *et al.* A web-based, educational, quality-of-life intervention for patients with a chronic skin disease: feasibility and acceptance in routine dermatological practice. **Acta Derm Venereol**, v. 95, n. 1, p. 51-6, Jan. 2015.

VELASCO, M. V. R. *et al.* Rejuvenescimento da pele por Peeling químico: enfoque no Peeling de fenol. **An bras Dermatol**, Rio de Janeiro, v. 79, n. 1, p. 91-99, jan./fev. 2004.

VIDEIRA, I. F. dos S.; MOURA, D. F. L.; MAGINA, S. Mecanismos reguladores da melanogênese. **An bras Dermatol**, Rio de Janeiro, v. 88, n.1, Jan./Feb. 2013. <http://dx.doi.org/10.1590/S0365-05962013000100009>

VIEIRA, C. A.; ALVEZ, R. S.; BARBIERI, R. S. Doseamento de fármacos pela técnica de volumetria de neutralização em meio não aquoso. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUÍMICA, 48., 2008. Rio de Janeiro, 2008.

VINOD, S. P.; ELKINS, J. S.; WILLIAMS, R. L. Evaluation of the test system used for in vitro release of drugs for topical dermatological drug products. **Pharm Dev Technol**, v. 4, p. 377-385, 1999

WAGNER, J. K. *et al.* Skin responses to ultraviolet radiation: effects of constitutive pigmentation, sex, and ancestry. **Pigment Cell Res**, v. 15, n. 5, p. 385-90, Oct. 2002.

XU, R. Progress in nanoparticles characterization: sizing and zeta potential measurement. **Particuology**, v. 6, p. 112-115, 2008.

YAMAMOTO, Y. *et al.* Guidelines for chemical peeling in Japan (3rd edition). **J Dermatol**, v. 39, n. 4, p. 321-5, Apr. 2012. Doi: 10.1111/j.1346-8138.2011.01362.

ZAKOPOULOU, N.; KONTOCHRISTOPOULOS, G. Superficial chemical peels. **J Cosmet Dermatol**, v. 5, n. 3, p. 246-53, Sep. 2006.

Anexos

ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO
SUDOESTE DA BAHIA -
UESB/BA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Peeling de ácido retinóico em microemulsão: avaliação da eficácia no tratamento de melasma.

Pesquisador: Ana Carolina Dias Viana de Andrade

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 28825514.8.0000.0055

Instituição Proponente: Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 703.383

Data da Relatoria: 27/06/2014

Apresentação do Projeto:

O melasma é uma desordem comum caracterizada por hiperpigmentação em áreas fotoexpostas. É uma doença benigna, porém gera grande insatisfação em pacientes que a possuem. O tratamento é difícil, onde há recidivas frequentes após o término da terapia. Uma das opções de tratamento é o peeling de ácido retinóico. Essa terapia mostra-se eficaz em algumas situações clínicas, porém, ainda sem sucesso no tratamento de melasmas dérmicos. A proposta dos autores com o presente estudo será desenvolver um peeling em microemulsão contendo ácido retinóico a 1% e avaliar a efetividade dessa terapia em um estudo clínico controlado randomizado duplo cego.

Objetivo da Pesquisa:

Geral:

O objetivo do presente estudo será obter peeling químico contendo ácido retinóico em microemulsões a 1% e avaliá-lo em pacientes portadoras de melasma.

Específicos:

Obter e caracterizar físico-quimicamente as microemulsões para Peeling químico contendo ácido retinóico a 1,0%;

Realizar doseamento do ácido retinóico nas microemulsões;

Avaliar a estabilidade das microemulsões para Peeling químico contendo ácido retinóico a 1,0%;

Endereço: Avenida José Moreira Sobrinho, s/n
Bairro: Jequiezinho CEP: 45.208-510
UF: BA Município: JEQUIE
Telefone: (73)3528-9727 Fax: (73)3525-8883 E-mail: cepuesb.jq@gmail.com

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO
SUDOESTE DA BAHIA -
UESB/BA



Continuação do Parecer: 703.383

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos foram apresentados e estão de acordo com as orientações da Resolução 466/2012.

Recomendações:

Recomenda-se retirar "(Anexo 1)" do texto no TCLE (verificar página 3, linha 12).

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

A pesquisadora atendeu às recomendações do relator.

Como esclarecimento quanto à caracterização deste estudo como duplo-cego, a pesquisadora acrescentou que um pesquisador colaborador do estudo, treinado previamente por ela, será o responsável pelas aplicações de peeling e análise do MASI.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Em reunião do dia 27/06/2014, a plenária DO CEP/UESB aprovou o parecer do relator.

JEQUIE, 30 de Junho de 2014

Assinado por:
Ana Angélica Leal Barbosa
(Coordenador)

ANEXO B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Dados de identificação

Título do Projeto: Peeling de ácido retinóico em microemulsão: avaliação da eficácia no tratamento de melasma.

Pesquisador Responsável: Ana Carolina Dias Viana de Andrade

Instituição a que pertence o Pesquisador Responsável: Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia-UESB

Telefones para contato: (0xx77) 3421-1219/9141-9828

Nome do voluntário: _____

Idade: _____ (anos) R.G.: _____

O Sr. (a) está sendo convidado (a) como voluntário (a) a participar da pesquisa “**PEELING DE ÁCIDO RETINÓICO EM MICROEMULSÃO: AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA NO TRATAMENTO DE MELASMA**”. Neste estudo pretendemos obter *peeling* químico contendo ácido retinóico em microemulsões a 1% e avalia-lo em pacientes portadoras de melasma.

O motivo que nos leva a estudar esse assunto é que o *peeling* de ácido retinóico convencional já é utilizado com frequência em tratamentos para o melasma com segurança, porém, com pouca resposta em melasmas mais profundos, como o dérmico.

A pele é considerada uma barreira anatômica, o que dificulta a penetração de fármacos através da mesma. Neste contexto está inserido o conceito dos sistemas transportadores de fármacos, os quais são capazes de compartimentalizar a substância ativa e direcioná-la para os sítios onde deverão exercer o efeito farmacológico, além de poder controlar a velocidade de liberação, sem alterar a estrutura química da molécula transportada. As microemulsões estão incluídas nesse conceito. Elas podem melhorar a capacidade de permeação na pele, pois podem se mover facilmente através do estrato córneo, entregando o ativo ao alvo desejado. Então, poderá haver uma maior eficácia do produto em microemulsão, quando comparado ao produto convencional, no tratamento do melasma, que ainda hoje é uma doença de difícil controle.

Dessa forma o *peeling* de ácido retinóico formulado em microemulsão poderá ser utilizado em uma concentração menor com maior eficácia, haja vista que nessa apresentação o mesmo teria maior penetração sem a necessidade de múltiplas aplicações. Dessa forma esse medicamento já é utilizado, apenas essa nova formulação, não.

Maiores considerações

- Os riscos que estão envolvidos com essa pesquisa está relacionado a reações alérgicas na pele caso o paciente seja alérgico aos princípio ativo do *peeling*. Com o objetivo de assegurar que respostas alérgicas exarcebadas aconteçam, previamente a aplicação do *peeling*, anamnese detalhada será realizada para verificar fatores que indiquem sensibilidade ou não aos constituintes do *peeling*. Será realizado também teste em uma pequena área da pele previamente a aplicação no rosto para verificar qualque reação alérgica. Caso o teste de sensibilidade mostre positivo, a paciente será dispensada, e na pequena área a qual realizou-se o teste de hipersensibilidade será aplicado anti-alérgico tópico e acompanhamento até regressão do caso.
- Os benefícios advindos desse estudo é a melhora no melasma apresentado inicialmente que poderá ser constatado pelo exame clínico e fotográfico.
- A técnica será realizada da seguinte maneira: inicialmente limpeza da pele com gaze umedecida com acetona a 3% em álcool para remoção de oleosidade e sujidades, e posteriormente aplicação homogênea do produto em toda a face. O produto permanecerá em

contato com a pele por um período de seis horas e, em seguida será removido através de lavagem com água e sabão. Exame clínico e fotografias digitais serão realizadas antes e após cada procedimento.

- Para participar deste estudo você não terá nenhum custo, nem receberá qualquer vantagem financeira. Você será esclarecido (a) sobre o estudo em qualquer aspecto que desejar e estará livre para participar ou recusar-se a participar. Poderá retirar seu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento. A sua participação é voluntária e a recusa em participar não acarretará qualquer penalidade ou modificação na forma em que é atendido pelo pesquisador
- O pesquisador irá tratar a sua identidade com padrões profissionais de sigilo.
- Os resultados da pesquisa estarão à sua disposição quando finalizada. Seu nome ou o material que indique sua participação não será liberado sem a sua permissão.
- O (A) Sr (a) não será identificado em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo.

Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias, sendo que uma cópia será arquivada pelo pesquisador responsável, na Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia e a outra será fornecida a você.

Caso haja danos decorrentes dos riscos previstos, o pesquisador assumirá a responsabilidade pelos mesmos.

Eu, _____, portador do documento de Identidade _____ fui informado (a) dos objetivos do estudo “**PEELING DE ÁCIDO RETINÓICO EM MICROEMULSÃO: AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA NO TRATAMENTO DE MELASMA**”, de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão de participar se assim o desejar.

Declaro que concordo em participar desse estudo. Recebi uma cópia deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada à oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

Eu, _____, RG nº _____ declaro ter sido informado e concordo em participar, como voluntário, do projeto de pesquisa acima descrito.

Jequié, ____ de _____ de _____

Nome do participante

Assinatura do paciente

Testemunha

Testemunha

Em caso de dúvidas com respeito aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar:

CEP- Comitê de Ética em Pesquisa - UESB

Telefone: (73) 3528- 9727

E-mail: cepuesb.jq@gmail.com

Pesquisador(a) Responsável: Ana Carolina Dias Viana de Andrade

Fone: (77) 9141-9828 / E-mail: caroldvaa@yahoo.com.br