

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

MÔNICA ESSELIN DE SOUSA LINO

**HIDROGÉIS DE QUITOSANA COMO SISTEMAS DE LIBERAÇÃO
TRANSDÉRMICA DE NICOTINA**

**Alfenas/MG
2014**

MÔNICA ESSELIN DE SOUSA LINO

**HIDROGÉIS DE QUITOSANA COMO SISTEMAS DE LIBERAÇÃO
TRANSDÉRMICA DE NICOTINA**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas.

Orientadora: Profª Drª Gislaine Ribeiro Pereira

**Alfenas/MG
2014**

Lino, Mônica Esselin de Sousa.

Hidrogéis de quitosana como sistemas de liberação transdérmica de nicotina / Mônica Esselin de Sousa Lino. - 2014.

80 f. -

Orientadora: Gislaine Ribeiro Pereira.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2014.

Bibliografia.

1. Quitosana. 2. Nicotina. 3. Administração transdérmica.
I. Pereira, Gislaine Ribeiro. II. Título.

CDD: 615.6

MÔNICA ESSELIN DE SOUSA LINO

**HIDROGÉIS DE QUITOSANA COMO SISTEMAS DE LIBERAÇÃO
TRANSDÉRMICA DE NICOTINA**

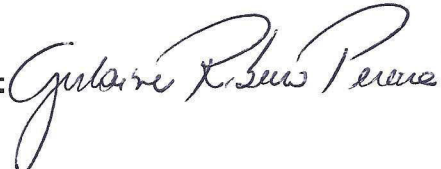
A banca examinadora abaixo-assinada aprova o Exame de Defesa apresentado como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas.

Aprovada em : 06/06/2014

Banca Examinadora:

Prof^a. Dr^a. Gislaine Ribeiro Pereira (Presidente)

Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Assinatura: 

Prof^a. Dr^a. Flávia Chiva Carvalho

Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Assinatura: 

Prof^a. Dr^a. Maria Teresa Junqueira Garcia

Instituição: Universidade de Uberaba

Assinatura: 

Aos meus pais, Carmen e Ton;
Às minhas irmãs, Carol, Débora e Marina e
Ao meu marido, Leonardo
pelo incentivo constante e por sempre acreditarem em mim.

AGRADECIMENTOS

À Prof^ª. Dr^ª. Gislaine Ribeiro Pereira, pela orientação, atenção e confiança dispensadas durante o desenvolvimento deste trabalho.

À Prof^ª. Dr^ª. Vanessa Bergamin Boralli Marques, à Prof^ª. Dr^ª. Isarita Martins Sakakibara, e ao Prof. Dr. Eduardo Costa de Figueiredo pela disponibilidade do cromatógrafo do Laboratório de Análises de Toxicantes e Fármacos – LATF, sem o qual a realização deste trabalho não seria possível. À pesquisadora e amiga do LATF, Patrícia Penido Maia pelo aprendizado e convivência.

Ao Prof. Marcello Garcia Trevisan e à equipe do Laboratório de Análises e Caracterização de Fármacos pela disponibilidade e colaboração nas análises de TG/DSC e Infravermelho.

Às técnicas do Laboratório de Pesquisa em Sistemas de Liberação de Fármacos, Neila e Andrea pelas inúmeras ajudas.

Aos meus pais, Carmen e Ton e minhas irmãs, Carol, Débora e Marina pelo apoio constante, incentivo e todo amor.

Ao meu marido, Leonardo por ser meu grande companheiro e por todo seu amor, e à sua mãe Lenita por ser um grande exemplo na minha vida.

Aos amigos do programa de Pós Graduação, pelo convívio diário e pelos momentos de descontração e de aprendizado: Aline, André Ruela, André Viana, Esther, Juliana, Lailah, Marcela, Olimpia, Taila e Valéria.

À amiga e colega de Pós Graduação, Jennifer pela ajuda com as análises e interpretações dos espectros de infravermelho.

Aos amigos que mesmo de longe, me apoiaram e acompanharam o desenrolar desse trabalho, em especial ao Luis Alberto, Michelle e Regiane.

A todos os meus amigos que de alguma forma torceram pela realização deste trabalho.

À CAPES e à UNIFAL pelo suporte financeiro.

Muito obrigada!

“Ando devagar porque já tive pressa e
levo esse sorriso porque já chorei demais.
Hoje me sinto mais forte, mais feliz, quem sabe;
só levo a certeza de que muito pouco sei, ou que nada sei.”

Almir Sater

RESUMO

Os dispositivos transdérmicos de liberação controlada apresentam diversas vantagens em relação à administração oral ou parenteral de fármacos, principalmente no controle prolongado da ação de fármacos. Nesse contexto, as formulações baseadas em quitosana, um polímero natural, têm apresentado grande potencial devido principalmente às suas características de atoxicidade, efeito promotor de absorção cutânea e propriedade de controle da liberação de fármacos. Os hidrogéis de quitosana são sistemas que permitem a difusão de água e moléculas através das cadeias poliméricas promovendo um controle na liberação de fármacos. A nicotina é um fármaco que possui a maioria das características físico-químicas favoráveis para administração através da pele, no entanto existe a dificuldade na obtenção de sistemas que controlem a liberação transdérmica da nicotina por mais de 24 horas. Neste trabalho, hidrogéis de quitosana reticulados ou não, hidratados ou parcialmente secos, foram desenvolvidos e avaliados como sistemas para controlar a liberação transdérmica de nicotina. Todos os hidrogéis avaliados foram capazes de controlar a permeação cutânea *in vitro* da nicotina através da pele de orelha de porco por um período de 48 horas, seguindo cinética de ordem zero. O hidrogel de quitosana não reticulado e parcialmente seco liberou quantidades maiores de nicotina para a pele. Estudos de intumescimento dos géis parcialmente secos demonstraram que a reticulação diminuiu o grau de intumescimento e a difusão da água no sistema e desta forma o gel não reticulado foi capaz de absorver uma maior quantidade de água, favorecendo a difusão da nicotina para a pele. Através das análises térmicas foi possível prever a estabilidade térmica dos hidrogéis. Os géis também foram caracterizados por espectroscopia no Infravermelho que foi capaz de demonstrar a reticulação do gel de quitosana com o glutaraldeído. Foi possível concluir que os hidrogéis de quitosana não reticulados e parcialmente secos são promissores no controle da permeação cutânea *in vitro* da nicotina, apresentando grande potencial como sistemas para liberação transdérmica de nicotina.

Palavras-chave: Quitosana. Nicotina. Sistemas de liberação transdérmica.

ABSTRACT

The transdermal delivery systems present several advantages over oral or parenteral drug administration mainly at extend control of drug action. In this context, the formulations chitosan-based, a natural polymer, have shown great potential mainly due to its characteristics of low toxicity, on permeation enhancing properties and control of drug release. Nicotine is a drug that has the most favorable physicochemical characteristics for transdermal administration; however there is the difficulty in obtaining systems that control the transdermal delivery of nicotine over 24 hours. In the present work, chitosan hydrogels crosslinked or uncrosslinked, hydrated or partially dried, were developed and evaluated as transdermal delivery systems of nicotine. All hydrogels evaluated were able to control the in vitro skin permeation of nicotine through pig ear skin for a period of 48 hours following zero order kinetics. The chitosan hydrogel uncrosslinked partially dried released higher amounts of nicotine to the skin. Swelling studies of the partially dried gels showed that the crosslinking decreased the degree of swelling and the diffusion of water into the system and therefore the uncrosslinked gel was able to absorb a larger amount of water, favoring the diffusion of nicotine to the skin. By the thermal analysis was possible to provide for the thermal stability of the hydrogels. The gels were also characterized by infrared spectroscopy that was able to demonstrate the crosslinking of chitosan gel with glutaraldehyde. It was concluded that the partially dried chitosan hydrogels are promising in the control of nicotine permeation in vitro skin, showing great potential as systems for transdermal delivery of nicotine.

Key-Words: Chitosan. Nicotine. Transdermal delivery systems

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ATR-FTIR	Espectrometria no Infravermelho com Transformada de Fourier com o modo de Refletância Total Atenuada
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DSC	<i>Differential Scanning Calorimetry</i> ou em português, Calorimetria Diferencial de Varredura
DTG	Primeira derivada da curva de TG
EC	Etrato Córneo
g	Força gravitacional
G	Gel hidratado não reticulado
GLU	Glutaraldeído
GR	Gel hidratado reticulado
GS	Gel parcialmente seco não reticulado
GSR	Gel parcialmente seco reticulado
J	Fluxo obtido pela equação da reta da curva de permeação de acordo com o modelo cinético de maior ajuste
K	Coefficiente de partilha
Log	Logaritmo
n	Número de réplicas
p/v	Peso por volume
pH	Potencial hidrogeniônico
pKa	Logaritmo da constante de dissociação ácida
PROP	Propilenoglicol
PTFE	Politetrafluoretileno
Q	Quantidade de fármaco permeada
QUI	Quitosana de alta viscosidade
r	Coefficiente de correlação linear
TG	Termogravimetria
UV	Ultravioleta
v/v	Volume por volume
α	Nível de significância

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estruturas da pele	17
Figura 2	Estruturas dos principais tipos de dispositivos transdérmicos	20
Figura 3	Estrutura química da nicotina	21
Figura 4	Desacetilação da quitina em quitosana	27
Figura 5	Esquema da célula de difusão vertical do tipo Franz	43
Figura 6	Permeação cutânea <i>in vitro</i> da nicotina através da pele de orelha de porco a partir dos hidrogéis úmidos. n = 3	49
Figura 7	Permeação cutânea <i>in vitro</i> da nicotina através da pele de orelha de porco a partir dos hidrogéis parcialmente secos. n = 3	51
Figura 8	Retenção cutânea de nicotina em pele de orelha de porco referente ao tempo de 48h. (n=3)	52
Figura 9	Porcentagem de hidratação dos hidrogéis de QUI em tampão fosfato pH 7,4 (n=3).	53
Figura 10	Curvas TG (a) e DTG (b) dos componentes dos sistemas.	54
Figura 11	Curvas de TG dos hidrogéis.	55
Figura 12	Curvas de DTG dos hidrogéis.	56
Figura 13	Curvas de DSC dos hidrogéis.	57
Figura 14	Espectros de ATR-FTIR dos hidrogéis.	58
Figura 15	Estruturas propostas para reticulação da quitosana com glutaraldeído (1,5-pentanodial): (a) Reticulação formada com uma molécula de glutaraldeído e duas unidades de quitosana, e (b) Reticulação formada com um grupo aldeído do glutaraldeído e uma unidade da quitosana	64
Figura 16	Representação esquemática de um hidrogel de quitosana carregado com nicotina (Nic) interagindo com moléculas de	

água (H₂O): (a) não reticulado e (b) reticulado com glutaraldeído.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Composição dos hidrogéis de quitosana	40
Tabela 2	Coefficientes de partilha da nicotina para a pele e estrato córneo a partir de água, propilenoglicol e hidrogel de quitosana a 1% (p/v) reticulado com glutaraldeído a 0,01% v/v.(n=3).	48
Tabela 3	Parâmetros cinéticos da permeação cutânea <i>in vitro</i> da nicotina a partir dos hidrogéis de quitosana reticulados ou não com glutaraldeído e controle. (n=3).	50
Tabela 4	Parâmetros cinéticos da permeação cutânea <i>in vitro</i> da nicotina a partir dos hidrogéis de quitosana reticulados ou não com glutaraldeído e parcialmente secos. (n=3).	51
Tabela 5	Principais bandas de infravermelho e grupamentos químicos relacionados para hidrogel de quitosana reticulado com glutaraldeído e não reticulado.	59

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	PERMEAÇÃO CUTÂNEA E SISTEMAS DE LIBERAÇÃO TRANSDÉRMICA	16
1.2	SISTEMAS DE LIBERAÇÃO TRANSDÉRMICOS DE NICOTINA	21
1.3	QUITOSANA E SEU EMPREGO EM SISTEMAS DE LIBERAÇÃO TRANSDÉRMICA	25
2	OBJETIVOS	33
2.1	OBJETIVO GERAL	33
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
3	PARTE EXPERIMENTAL	35
3.1	MATERIAL	35
3.1.1	Padrões, reagentes e solventes	35
3.1.2	Equipamentos e acessórios	36
3.2	METODOLOGIA	37
3.2.1	Determinação analítica da nicotina por CLAE	37
3.2.2	Determinação do coeficiente de partilha pele/veículo	38
3.2.3	Determinação do coeficiente de partilha estrato córneo/veículo ..	38
3.2.4	Obtenção das formulações	39
3.2.4.1	Hidrogéis de quitosana hidratados (G)	39
3.2.4.2	Hidrogéis de quitosana hidratados reticulados (GR)	39
3.2.4.3	Hidrogéis parcialmente secos (GS e GSR)	40
3.2.5	Estudos de permeação cutânea in vitro da nicotina a partir das formulações obtidas	41
3.2.5.1	Preparação da pele	41
3.2.5.2	Preparação do meio receptor	41
3.2.5.3	Estudos de permeação cutânea in vitro da nicotina	42

3.2.5.4	Análise dos resultados	43
3.2.5.5	Retenção Cutânea	43
3.2.6	Análise estatística dos resultados	44
3.2.7	Caracterização dos sistemas desenvolvidos	44
3.2.7.1	Grau de intumescimento	44
3.2.7.2	Análises térmicas	45
3.2.7.3	Espectrometria no Infravermelho com Transformada de Fourier com Refletância Total Atenuada (ATR-FTIR)	46
4	RESULTADOS	48
4.1	DETERMINAÇÃO DOS COEFICIENTES DE PARTILHA PELE/VEÍCULO E EC/VEÍCULO	48
4.2	ESTUDOS DE PERMEAÇÃO CUTÂNEA IN VITRO DA NICOTINA A PARTIR DAS FORMULAÇÕES OBTIDAS	49
4.3	CARACTERIZAÇÃO DOS SISTEMAS DESENVOLVIDOS	52
5	DISCUSSÃO	61
6	CONCLUSÃO	72
	REFERÊNCIAS	74

1 INTRODUÇÃO

A fumaça dos cigarros contém vários componentes, porém a nicotina é o mais importante deles, pelas ações no sistema nervoso central, efeitos vasculares e alta capacidade de causar dependência. Sendo assim, vem aumentando o número de fumantes que querem abandonar o fumo e a nicotina tem sido utilizada como terapia de reposição. Várias formas farmacêuticas têm sido utilizadas para esse fim, sendo possível destacar os dispositivos transdérmicos, que apresentam entre outras vantagens o controle da liberação do fármaco por um longo período de tempo e a facilidade da auto-administração e remoção (ZEVIN; GOURLAY; BENOWITZ, 1998; GORE; CHIEN, 1998; PRAUSNITZ; LANGER, 2008).

Os sistemas de liberação transdérmica consistem em dispositivos que liberam o fármaco para a pele a uma velocidade controlada com o objetivo de alcançar efeitos sistêmicos de forma mais conveniente e efetiva que a via parenteral e a via oral. Para alcançar a corrente sanguínea, o fármaco deve passar pelo processo de permeação cutânea, que ocorre como uma interação entre o fármaco, a pele e o veículo (BARRY, 2001; PRAUSNITZ; MITRAGOTRI; LANGER, 2004).

Nos últimos anos tem se buscado novos compostos e novas tecnologias para o desenvolvimento de dispositivos transdérmicos mais eficientes (BARRY, 2001; PETERSON, 2003; PRAUSNITZ; LANGER, 2008). Os polímeros sintéticos têm sido largamente utilizados em dispositivos transdérmicos, porém os estudos mais recentes mostram a busca por compostos naturais, livres de toxicidade e de baixa irritação cutânea. É nesse contexto que a quitosana tem despertado interesse de pesquisadores, pois além de ser um composto natural e biodegradável, tem-se mostrado eficiente como promotor de permeação cutânea (BERNKOP-SCHRÜCH; DÜNNHAUPT, 2012).

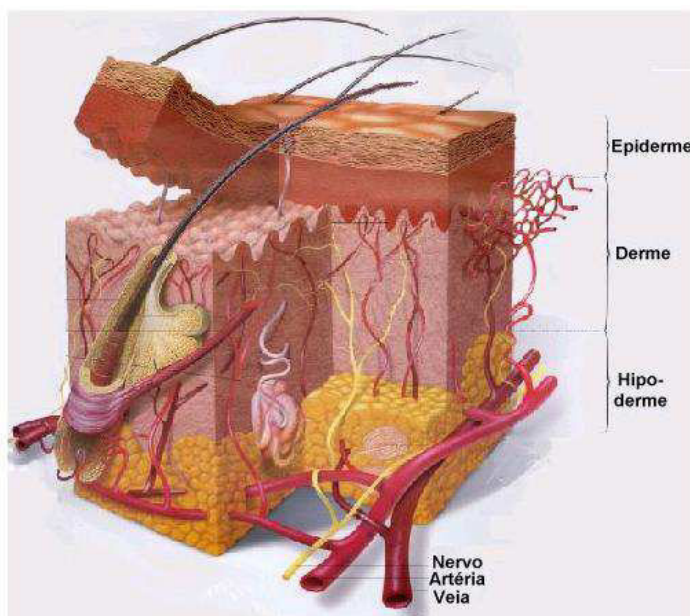
1.1 PERMEAÇÃO CUTÂNEA E SISTEMAS DE LIBERAÇÃO TRANSDÉRMICA

A pele (**Figura 1**) é considerada o órgão mais extenso do corpo e possui uma área de aproximadamente 2 m². Associada às mucosas, a pele tem a função de

proteção limitando a passagem de produtos químicos para dentro e fora do corpo. A pele é composta de duas camadas principais de tecidos: a epiderme e a derme. A epiderme é composta por cinco estratos, que de dentro para fora são germinativo (camada basal), espinhoso, granuloso, lúcido e córneo, é avascularizada e possui espessura variada, dependendo da parte do corpo. As células do estrato córneo são mortas e por isso a epiderme sem o estrato córneo é também conhecida como epiderme viável. A derme consiste de uma matriz de tecido conectivo de 3 a 5 mm de espessura que é atravessada por nervos, vasos sanguíneos e linfáticos e pelos apêndices da pele – glândulas sudoríparas, sebáceas e folículos pilosos (MOSER, 2001; MAGHRABY; BARRY; WILLIAMS, 2008; LAI-CHEONG; MCGRATH, 2009).

A epiderme, mais precisamente o estrato córneo, é a camada da pele responsável pela limitação da velocidade de penetração de substâncias na pele devido ao seu caráter lipofílico e de barreira. Por ser uma região avascular as substâncias são transportadas somente por difusão passiva. A difusão passiva ocorre através da epiderme intacta e dos apêndices cutâneos, no entanto eles ocupam somente 0,1% da superfície total da pele e a absorção por essa via é muito pequena (BARRY, 2001; MAGHRABY; BARRY; WILLIAMS, 2008).

Figura 1 – Estruturas da pele



Fonte: www.saudetotal.com.br/prevencao/topicos/anatomia.asp

A liberação de um fármaco a partir de uma formulação aplicada na superfície da pele e o seu transporte até atingir a circulação sanguínea consiste de várias

etapas, que podem ser descritas como: a) dissolução e liberação do fármaco da formulação; b) partição para o estrato córneo; c) difusão através do estrato córneo, principalmente via lipídeos intercelulares; d) partição do estrato córneo para a epiderme viável aquosa; e) difusão através da epiderme viável para a derme superior e f) absorção para a rede capilar local e eventualmente para a circulação sistêmica (KALIA; GUY, 2001).

O desenvolvimento de sistemas transdérmicos foi um grande avanço nos últimos anos no campo de liberação controlada de fármacos. O sucesso da administração transdérmica é baseado na obtenção do equilíbrio entre a liberação eficaz do fármaco e a segurança para a pele. Os sistemas de liberação transdérmica liberam o fármaco na pele a uma velocidade controlada, bem abaixo do nível máximo que o tecido pode aceitar (BARRY, 2001; PRAUSNITZ; LANGER, 2008).

As seguintes vantagens dos sistemas de liberação transdérmica podem ser destacadas (PRAUSNITZ; LANGER, 2008):

- São uma alternativa segura em relação à via oral para fármacos que apresentam baixa biodisponibilidade oral, sofrem metabolismo de primeira-passage e que possuem um tempo de meia-vida plasmática curto, ou seja, com intervalos pequenos entre as doses;
- Eliminam variáveis que influenciam na absorção gástrica, como mudanças de pH ao longo do trato gastrintestinal, presença de alimentos, ingestão de líquidos, tempo de esvaziamento gástrico e presença de enzimas humanas e bactérias que podem contribuir para degradação do fármaco;
- São uma alternativa às injeções hipodérmicas, evitando o uso de uma via invasiva com administração dolorosa e que expõe o paciente a riscos;
- Podem ser usados para fármacos com baixo índice terapêutico;
- Possuem uma melhor adesão do paciente e podem ser removidos prontamente;
- Permitem a liberação controlada e/ou prolongada do fármaco, por períodos que variam de dias a semanas, evitando oscilações nas concentrações plasmáticas e reduzindo a incidência de efeitos indesejáveis associados a picos de concentrações elevadas na corrente sanguínea.

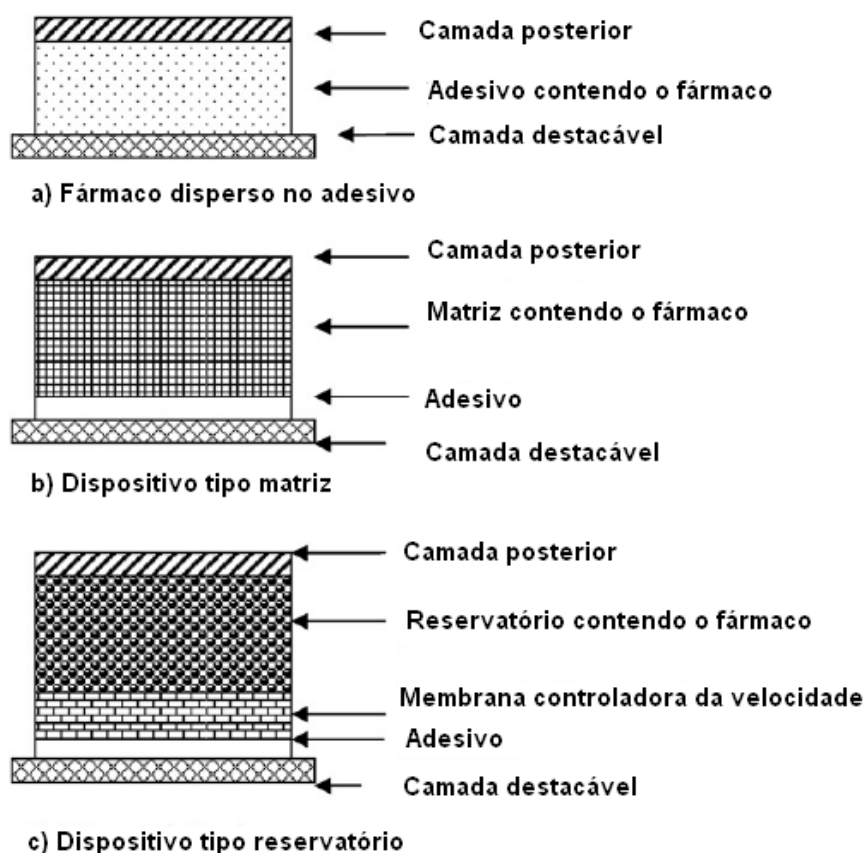
Os dispositivos transdérmicos podem ser classificados em três tipos principais: fármaco disperso no adesivo, tipo matriz e tipo reservatório, conforme **Figura 2** (FARAHMAND; MAIBACH, 2009).

Basicamente, os dispositivos transdérmicos são compostos pelas seguintes partes: um reservatório ou uma matriz polimérica contendo o fármaco, prensada entre duas camadas também poliméricas - uma posterior de suporte impermeável que evita a perda do fármaco durante o armazenamento e uma anterior de polímero adesivo e em alguns casos uma membrana controladora de velocidade de liberação do fármaco (FARAHMAND; MAIBACH, 2009).

No dispositivo do tipo reservatório, o fármaco está disperso na forma de solução, suspensão ou gel em um compartimento localizado entre a camada posterior e uma membrana controladora da velocidade. No dispositivo do tipo matriz, o fármaco está disperso homogeneamente em uma camada polimérica hidrofílica ou lipofílica, que é fixada por uma camada posterior e uma camada adesiva semipermeável ao fármaco. O tipo fármaco disperso no adesivo é uma variável do tipo matriz, sendo composto por uma dispersão do fármaco em polímero adesivo fixada por uma camada posterior impermeável e uma camada adesiva semipermeável ao princípio ativo (KANDAVILLI; NAIR; PANCHAGNULA, 2002; FARAHMAND; MAIBACH, 2009).

O sistema do tipo matriz ou monolítico é o mais comum por ser de fácil obtenção e de custo mais reduzido, sendo as matrizes hidrofílicas biodegradáveis as mais difundidas (LYRA et al., 2007).

Figura 2 – Estruturas dos principais tipos de dispositivos transdérmicos.



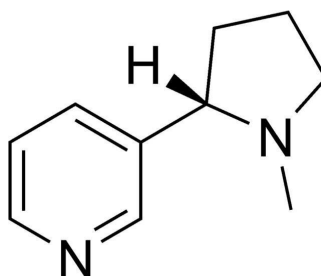
Fonte: FARAHMAND; MAIBACH (2009, p.8)

Os sistemas transdérmicos oferecerem diversas vantagens em relação a outras vias de administração, mas a barreira natural da pele representa um obstáculo à permeação de vários fármacos. Vencer a barreira da pele é o grande desafio no desenvolvimento de dispositivos transdérmicos. Para penetrar na pele, a molécula deve apresentar propriedades que favoreçam a permeação cutânea. As características ideais de uma molécula candidata para aplicação transdérmica são: possuir baixo peso molecular (preferencialmente menor que 600 Dalton), conter poucos grupamentos polares, estar na forma não ionizada, ser anfifílica, possuir baixo ponto de fusão (menor que 200 °C, correlacionado com solubilidade ideal) e ser eficiente em baixa dosagem (BARRY, 2001; MAGHRABY; BARRY; WILLIAMS, 2008; CEVC; VIERL, 2010; SILVA et al., 2010).

1.2 SISTEMAS TRANSDÉRMICOS DE NICOTINA

A nicotina (**Figura 2**) é um alcalóide líquido oleoso obtido das folhas do tabaco (*Nicotiana tabacum* L.). É uma base volátil, incolor, miscível em água, que se torna acastanhada e adquire o odor de tabaco quando exposta ao ar (USP DI, 1989; BENOWITZ; HUKANNEN; JACOB III, 2009).

Figura 3 – Estrutura química da nicotina



NOTA: Nome químico = 3-(1-metil-2pirrolinidil) piridina.
Fórmula molecular $C_{10}H_{14}N_2$;
Peso molecular = 162,23 g/mol.

Fonte: USP DI, 1989.

A nicotina é uma amina terciária que possui um anel piridínico e um pirrolidínico e dois grupamentos ionizáveis, possuindo dois valores de pK_a ($pK_{a1} = 3,04$ e $pK_{a2} = 7,84$). Existem dois isômeros da nicotina, o (*S*)-nicotina e o (*R*)-nicotina. O (*S*)-nicotina é o mais ativo, possuindo maior afinidade pelos receptores colinérgicos nicotínicos e está presente no tabaco. O isômero (*R*)-nicotina é somente um fraco agonista destes receptores. Durante o ato de fumar, pode ocorrer alguma racemização da molécula, e o fumante ser exposto a pequenas quantidades de (*R*)-nicotina. Por ser uma base fraca, a penetração da nicotina através da membrana celular é dependente do pH. Em pH ácido a nicotina está mais ionizada e não penetra tão rapidamente. Já em pH alcalino, a nicotina apresenta-se não-ionizada e a absorção do fármaco é extensa (ZEVIN; GOURLAY; BENOWITZ, 1998; PONGJANYAKUL; SUKSRI, 2010).

A presença da nicotina sustenta a dependência do tabaco, que por sua vez causa problemas de saúde devastadores, incluindo doenças cardíacas, pulmonares e câncer, prejudicando quase todos os órgãos do corpo. A dependência do fumo é considerada uma doença crônica e a maioria dos fumantes necessita de repetidas intervenções ao longo do tempo antes de alcançar a abstinência permanente (SOHN et al., 2003; BENOWITZ, 2008).

Devido aos efeitos nocivos do tabagismo o número de fumantes que tentam abandonar o vício tem aumentado e a nicotina tem sido largamente utilizada como terapia de reposição (GORE; CHIEN, 1998). A terapia de reposição de nicotina tem como objetivo aliviar a síndrome de abstinência psicológica e física associada à interrupção do tabagismo. Essa molécula também tem sido estudada como agente terapêutico para outras aplicações farmacêuticas, como colite ulcerativa, doença de Parkinson e doença de Alzheimer (ZEVIN; GOURLAY; BENOWITZ, 1998, CHOONARA et al., 2009).

A nicotina tem uma ação relativamente curta e não é bem absorvida pela via gastrointestinal, sendo administrada na forma de goma de mascar, *spray* nasal ou dispositivos transdérmicos (ZEVIN; GOURLAY; BENOWITZ, 1998). Já para administração transdérmica, a nicotina possui a maioria das características físico-químicas favoráveis para administração através da pele, e adesivos transdérmicos de nicotina disponíveis comercialmente são aplicados na pele para liberação controlada do fármaco por um período de 16 a 24 horas (ZEVIN; GOURLAY; BENOWITZ, 1998).

No Brasil, são comercializados duas marcas de adesivos transdérmicos de nicotina, Niquitin® e Nicotinell®, que possuem três diferentes concentrações de acordo com o estágio de tratamento do paciente – 7mg, 14mg e 21mg – para uso por 24 horas. O Niquitin® é produzido pela Alza Corporation® e distribuído no Brasil pela GlaxoSmithKline. Trata-se de um adesivo contendo um reservatório de nicotina e uma membrana controladora da velocidade de liberação do fármaco. Possui diferentes tamanhos de acordo com a dose de nicotina a ser liberada pelo período de 24 horas.

O Nicotinell® é produzido pela LTS Lohmann Therapie-Systeme AG e distribuído no Brasil pela Novartis. É composto basicamente por uma matriz polimérica carregada de nicotina e também possui diferentes tamanhos de acordo com a dose do fármaco a ser liberado para a pele no período determinado.

Os adesivos transdérmicos de nicotina entraram no mercado a partir da década de 90 e desde então diversos estudos têm abordado o desenvolvimento e avaliação deste tipo de sistemas, conforme os descritos a seguir.

Tirnaksiz e Yuce (2005) elaboraram um dispositivo transdérmico com reservatório de gel de carbopol e uma membrana de polietileno para regular a velocidade de liberação da nicotina. Inicialmente, avaliou-se a liberação da nicotina através da membrana de polietileno, obtendo-se uma cinética de ordem zero. Em seguida, prepararam-se os dispositivos transdérmicos avaliando o efeito da adição de propilenoglicol em diferentes concentrações no reservatório por um período de 24 horas. Os estudos de liberação *in vitro* demonstraram que as formulações contendo propilenoglicol no reservatório apresentaram um aumento na liberação e fluxo de nicotina, sendo mais rápido do que as formulações com reservatório sem propilenoglicol.

Davaran e colaboradores (2005) propuseram o desenvolvimento de um sistema para liberação transdérmica prolongada da nicotina. O sistema proposto baseou-se em um reservatório de gel de carbopol contendo propilenoglicol como solvente hidrofílico, complexos de inclusão β -ciclodextrina-nicotina e, além disso, uma membrana reguladora da velocidade de liberação constituída de polímero de álcool polivinílico (PVA). Estudos de permeação cutânea *in vitro* usando pele de rato demonstraram que as formulações obtidas permitiram a liberação controlada da nicotina por 48 horas. Os autores associaram a regulação da velocidade de liberação desse dispositivo à dissociação da nicotina dos complexos de inclusão com β -ciclodextrina e à quantidade inicial de nicotina e de propilenoglicol.

Pongjanyakul e Suksri (2009) prepararam filmes de alginato de sódio (AS) com complexos de inclusão de silicato de magnésio e alumínio (AS-SMA) carregados com nicotina em diferentes pHs (5, 7 e 10). Os sistemas foram caracterizados e estudos de liberação e permeação da nicotina em mucosa foram conduzidos usando filmes de AS-SMA e apenas AS carregados com nicotina. Conforme os resultados obtidos, em pH 5 a nicotina apresenta-se monoprotonada e foi adsorvida em maior extensão nas partículas de silicato devido às interações eletrostáticas. Esse fato resultou na formação de complexos de inclusão de nicotina silicato de magnésio e alumínio que formaram microreservatórios para o fármaco. Em pH 10 houve um aumento da permeação tanto nos filmes de AS como nos AS-SMA, embora a velocidade de liberação fosse menor para a formulação contendo o

complexo de inclusão SMA. A formulação AS-SMA demonstrou potencial para o uso como sistema de administração bucal.

Pongjanyakul e Suksri (2010) estudaram a relação do complexo alginato de sódio com silicato de magnésio e alumínio (AS-SMA) carregado com nicotina nas propriedades do filme e na permeação em mucosa. Filmes contendo diferentes quantidades do complexo AS-SMA carregados com nicotina foram preparados em pH ácido e alcalino, os quais representam a nicotina protonada e neutra respectivamente. Os resultados mostraram que houve formação do complexo entre MAS e nicotina sendo responsável pela liberação sustentada do fármaco. A velocidade de permeação da nicotina na mucosa esofágica diminuiu com o aumento da concentração de SA-MAS dos filmes e aumentou com aumento do pH da formulação.

Pichayakorn e colaboradores (2012) desenvolveram adesivos transdérmicos do tipo matricial usando látex de borracha natural desproteínada como sistema controlador da velocidade de liberação de nicotina combinada com carboximetilcelulose de sódio, metilcelulose ou polivinil álcool e os agentes plastificantes di-butilftalato ou glicerina em diferentes concentrações. Os sistemas foram caracterizados quanto às propriedades físicas e mecânicas e comparados quanto à permeação cutânea *in vitro* com dispositivos transdérmicos de nicotina comerciais. Os sistemas contendo látex de borracha combinado com polivinil álcool e com di-butilftalato ou glicerina em qualquer quantidade foram os mais adequados para a liberação controlada de nicotina. O sistema contendo dibutilftalato foi o que apresentou perfil de permeação cutânea *in vitro* mais semelhante ao dispositivo transdérmico comercial Nicotinell® enquanto que o sistema que continha glicerina foi ligeiramente superior. Os estudos foram conduzidos por 24 horas.

Pichayakorn e colaboradores (2013) também avaliaram o látex de borracha natural desproteínada como membrana controladora da velocidade de liberação da nicotina. Membranas de diferentes espessuras foram preparadas e seladas de modo a formar um reservatório que foi preenchido com solução de nicotina concentrada. Os sistemas foram caracterizados quanto às propriedades físicas e mecânicas e comparados quanto à permeação cutânea *in vitro* com dispositivos transdérmicos comerciais – Nicotinell®. A velocidade de permeação de nicotina na pele foi maior à medida que se diminuiu a espessura da membrana e aumentou a concentração de

nicotina no reservatório, sendo semelhante ao dispositivo comercial Nicotinell®. Os estudos foram conduzidos por 24 horas.

Ruela e colaboradores (2014) desenvolveram um dispositivo de liberação controlada de nicotina empregando polímeros impressos molecularmente. O sistema foi sintetizado usando a nicotina como molécula modelo através de ligações reversíveis, resultando numa matriz de copolímero com reconhecimento específico para a nicotina. Estudos comparativos de liberação e permeação cutânea *in vitro* foram realizados com formulações contendo os polímeros impresso e não impresso molecularmente. Os resultados obtidos demonstraram que o polímero impresso molecularmente promoveu uma liberação mais lenta que o polímero não impresso por um período de 48 horas.

1.3 QUITOSANA E SEU EMPREGO EM SISTEMAS DE LIBERAÇÃO TRANSDÉRMICA

Os polímeros podem ser considerados a estrutura principal dos sistemas transdérmicos, uma vez que são capazes de controlar a liberação do fármaco, sustentar a ação terapêutica ao longo do tempo e/ ou modular a liberação do fármaco para um determinado tecido ou órgão alvo (KANDAVILLI; NAIR; PANCHAGNULA, 2002).

A nicotina apresenta a maioria das características físico-químicas favoráveis para a administração através da pele. No entanto, da mesma forma que ela pode permear a pele também pode permear a maioria dos filmes de polímeros sintéticos. Além disso, muitos dos materiais comuns, tais como adesivos e membranas, são atacados ou degradados pela nicotina. Sendo assim, é difícil encontrar materiais e componentes adequados para criar sistemas contendo nicotina de uma forma segura e controlada (BACKER; KOCHINKE; HUANG, 1990).

A escolha do tipo de polímero é essencial para obter uma combinação adequada na cinética da liberação *in vitro*, grau de intumescimento, dissolução e permeação cutânea. Os hidrogéis preparados a partir de polímeros de origem natural oferecem propriedades vantajosas tendo sido considerados apropriados para

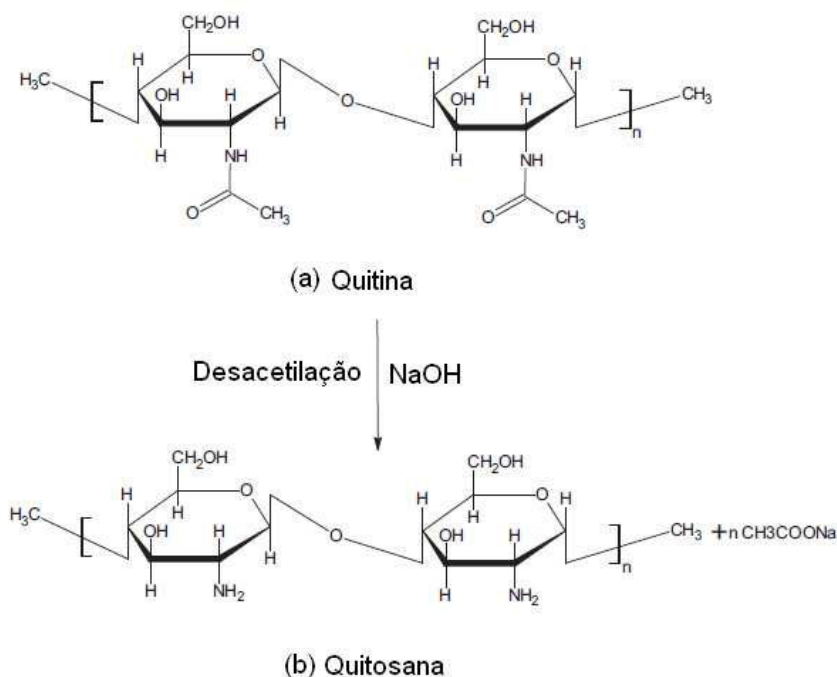
diferentes aplicações em sistemas de liberação de fármacos (VILLANOVA; ORÉFICE; CUNHA, 2010).

A quitosana, um polímero natural, tem sido largamente empregada como material estrutural de hidrogéis e membranas devido às suas características de biocompatibilidade, baixa toxicidade, biodegradabilidade, bioadesão e efeito promotor de absorção cutânea (BHATTARAI; GUNN; ZHANG, 2010; SENYIGIT et al., 2010).

Hidrogéis consistem em sistemas matriciais em que o fármaco está homogeneamente disperso na matriz polimérica e o controle da liberação se dá principalmente por difusão do fármaco através da matriz (KANDAVILLI; NAIR; PANCHAGNULA, 2002). Os hidrogéis de quitosana são formulações bastante simples que podem ser classificados como géis hidratados e géis reticulados. Os hidrogéis hidratados são fáceis de preparar, porém apresentam baixa resistência mecânica e tendência a se fluidificar. Os hidrogéis reticulados, por outro lado, apresentam uma rede tridimensional formada por cadeias poliméricas interconectadas com o agente reticulante, apresentam maior força mecânica e permitem a difusão de água e um melhor controle da liberação de substâncias. Estes últimos podem ser classificados como hidrogéis químicos, que são formados por uma ligação covalente irreversível de um agente de reticulação (por ex. glutaraldeído), e como hidrogéis físicos, formados por ligações reversíveis com vários ligantes ou interações secundárias com outros agentes poliméricos (BERGER et al., 2004; BHATTARAI; GUNN; ZHANG, 2010).

A quitina (**Figura 4a**) é o segundo polissacarídeo natural mais abundante na natureza, atrás apenas da celulose, sendo encontrada principalmente na carcaça de crustáceos, como lagosta, camarão e caranguejos (DUTTA; DUTTA; TRIPATHI, 2004). A quitosana (**Figura 4b**) é um derivado da quitina, obtida pela desacetilação parcial desta em estado sólido sob condições extremas de alcalinidade ou na presença da quitina desacetilase pela hidrólise enzimática. A nomenclatura quitosana é usada quando o grau de desacetilação da quitina atinge cerca de 50% sendo comercializada com graus de desacetilação variando de 70 a 95%, com massa molar na faixa de 10^4 - 10^6 g/mol (CANELLA; GARCIA, 2001; RINAUDO, 2006).

Figura 4: Desacetilação da quitina em quitosana.



NOTA: (a) Quitina = β - (1 \rightarrow 4)-N-Acetil-D-glicosamina para formação da quitosana
 (b) Quitosana = α (1 \rightarrow 4)-2-amino-2-desoxi- β -D-Glicopiranosse.

Fonte: Shukla (2013, p.48).

Após a desacetilação, a quitosana se torna solúvel em meio ácido. A solubilização ocorre pela protonação do -NH_2 no carbono C2 (posição que a D-glucosamina se repete) e o polissacarídeo é convertido em um polieletrólito em meio ácido (RINAUDO, 2006).

A quitosana pode sofrer derivatizações específicas dos grupos funcionais, permitindo a formulação de materiais variados como fibras, membranas e gel. Esta versatilidade aliada ao fato de ser um material biodegradável, tem despertado interesse de pesquisadores da área biomédica e farmacêutica desde os anos de 1990 (GIRI et al., 2012; BERNKOP-SCHRÜCH; DÜNNHAUPT, 2012).

Dentre as aplicações farmacêuticas da quitosana, destaca-se o emprego como componentes em hidrogéis, nanopartículas, microsferas e filmes para aplicações biomédicas e farmacêuticas (TSAI et al., 1999; RODRIGUES et al., 2009; SENYIGT et al., 2010; CHOI et al., 2012). Considerando a habilidade destes materiais em controlar a liberação de fármacos e o seu efeito promotor de absorção,

diversos estudos têm sido desenvolvidos com a finalidade de melhorar a eficácia terapêutica de fármacos em aplicações nasal, ocular, oral, e transdérmica, conforme descritos a seguir (BERNKOP-SCHRÜCH; DÜNNHAUPT, 2012).

Thacharodi e Rao (1996-a) estudaram sistemas transdérmicos de liberação controlada baseados em quitosana tendo como modelo de fármaco hidrofílico, o cloridrato de propranolol, e de fármaco lipofílico, o nifedipino. As formulações foram compostas por membrana e gel reservatório. Foram desenvolvidas membranas contendo uma mistura de quitosana e colágeno para os dois fármacos, porém os sistemas de reservatórios utilizados foram de composições diferentes. Foi usado para o propranolol, o propilenoglicol e o promotor de penetração eucaliptol e para o nifedipino, gel de alginato de cálcio e óleo de canela como promotor de absorção. Nos dois casos, observou-se um controle na liberação por um período de 24 horas, demonstrando que a membrana de quitosana-colágeno foi eficiente no controle da liberação tanto para um fármaco hidrofílico como um lipofílico.

Thacharodi e Rao (1996-b) também desenvolveram sistemas transdérmicos de liberação controlada para o nifedipino, utilizando membranas de quitosana reticulada com glutaraldeído em diferentes concentrações. O sistema, além da membrana que controla a velocidade de liberação, foi composto por gel de alginato e óleo de cravo. A quantidade de fármaco liberada foi dependente da porosidade das membranas de quitosana reticuladas que foram capazes de controlar a liberação por um período de 24 horas.

Thein-Han e Stevens (2004) desenvolveram sistemas transdérmicos constituído de membrana de quitosana e gel de quitosana como reservatório do fármaco lidocaína. Foram avaliadas quitosanas de diferentes graus de desacetilação (70%, 88% e 95%) e mesmo peso molecular, bem como membranas de diferentes espessuras (10µm, 20 µm e 40 µm). O sistema que continha a membrana de quitosana de maior grau de desacetilação (95%) e maior espessura (40 µm) foi o que apresentou menor velocidade de liberação do fármaco *in vitro*, e em testes *in vivo*, manteve a ação anestésica da lidocaína por um tempo maior.

Cao e colaboradores (2007) desenvolveram um gel termossensível de quitosana contendo maleato de timolol que foi comparado com colírios tradicionais de maleato de timolol quanto à eficiência na redução da pressão intra-ocular em coelhos com glaucoma induzido. Os autores observaram uma maior concentração do fármaco no humor aquoso após a aplicação do gel desenvolvido, comparado com

a aplicação de colírio, e uma redução da pressão intra-ocular mais eficiente num período de 30 horas de estudo. Além disso, o gel de quitosana foi considerado não citotóxico e compatível com aplicação ocular para liberação controlada de fármacos.

Rodrigues e colaboradores (2009) estudaram o perfil de liberação de dexametasona através de um sistema de uma e duas camadas de membrana de quitosana. O sistema de monocamada controlou a liberação por até 16 horas e o de bicamada manteve a liberação controlada por 60 horas. Concluiu-se ser possível controlar a liberação de dexametasona por variados períodos.

Campos e colaboradores (2009) avaliaram membranas de quitosana reticuladas com hexametileno 1,6-bis (aminocarboxisulfonato) como curativos de liberação controlada de gentamicina. Foram avaliadas diferentes concentrações de gentamicina e de agente reticulante. Os resultados demonstraram que quanto maior a concentração inicial de gentamicina e quanto maior o grau de reticulação da membrana, mais lenta a liberação do fármaco num período de 14 dias. Sendo assim, os pesquisadores concluíram que a taxa de difusão é regulada pela concentração inicial do fármaco e pelo grau de reticulação da membrana. A rede polimérica criada funcionou como uma barreira no controle de difusão da gentamicina.

Gratieri e colaboradores (2011) desenvolveram géis de quitosana e géis de quitosana ligada ao copolímero poloxamer para administração ocular de fluconazol em coelhos. Verificou-se que tanto o gel de poloxamer como o de quitosana foram capazes de retardar a liberação do fluconazol quando comparados à simples solução aquosa do fármaco. Porém, a liberação foi mais lenta quando se combinou quitosana e poloxamer.

Aldana e colaboradores (2012) desenvolveram e caracterizaram membranas de quitosana com genipim e polivinilpirrolidona (PVP), dois agentes reticulantes, para liberação controlada de fármacos na cavidade bucal usando cloridrato de propranolol como fármaco modelo. Foram preparadas membranas com diferentes proporções de quitosana/genipim e proporção constante de PVP. As membranas obtidas foram avaliadas quanto ao total de amins primárias livres, intumescimento, análise térmica, propriedades mecânicas, e liberação *in vitro*. As membranas que obtiveram melhores resultados de liberação foram aquelas compostas por quitosana-genipim-0,10% e quitosana-genipin-0,10%-PVP que foram capazes de liberar 80% do fármaco em um período de 7 horas, o que foi considerado uma dose ótima. As propriedades mecânicas e comportamento térmico das membranas

também foram considerados adequados e de potencial promissor para uso em lesões bucais.

Kim, Lim e Park (2013) desenvolveram curativos para feridas em forma de membranas porosas utilizando quitosana de médio e alto peso molecular ligadas a poly(L-DOPA). O estudo pretendia avaliar a velocidade de liberação de moléculas a partir de membranas de quitosana de diferentes porosidades, utilizando o corante Rodamina B como substância modelo. Após avaliação da superfície das membranas por microscopia eletrônica e estudos de liberação, os pesquisadores perceberam que a membrana mais porosa, preparada com quitosana de médio peso molecular apresentou uma velocidade de liberação 1,5 vezes maior que a apresentada pela membrana de quitosana de alto peso molecular. Sendo assim demonstraram que o peso molecular da quitosana é importante na formação da rede porosa e controle na liberação de moléculas.

Can e colaboradores (2013) desenvolveram e caracterizaram membranas de quitosana para liberação transdérmica de cloridrato de ondansetrona. Foi utilizada quitosana de alto peso molecular como matriz polimérica, 2-(2-etoxi-etoxi) etanol (Transcutol®) como agente plastificante e três diferentes tipos de terpenos – limoneno, nerolidol e eucaliptol – como promotores de penetração. O gel de quitosana usado para formação das membranas foi caracterizado e avaliado quanto às propriedades físico-químicas e de bioadesão. As membranas de quitosana formuladas também foram avaliadas quanto às características físico-químicas, mecânicas, de bioadesão, sendo consideradas satisfatórias nestes quesitos. A permeação cutânea *in vitro* da ondansetrona foi avaliada por 24 horas e a formulação contendo eucaliptol foi a que apresentou maior fluxo de ondansetrona através da pele, sendo o melhor promotor de penetração entre os terpenos.

Kim e colaboradores (2013) desenvolveram sistemas de liberação transdérmicos utilizando membrana porosa de quitosana e diferentes concentrações de nitrato de prata e borohidrato de sódio. As membranas formadas foram avaliadas quanto ao tamanho dos poros, cristais de prata, resistência à tração, ângulo de contato e liberação transdérmica, usando Rodamina B como molécula modelo. A combinação ótima, que apresentou alta força mecânica, e eficiência de liberação foi 3% de nitrato de prata, 1% de quitosana de 1% e 0,003% de borohidrato de sódio. A liberação de Rodamina B a partir das formulações contendo nitrato de prata foi aproximadamente 1,5 vezes mais rápida do que na formulação sem nitrato de prata.

Sugeriu-se que o aumento da velocidade de liberação foi devido ao aumento da hidrofiliabilidade causada devido à presença da prata e do acetato de prata formados na formulação.

A introdução de um novo fármaco no mercado, além de levar vários anos de pesquisa, envolve custos altíssimos. Assim, a procura por novos sistemas de liberação tem se tornado importante no sentido de se estabelecer alternativas terapêuticas mais eficientes, que possibilitem administrar os fármacos com mais segurança e com efeitos colaterais minimizados (MARCHETTI; SARAIVA, 2009). O estudo de formulações transdérmicas para liberação controlada de nicotina é de grande interesse, pois muitos sistemas de liberação para este fármaco apresentam dificuldades em controlar a liberação da nicotina por um período superior a 24 horas.

2 OBJETIVOS

Os objetivos desse trabalho estão divididos em objetivo geral e objetivos específicos.

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo do trabalho foi desenvolver e caracterizar sistemas de liberação transdérmica empregando quitosana para administração cutânea de nicotina.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Desenvolver hidrogéis de quitosana para emprego em sistemas de liberação transdérmica de nicotina, variando as concentrações da quitosana, do agente reticulante, do plastificante da formulação e o teor de água.
- b) Avaliar a permeação cutânea *in vitro* da nicotina a partir dos sistemas desenvolvidos.
- b) Caracterizar física e quimicamente os sistemas desenvolvidos através da determinação do grau de intumescimento, análises térmicas e análise por espectroscopia na região do infravermelho.

3 PARTE EXPERIMENTAL

A parte experimental desse trabalho está dividida em material e metodologia.

3.1 MATERIAL

O material usado foi dividido em padrões, reagentes e solventes e em equipamentos e acessórios.

3.1.1 Padrões, reagentes e solventes

- (-)-Nicotina $\geq 99,00\%$ (CG) base líquida – Sigma-Aldrich®
- Acetonitrila grau UV/HPLC espectroscópico – Proquímios®
- Ácido Acético P.A. – Vetec®
- Ácido Fosfórico P.A. – Proquímios®
- Água ultra pura – sistema Milli-Q®-Millipore®
- Cloreto de Potássio P.A. – Vetec®
- Cloreto de Sódio P.A. – Vetec®
- Fosfato de Potássio Monobásico Anidro P.A. – Vetec®
- Fosfato de Sódio Dibásico Anidro P.A. – Proquímios®
- Fosfato de Sódio Monobásico Monohidratado P.A. – Proquímios®
- Glutaraldeído Solução, grau II, 25% em H₂O – Sigma-Aldrich®
- Hidróxido de Sódio (lentilhas) P.A. – Vetec®
- Propilenoglicol – Vetec®
- Quitosana altamente viscosa, extraída da casca de carangueijo – Sigma-Aldrich®
- Soluções tampão de pH 4,0 e 7,0 – MS Tecnopon®

3.1.2 Equipamentos e acessórios

- Agitador magnético com chapa aquecedora – Marconi®
- Balança Analítica – Shimadzu®, modelo AUZ 220
- Banho de Ulltrassom – Unique®
- Barras magnéticas
- Bomba de vácuo – Primatec®
- Calorímetro Diferencial de Varredura, modelo SII, DSC 7020 – Exstar®
- Célula de difusão vertical, com volume de 7,0mL e área de difusão de 1,77cm² – Microette Plus, Hanson Research®
- Coluna Cromatográfica C18 Acqua (150,0 X 4,6 d.i.) mm 125 Å 5µm – Phenomenex®
- Dermatômetro 75mm, acoplado a motor TCM 3000 – Nouvag®
- Equipamento de Termogravimetria, modelo SII, TG/DTA 7300 – Exstar®
- Espectrofotômetro de infravermelho com transformada de Fourier, modelo Nicolet IS50, FT-IR, com módulo de aquecimento Thermo Scientific® - Pike Technologies, Gladi ATR.
- Estufa de Secagem e esterilização com circulação de ar – Solab Científica®
- Filtro de seringa com membrana PTFE modificada para filtração de solventes aquosos e orgânicos 0,45µm 13mm não-estéril - Millex®
- Homogeneizador de tecidos tipo Turrax – Marconi®, modelo MA102
- Medidor de pH – MS Tecnopon®, modelo mPA-210
- Membrana para filtração de solventes aquosos e orgânicos em PTFE modificado 0,45 µm – Millipore®
- Pipetador automático de volume ajustável 100 - 1000 µL – Kacil®
- Pipetador automático de volume ajustável 10-100 µL – Digipet®
- Pipetador automático de volume ajustável 40 - 200 µL – Kacil®
- Pré-coluna C18 Acqua (4,0 X 3,0) mm – Phenomenex®
- Seringas de 1mL

- Sistema de cromatografia líquida de alta eficiência, com módulo de injeção automática, forno para coluna e sistema controlador acoplado com detector DAD, modelo SPD-M10AVP – Shimadzu®
- Sistema de cromatografia líquida de alta eficiência, com módulo de injeção automática e sistema controlador acoplado com detector UV, modelo CBM-20A – Shimadzu®
- Sistema para filtração de solventes da fase móvel – Millipore®
- Sistema para purificação de água por osmose reversa – Milli-Q®

3.2 METODOLOGIA

A metodologia engloba entre outros itens, o método analítico para determinação de nicotina, as formulações, os estudos de permeação e a caracterização dos sistemas obtidos.

3.2.1 Determinação analítica da nicotina por CLAE

A quantificação da nicotina nas diversas etapas experimentais foi realizada por CLAE, de acordo com método previamente desenvolvido e validado no laboratório. As condições cromatográficas empregadas foram: coluna de fase reversa C18, (150X4,6 mm e partículas de 4 μm) e pré-coluna (15x3.2 mm e partículas de 4 μm); fase móvel composta de tampão fosfato (20 mM) e 0,2% de trietilamina : acetonitrila (8:2), com pH final de 6,9 ajustado com ácido fosfórico; fluxo de 1,0 mL; volume de injeção de 50 μL ; detecção no UV em 260 nm; temperatura ambiente (RUELA et al., 2013).

3.2.2 Determinação do coeficiente de partilha pele/veículo

Estas determinações foram baseadas no método proposto por Scheuplein et al. (1969).

Amostras de pele de orelha de porco com área de aproximadamente 1,77 cm², foram cortadas, transferidas para tubos Falcon contendo 2,0 mL de soluções de nicotina a aproximadamente 5 mg/mL nos seguintes veículos: água, propilenoglicol e gel de quitosana a 1% (p/v) reticulado com glutaraldeído a 0,01% (v/v). As soluções foram agitadas em agitador magnético do tipo vortex por 6 minutos, centrifugadas por 10 minutos a 755 g e filtradas em papel de filtro quantitativo. Os experimentos foram realizados em triplicata. A concentração de nicotina nas soluções foi quantificada antes (C₁) e após a partilha (C₂), e os coeficientes de partilha (K) foram determinados segundo a seguinte equação:

$$K = (C_1 - C_2) / C_2 \quad (\text{Equação 1})$$

3.2.3 Determinação do coeficiente de partilha estrato córneo/veículo

Estas determinações foram baseadas no método proposto por Bentley et al. (1997).

O estrato córneo (EC) da pele de orelha de porco foi isolado após “flutuação” de amostras de pele em solução aquosa de tripsina 0,4% (p/v) e de bicarbonato de sódio 0,5% (p/v) por um período de 5 horas a temperatura ambiente. As membranas de estrato córneo obtidas foram lavadas com água purificada e secas em papel de filtro.

Amostras de EC, com área de 1,77cm², foram cortadas, transferidas para tubos Falcon contendo 2,0 mL de soluções de nicotina a aproximadamente 5 mg/mL nos seguintes veículos: água, propilenoglicol e gel de quitosana a 1% (p/v) reticulado com glutaraldeído a 0,01% (v/v). A determinação do coeficiente de partilha estrato córneo/veículo foi realizada conforme descrito no item anterior.

3.2.4 Obtenção das formulações

Foram obtidos hidrogéis hidratados e parcialmente secos, reticulados e não reticulados conforme descrito a seguir.

3.2.4.1 Hidrogéis de quitosana hidratados (G)

Hidrogéis de quitosana foram preparados através da adição de quitosana de alta viscosidade, sob vigorosa agitação, a uma solução de ácido acético a 10% (v/v) contendo nicotina. A agitação foi mantida por aproximadamente 4 horas até completa dispersão da quitosana, foi adicionado propilenoglicol e a agitação mantida até completa homogeneização. Os géis foram mantidos em descanso por 24 horas até o início dos experimentos de permeação. A descrição dos componentes presentes nos hidrogéis de quitosana está apresentada na **tabela 1**.

3.2.4.2 Hidrogéis de quitosana hidratados reticulados (GR)

Para a preparação dos hidrogéis reticulado procedeu-se a dispersão da quitosana em meio ácido conforme descrito no item anterior, e após a adição do propilenoglicol foi acrescentada uma solução aquosa de glutaraldeído (GLU) a 0,1% (v/v). Também foram preparados géis adicionando-se a nicotina após a formação do gel de quitosana e acrescentando o agente reticulante em seguida. Ainda preparou-se gel ajustando o pH final para 6,0.

3.2.4.3 Hidrogéis parcialmente secos (GS e GSR)

Também foram preparados sistemas do tipo matricial ou monolítico, pelo método de modelagem sobre suporte e secagem parcial do solvente. Foram preparados géis de quitosana conforme descrito nos itens 3.2.4.1 e 3.2.4.2, no entanto com a adição de 10% (v/v) de propilenoglicol. Após a preparação dos géis, 7,0 g de gel foram transferidos para placa de Petri de 4 cm de diâmetro e mantidos em estufa a 30°C até a perda de água de cerca de 60%, calculado como perda de peso do gel – cerca de 60 horas para o gel não reticulado e 15 horas para o reticulado. Ao final do tempo de secagem, a placa foi tampada com parafilm® e papel alumínio por pelo menos 24 horas até o início do experimento. Imediatamente antes do início dos experimentos de permeação, os géis parcialmente secos foram pesados, recortados com uma faca circular fornecendo uma área de 1,77 cm² e pesados novamente. Os hidrogéis parcialmente secos não reticulados foram identificados como GS e os parcialmente secos e reticulados como GSR.

Tabela 1 – Composição dos hidrogéis de quitosana

Identificação		Quitosana (% p/v)	Propilenoglicol (% p/v)	Glutaraldeído (% p/v)	pH da formulação
Géis Hidratados	G1	1	5	-	4,7
	G2	2	5	-	4,7
	GR1	1	5	0,01	4,7
	GR2	1	5	0,01	6,0
	GR3*	1	5	0,005	4,7
Géis Parcialmente Secos	GS1	1	10	-	6,0
	GSR1	1	10	0,005	4,5
	GSR2	1	10	0,01	4,5

* Adição de nicotina após preparo do gel e antes da reticulação

Fonte: Dados da autora.

3.2.5 Estudos de permeação cutânea *in vitro* da nicotina a partir das formulações obtidas

Para os estudos de permeação cutânea, previamente foi necessário o preparo da pele da orelha de porco e do meio receptor. Após os estudos de permeação cutânea *in vitro* foram executados os estudos de retenção cutânea *in vitro*. Todas as etapas estão descritas a seguir.

3.2.5.1 Preparação da pele

Nos estudos de permeação cutânea *in vitro* foram empregadas peles de orelhas de porcos. As orelhas, obtidas em abatedouro local, foram lavadas em água potável corrente e a pele imediatamente dissecada com auxílio de material cirúrgico. Vasos sanguíneos e tecidos adiposos também foram removidos. A pele foi mantida congelada a -70°C até sua utilização. No momento do experimento a pele foi descongelada a temperatura ambiente e dermatomizada com auxílio de dermatômetro cirúrgico.

3.2.5.2 Preparação do meio receptor

O meio receptor utilizado nos estudos de permeação cutânea *in vitro* consistiu em tampão fosfato pH 7,4 isotônico. Para sua preparação foram dissolvidos 1,73g de fosfato de sódio dibásico anidro, 0,2g de fosfato de potássio monobásico anidro, 8,0 g de cloreto de sódio e 0,2g de cloreto de potássio em 1000 mL de água ultrapura. O pH foi ajustado para 7,4 com ácido fosfórico 85%, filtrado em membrana de PTFE 0,45 μm e degaseificado em ultrassom a vácuo por 60 minutos antes da montagem do experimento.

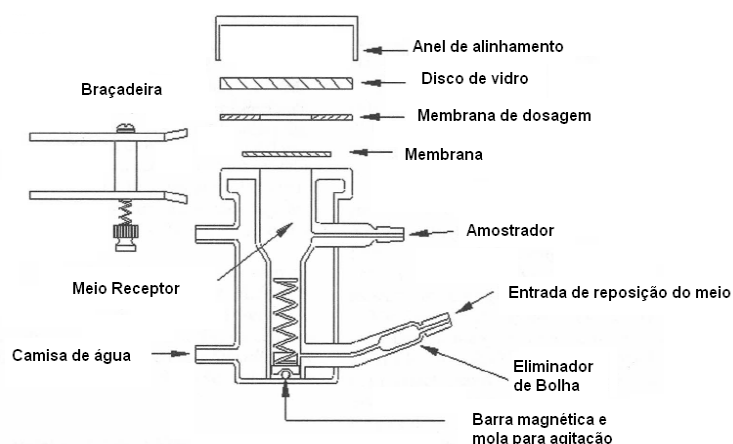
3.2.5.3 Estudos de permeação cutânea *in vitro* da nicotina

Os estudos de permeação cutânea *in vitro* foram realizados empregando-se células de difusão vertical tipo Franz (Microette – Hanson) (Figura 4) e pele de orelha de porco dermatomizada (700 μm) como membrana.

A célula de Franz possui dois compartimentos, um compartimento doador na parte superior, contendo o fármaco e outro contendo uma solução receptora onde o fármaco é solúvel. Os dois compartimentos são separados por uma membrana natural, no caso pele de orelha de porco. A formulação a ser testada foi colocada em cima da pele, no compartimento doador. A passagem do fármaco através da pele para o compartimento receptor foi monitorada pela análise de amostras do meio receptor coletadas em diferentes tempos. A célula de difusão utilizada possui 7,0mL de volume no compartimento receptor e possibilidade de aplicação de até 300mg da formulação testada no compartimento doador.

No compartimento doador foram aplicadas as seguintes formulações: 300 mg dos géis de quitosana (reticulados ou não) fornecendo uma concentração de nicotina de 9 mg em cada célula ou 200 mg dos géis parcialmente secos, fornecendo uma concentração de nicotina de 14 mg em cada célula. Como controle foi avaliada solução de nicotina em água. O meio receptor foi mantido a temperatura de $32 \pm 1^\circ\text{C}$ (TIRNAKSIZ; YUCE, 2005), sob agitação de 600 rpm. Deste compartimento receptor foram coletadas amostras de 1,0 mL por um período de 48 horas, com imediata reposição do meio receptor. As amostras foram filtradas em filtro de seringa de PTFE modificado 0,45 μm e quantificadas por CLAE.

Figura 5: Esquema da célula de difusão vertical do tipo Franz.



Fonte: Adaptado de Shah, et al. (2006, p. 1590)

3.2.5.4 Análise dos Resultados

Os perfis de permeação da nicotina foram construídos relacionando a quantidade de fármaco permeada por área de difusão – Q ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) em função do tempo (horas) e os diferentes modelos cinéticos foram aplicados:

- Ordem zero (Q versus tempo);
- Pseudo-primeira ordem ou Higuchi (Q versus raiz quadrada do tempo);
- Primeira Ordem ($\log Q$ versus tempo).

Para caracterizar o modelo de cinética de permeação de melhor ajuste foi feita a comparação entre o coeficiente de correlação linear (r) para cada modelo. Após estabelecer o modelo cinético com melhor ajuste, determinou-se o fluxo de permeação do fármaco (J), definido pela inclinação da reta no modelo selecionado.

3.2.5.5 Retenção Cutânea

Após os estudos de permeação cutânea *in vitro*, a pele foi retirada da célula de difusão vertical de Franz e lavada com água purificada para que os resíduos das formulações fossem eliminados. A área da pele em contato direto com a formulação

e responsável pela difusão do fármaco, foi recortada, picotada e transferida para tubos de polietileno. Foi acrescentado 10mL de tampão fosfato pH 7,4 e 1mL de acetonitrila. A mistura foi triturada em homogeneizador de tecidos do tipo Turrax por 5 minutos e em seguida centrifugada a 969 g por 15 minutos. Uma alíquota do sobrenadante foi coletada, filtrada em filtro de seringa de PTFE modificado 0,45 μ m e analisada por CLAE para determinação da quantidade de nicotina retida na pele.

3.2.6 Análise estatística dos resultados

A análise estatística dos resultados foi realizada pelo programa Sisvar[®] (FERREIRA, 2008). Os resultados encontrados foram avaliados estatisticamente por análise de variância (ANOVA) e teste Scott e Knott para comparação de médias com nível de significância $\alpha=5$ %. Foram consideradas diferenças significativas valores de $p<0,05$.

3.2.7 Caracterização dos sistemas desenvolvidos

Os sistemas foram caracterizados por grau de intumescimento, análises térmicas e por espectrometria no infravermelho conforme descritos a seguir.

3.2.7.1 Grau de intumescimento

O grau de intumescimento dos hidrogéis parcialmente secos foi determinado e expresso através da porcentagem de água absorvida. Círculos de hidrogéis parcialmente secos reticulados e não reticulados (n=3) foram pesados sobre uma membrana semipermeável de acetato de celulose e montados sobre um recipiente contendo tampão fosfato pH 7,4, mantido a 32°C. A capacidade de hidratação e intumescimento das formulações foi determinada pela pesagem dos círculos dos

hidrogéis antes e após a absorção de água em intervalos pré-determinados até peso constante.

O grau de intumescimento das formulações foi calculado através da relação entre o peso inicial do hidrogel, antes do intumescimento ($P_{inicial}$) e o peso do hidrogel intumescido (P_{final}) a partir da equação:

$$\% \text{intumescimento} = \frac{P_{final} - P_{inicial}}{P_{inicial}} \times 100 \quad (\text{Equação 2})$$

3.2.7.2 Análises térmicas

Foram realizadas análises térmicas de amostras dos componentes das formulações – quitosana, nicotina, propilenoglicol, glutaraldeído – e dos hidrogéis reticulados ou não e carregados ou não com nicotina, empregando Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) e Termogravimetria (TG).

O equipamento de DSC foi calibrado com padrão de Índio (ponto de fusão 156,63°C, entalpia – 28,45 J/g). Cerca de 40,0 mg de amostra foi acondicionada em cadinhos de alumínio e analisadas no intervalo de temperatura de -5 a 300°C, a uma razão de aquecimento de 10°C.min⁻¹ e em atmosfera dinâmica com fluxo de nitrogênio constante de 50mL.min⁻¹.

A análise termogravimétrica foi realizada com cerca de 40,0 mg das amostras, pesadas em cadinho de alumínio. As análises foram realizadas no intervalo de temperatura de 30 a 400°C com razão de aquecimento de 10°C. min⁻¹ e em atmosfera dinâmica com fluxo de nitrogênio constante de 50mL.min⁻¹.

3.2.7.3 Espectrometria no Infravermelho com Transformada de Fourier com Refletância Total Atenuada (ATR-FTIR)

Foram realizadas varreduras espectrais da nicotina, da quitosana e dos hidrogéis através de Espectrometria no Infravermelho com Transformada de Fourier usando o modo de transmitância e Refletância Total Atenuada (ATR - FTIR). Os espectros foram obtidos na faixa de comprimento de onda de 4000 a 600 cm^{-1} , sendo as amostras aplicadas diretamente sobre o cristal de reflexão. Os espectros ATR - FTIR foram normalizados e as bandas de vibração associadas aos principais grupos químicos para caracterizar a presença de grupamentos químicos específicos nos materiais.

4 RESULTADOS

Os resultados estão agrupados em determinação dos coeficientes de partilha, estudos de permeação e retenção cutânea *in vitro* e caracterização dos sistemas.

4.1 DETERMINAÇÃO DOS COEFICIENTES DE PARTILHA PELE/VEÍCULO E EC/VEÍCULO

Os dados dos coeficientes de partilha pele/veículo e EC/veículo, determinados para a nicotina, conforme descrito nas seções 3.2.2 e 3.2.3, estão apresentados na **Tabela 2**.

Tabela 2 - Coeficientes de partilha da nicotina para a pele e estrato córneo a partir de água, propilenoglicol e hidrogel de quitosana a 1% (p/v) reticulado com glutaraldeído a 0,01% v/v. (n=3)

Meios de Partilha	C ₁ (µg/mL)	C ₂ (µg/mL)	K	Log K
Pele/água	5180,235 (±621)	4310,243 (± 697)	0,202	-0,695
Pele/prop	5133,510 (±103)	5029,678 (±175)	0,201	-1,685
Pele/gel	5357,320 (±908)	4648,375 (±805)	0,153	-0,817
EC/água	5180,235 (±621)	5085,754 (±21)	0,019	-1,731
EC/prop	5133,510 (±103)	4873,158 (±75)	0,053	-1,272
EC/gel	5357,320 (±908)	5357,320 (±105)	0	-

*Os valores representam a média e o desvio padrão referentes a três determinações.

C₁= Concentração do fármaco antes da partilha;

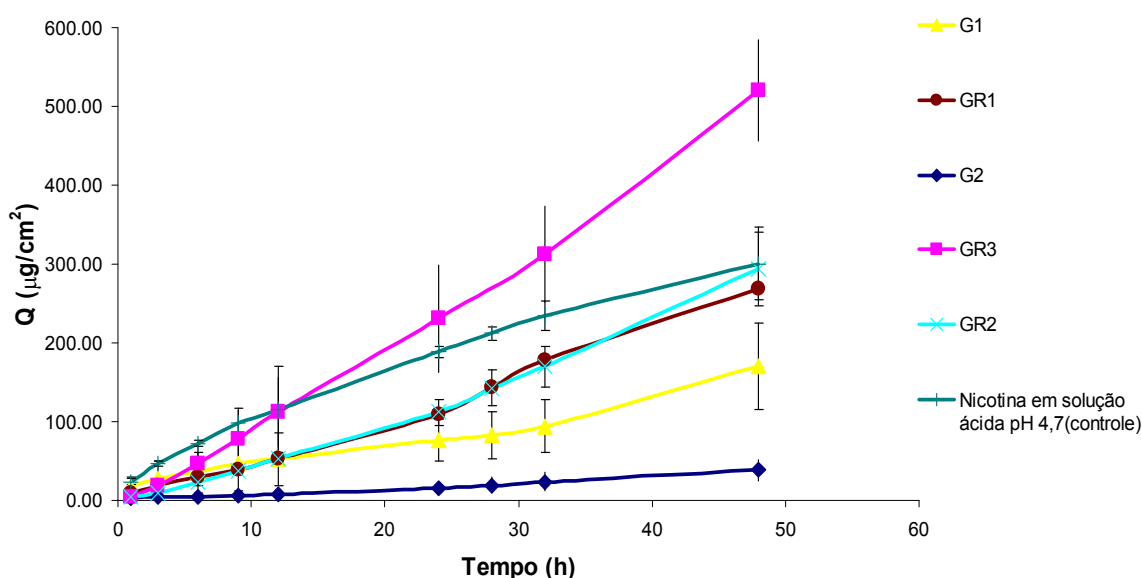
C₂= Concentração do fármaco após a partilha; K= Coeficiente de partilha

Fonte: Dados da autora.

4.2 ESTUDOS DE PERMEAÇÃO E RETENÇÃO CUTÂNEA *IN VITRO* DA NICOTINA A PARTIR DAS FORMULAÇÕES OBTIDAS

A **Figura 6** ilustra os perfis de permeação cutânea *in vitro* da nicotina a partir de solução aquosa pH = 4,7 (controle) e hidrogéis de quitosana reticulados ou não com glutaraldeído.

Figura 6 - Permeação cutânea *in vitro* da nicotina através da pele de orelha de porco a partir dos hidrogéis úmidos. n = 3.



- NOTA: (i) G1 - hidrogel de QUI a 1% p/v não reticulado;
(ii) GR1- hidrogel de QUI a 1% p/v reticulado com 0,01% de GLU;
(iii) G2- hidrogel de QUI a 2% p/v não reticulado;
(iv) GR3- hidrogel de QUI a 1% p/v reticulado com 0,005% de GLU, nicotina acrescentada no gel pronto;
(v) GR2- hidrogel de QUI a 1% p/v reticulado com 0,01% de GLU e pH final do gel 6,0;
(vi) Nicotina em solução ácida pH = 4,7 (controle).

Fonte: Dados da autora.

Os parâmetros cinéticos da permeação cutânea *in vitro* da nicotina a partir dos hidrogéis de quitosana reticulados ou não com glutaraldeído e do controle, estão apresentados na **Tabela 3**.

Tabela 3 – Parâmetros cinéticos da permeação cutânea *in vitro* da nicotina a partir dos hidrogéis de quitosana reticulados ou não com glutaraldeído e controle. (n=3)

Formulações	<i>r</i>			<i>J</i>
	Ordem zero	Higuchi	Primeira ordem	
G1	0,9784	0,9374	0,9573	2,86 µg/cm ² .h
G2	0,9895	0,9392	0,9840	0,75 µg/cm ² .h
GR1	0,9940	0,9541	0,9518	5,53 µg/cm ² .h
GR2	0,9923	0,9479	0,9177	6,00 µg/cm ² .h
GR3	0,9980	0,9656	0,8688	10,82 µg/cm ² .h
Controle	0,9915	0,9961	0,9011	47,42 µg/cm ² .h ^{1/2}

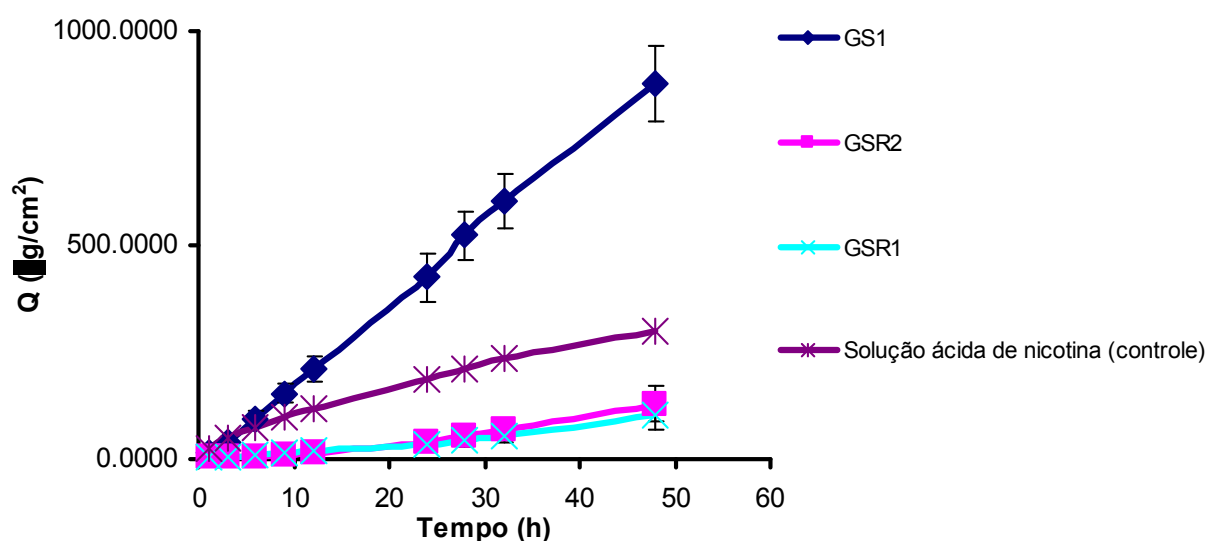
r = coeficiente de correlação linear;

J = fluxo obtido pela equação da reta da curva de permeação de acordo com o modelo cinético de maior ajuste

Fonte: Dados da autora.

A **Figura 7** ilustra os perfis de permeação cutânea *in vitro* da nicotina a partir dos hidrogéis de quitosana reticulados ou não com glutaraldeído e parcialmente secos.

Figura 7 - Permeação cutânea *in vitro* da nicotina através da pele de orelha de porco a partir dos hidrogéis parcialmente secos. n = 3.



NOTA: (i) GS1 - hidrogel de QUI não reticulado;
(ii) GSR1- hidrogel de QUI reticulado com GLU 0,005%;
(iii) GSR2 - hidrogel de QUI reticulado com GLU 0,01%;
(iv) solução ácida de nicotina (controle).

Fonte: Dados da autora.

Os parâmetros cinéticos da permeação cutânea *in vitro* da nicotina a partir dos hidrogéis de quitosana reticulados ou não com glutaraldeído e parcialmente secos, estão apresentados na **Tabela 4**.

Tabela 4 – Parâmetros cinéticos da permeação cutânea *in vitro* da nicotina a partir dos hidrogéis de quitosana reticulados ou não com glutaraldeído e parcialmente secos. (n=3)

Formulações	<i>r</i>			<i>J</i>
	Ordem zero	Higuchi	Primeira ordem	
GS1	0,9995	0,9774	0,8925	18,68 µg/cm².h
GSR1	0,9827	0,9290	0,9643	1,97µg/cm².h
GSR2	0,9751	0,9122	0,9689	2,57µg/cm².h

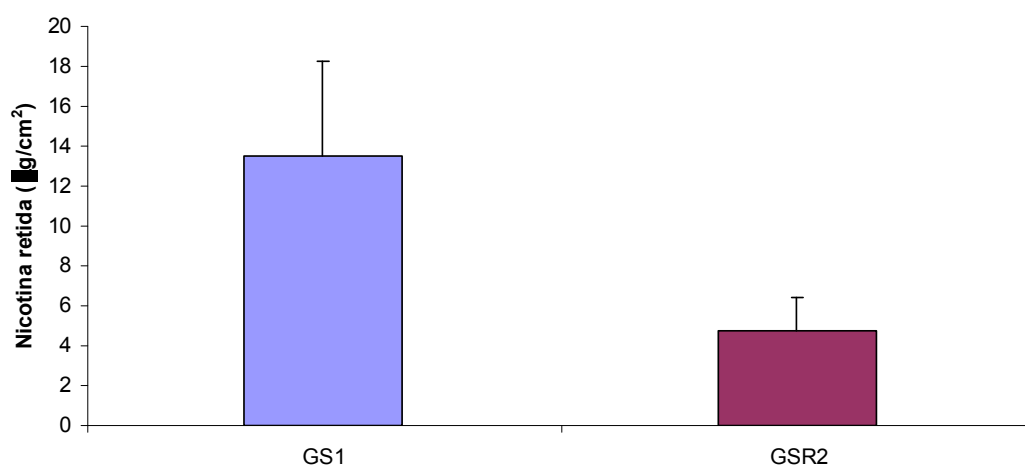
r = coeficiente de correlação linear;

J = fluxo obtido pela equação da reta da curva de permeação pelo modelo de Ordem Zero

Fonte: Dados da autora.

A **Figura 8** representa os valores de retenção cutânea da nicotina após os estudos de permeação cutânea *in vitro* empregando as seguintes formulações: hidrogel de quitosana não reticulado e parcialmente seco (GS1) e hidrogel de quitosana reticulado com glutaraldeído e parcialmente seco (GSR2)

Figura 8 - Retenção cutânea de nicotina em pele de orelha de porco referente ao tempo de 48h. (n=3)



NOTA: (i) GS1- hidrogel não reticulado e parcialmente seco;
(ii)GSR2- hidrogel reticulado e parcialmente seco.

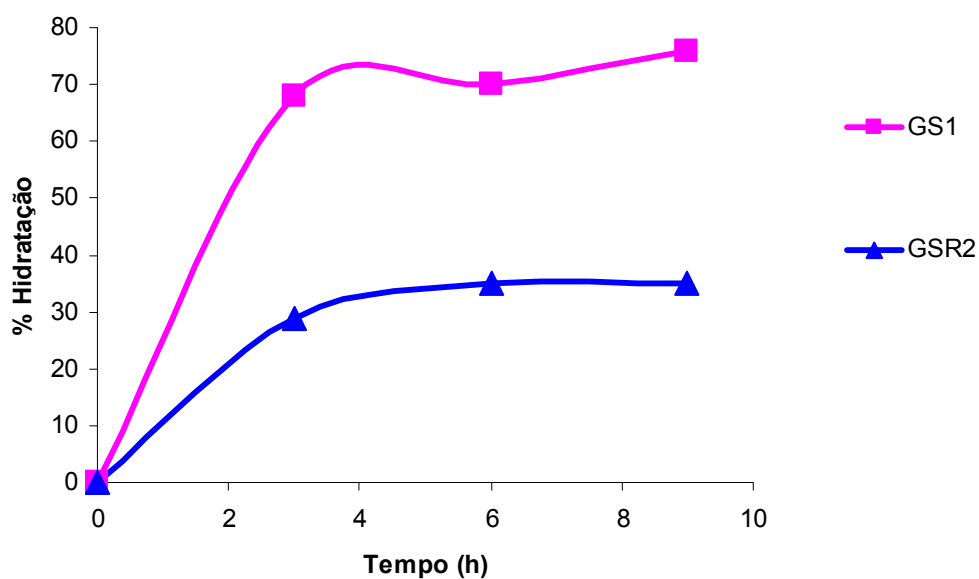
Fonte: Dados da autora.

4.3 CARACTERIZAÇÃO DOS SISTEMAS DESENVOLVIDOS

Com base nos resultados de permeação cutânea *in vitro*, os hidrogéis de quitosana parcialmente secos foram selecionados para os ensaios de caracterização: grau de intumescimento, análises térmicas (DSC, TG e DTG) e espectroscopia na região do infravermelho (ATR-FTIR).

A **Figura 9** demonstra o grau de intumescimento, representado como porcentagem de hidratação, dos hidrogéis de quitosana reticulados ou não com glutaraldeído, determinado de acordo com o descrito na seção 3.2.7.1.

Figura 9 - Porcentagem de hidratação dos hidrogéis de QUI em tampão fosfato pH 7,4 (n=3).



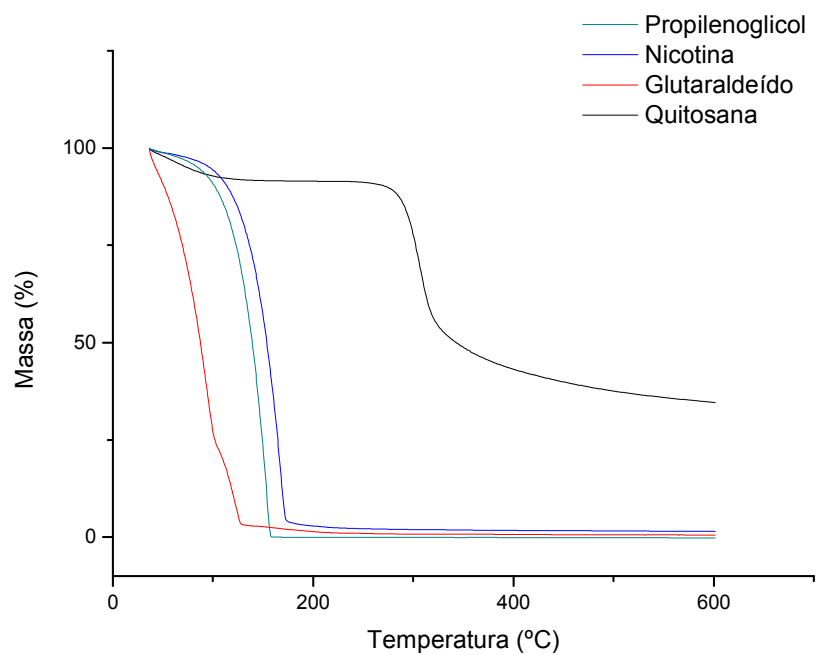
NOTA: (i) GS1 - hidrogel de QUI não reticulado;

(ii) GSR2- hidrogel de QUI reticulado com 0,01% de GLU.

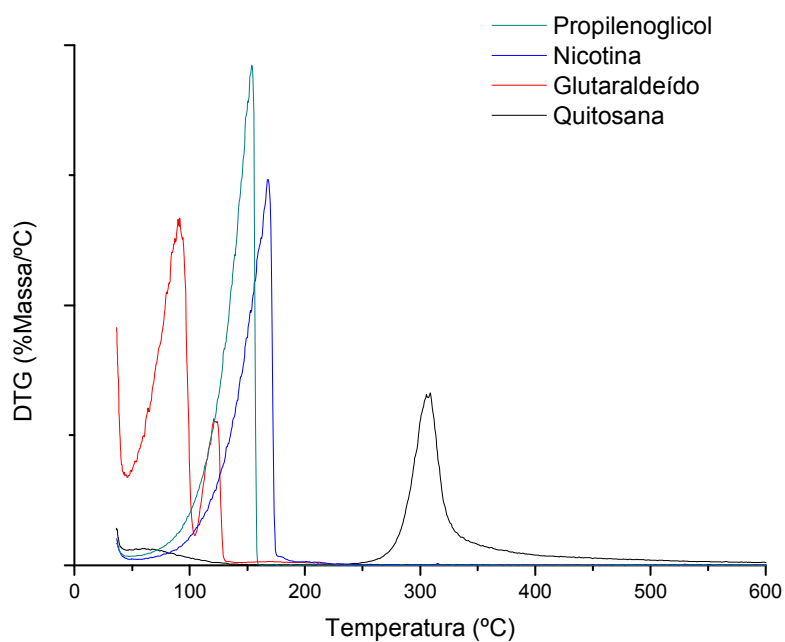
Fonte: Dados da autora.

A **Figura 10** apresenta as curvas de TG e DTG dos componentes utilizados nos hidrogéis de quitosana.

Figura 10 - Curvas TG (a) e DTG (b) dos componentes dos sistemas.



(a)



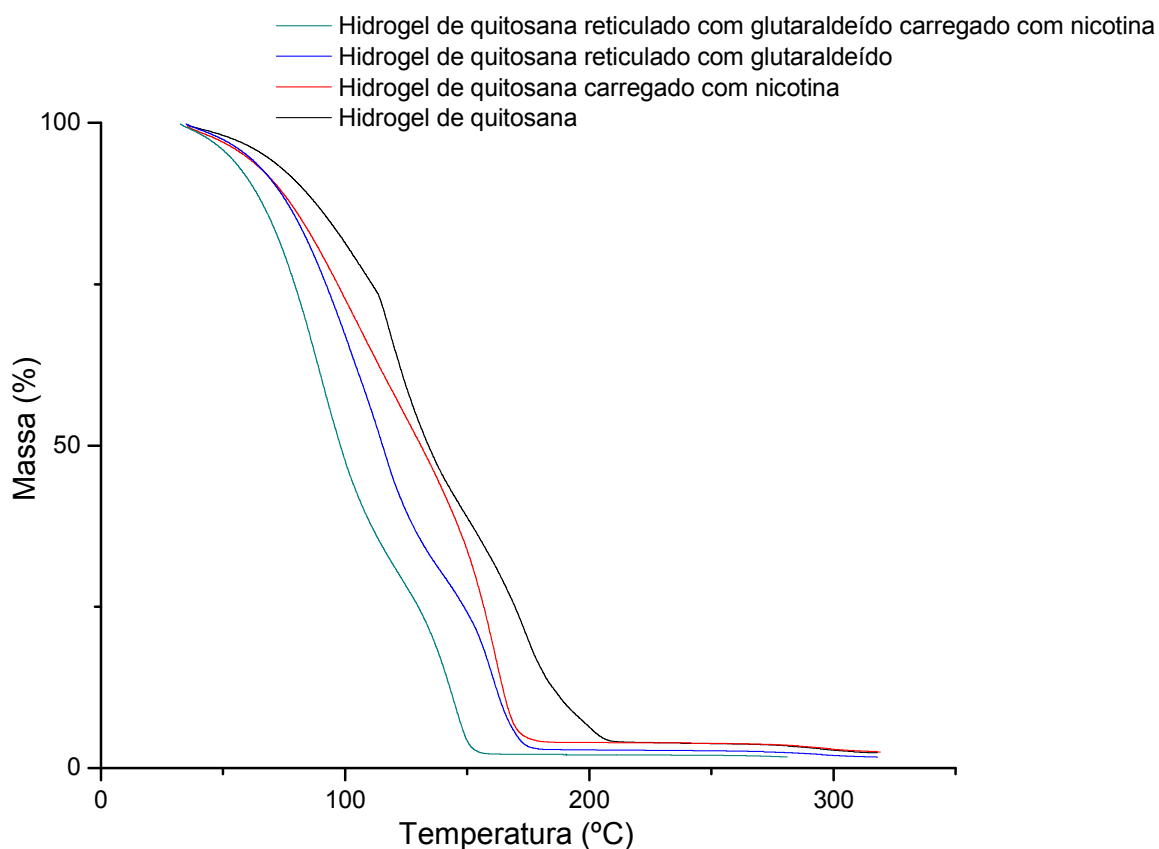
(b)

NOTA: (i) Quitosana,
(ii) Glutaraldeído,
(iii) Nicotina,
(iv) Propilenoglicol

Fonte: Dados da autora.

E nas **Figuras 11, 12 e 13** estão apresentadas as curvas de TG, DTG e DSC respectivamente, de hidrogéis de quitosana reticulados ou não com glutaraldeído e carregados ou não com nicotina.

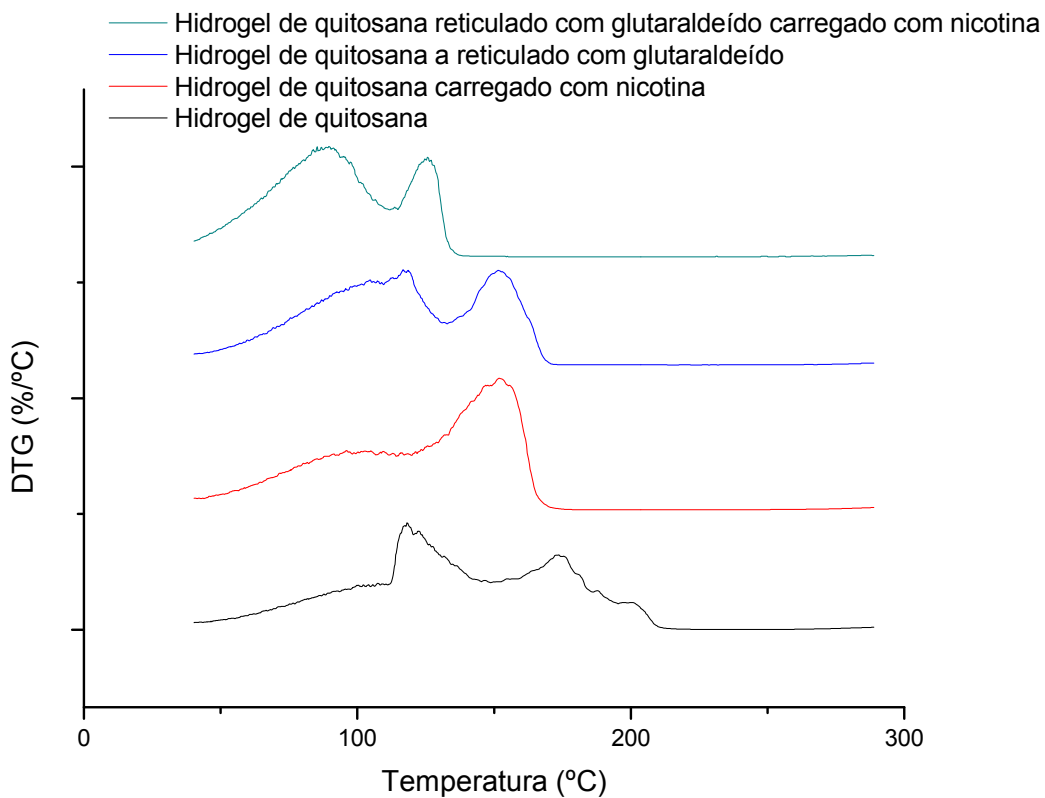
Figura 11 - Curvas de TG dos hidrogéis



NOTA: (i) hidrogel de quitosana a 1% p/v reticulado com GLU a 0,01% v/v carregado com nicotina;
(ii) hidrogel de QUI a 1% p/v reticulado com 0,01% v/v de GLU;
(iii) hidrogel de QUI a 1% p/v carregado com nicotina;
(iv) hidrogel de QUI a 1% p/v.

Fonte: Dados da autora.

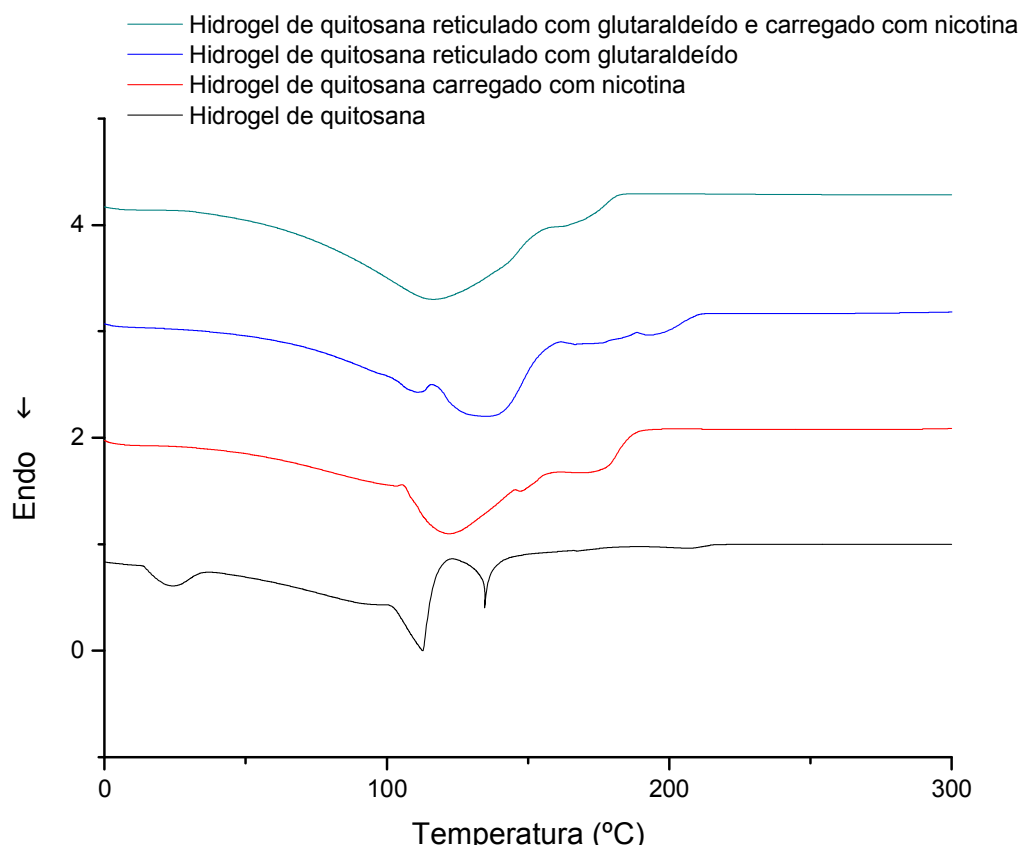
Figura 12 - Curvas de DTG dos hidrogéis



NOTA: (i) hidrogel de QUI a 1% p/v reticulado com GLU a 0,01% v/v carregado com nicotina;
(ii) hidrogel de QUI a 1% p/v reticulado com 0,01% v/v de GLU;
(iii) hidrogel de QUI a 1% p/v carregado com nicotina;
(iv) hidrogel de QUI a 1% p/v.

Fonte: Dados da autora.

Figura 13 - Curvas de DSC dos hidrogéis

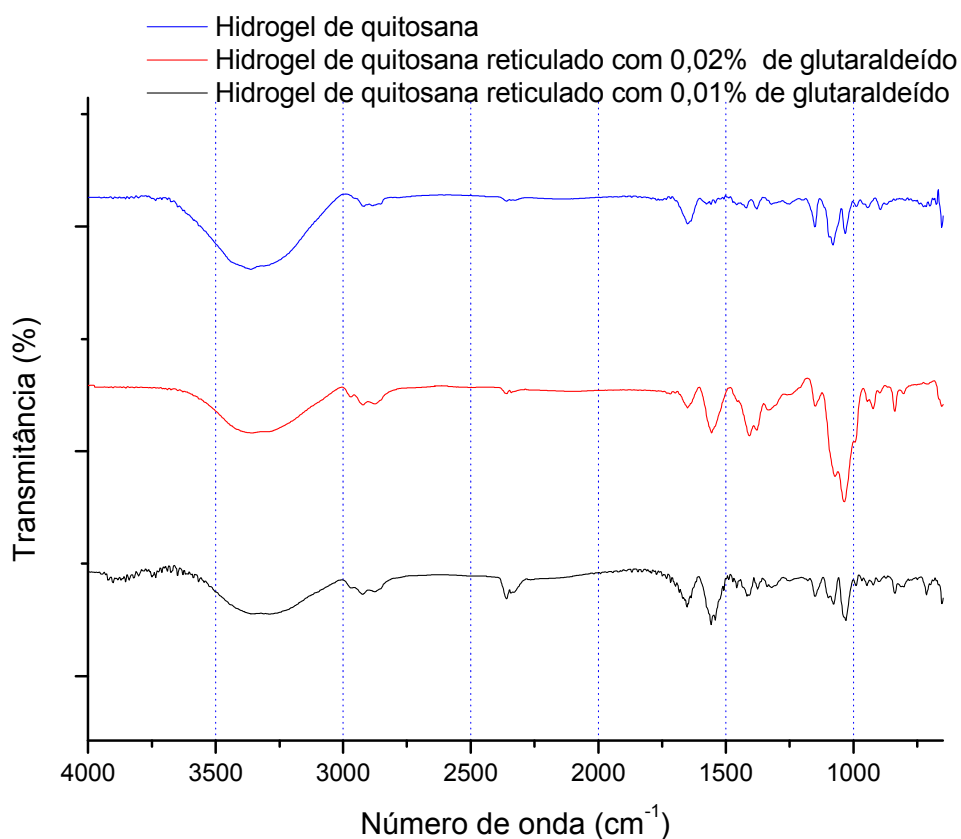


NOTA: (i) hidrogel de quitosana a 1% p/v reticulado com glutaraldeído a 0,01% v/v carregado com nicotina;
(ii) hidrogel de quitosana a 1% p/v reticulado com 0,01% v/v de glutaraldeído;
(iii) hidrogel de quitosana a 1% p/v carregado com nicotina;
(iv) hidrogel de quitosana a 1% p/v.

Fonte: Dados da autora.

Na **Figura 14**, estão dispostos espectros de ATR-FTIR de hidrogéis de quitosana reticulados com 0,01% v/v e 0,02% v/v de glutaraldeído e de hidrogéis não reticulados.

Figura 14 - Espectros de ATR-FTIR dos hidrogéis



NOTA: (i) hidrogel de quitosana a 1%;

(ii) hidrogel de quitosana a 1% p/v reticulado com glutaraldeído a 0,02% v/v;

(iii) hidrogel de quitosana a 1% p/v reticulado com glutaraldeído a 0,01% v/v.

Fonte: Dados da autora.

A **Tabela 5** apresenta as principais bandas de infravermelho e grupamentos químicos encontrados para o hidrogel de quitosana e para o hidrogel de quitosana reticulado com glutaraldeído.

Tabela 5 - Principais bandas de infravermelho e grupamentos químicos relacionados para hidrogel de quitosana reticulado com glutaraldeído e não reticulado.

Grupos Químicos	Bandas (cm⁻¹)	Formulações
Estiramento (v) N-H ₂	3450	QUI / QUI-GLU
Estiramento (v) C-H (assimétrico)	2920	QUI / QUI-GLU
Estiramento (v) C-H (simétrico)	2878	QUI / QUI-GLU
Estiramento (v) C-O (cíclico)	1030 e 900	QUI / QUI-GLU
Estiramento (v) C=N (Base de Schiff)	1560	QUI-GLU

QUI= hidrogel de quitosana não reticulado e QUI-GLU= hidrogel de quitosana reticulado com glutaraldeído a 0,01% ou 0,02%.

Fonte: Dados da autora.

5 DISCUSSÃO

Com o intuito de se obter uma formulação capaz de controlar a permeação da nicotina através da pele foram preparados hidrogéis de quitosana reticulado ou não com glutaraldeído, hidratados e parcialmente secos. A habilidade destes sistemas desenvolvidos no controle da liberação transdérmica da nicotina foi avaliada através de estudos de permeação cutânea *in vitro*.

Nos estudos de permeação cutânea *in vitro* da nicotina a partir de hidrogéis de quitosana hidratados reticulados ou não com glutaraldeído, observamos que os sistemas foram capazes de controlar a permeação cutânea da nicotina por um período de 48 horas. No entanto, não houve diferença significativa (Teste Scott-Knott, $p=0,0001$) na permeação cutânea da nicotina a partir do controle e a partir dos géis avaliados (G1, G2, GR1 e GR2), em que foram variados a concentração de quitosana, o grau de reticulação e o pH da formulação (**Figura 6 e Tabela 3**).

Analisando os dados da **Figura 6**, observamos que somente houve diferença significativa (Teste Scott-Knott, $p=0,0001$) quando variou o método de carregamento do fármaco no gel (GR3), observando-se o dobro de quantidade permeada quando o fármaco foi adicionado após a dispersão da quitosana. Nos géis G1, G2, GR1 e GR2, a nicotina foi adicionada no solvente, antes da dispersão da quitosana. Desta forma, a rede polimérica se forma ao redor das moléculas de nicotina, aprisionando-as de forma a controlar sua difusão e liberação para a pele. Esse tipo de carregamento é considerado eficaz e o indicado para moléculas pequenas, como a nicotina (BHATTARAI; GUNN; ZHANG, 2010). Porém, como o gel hidratado contém uma grande quantidade de água, a nicotina estabilizou-se nessa fase, sem se difundir no gel e atingir a pele. No gel GR3, em que a formação do gel de quitosana ocorreu antes do carregamento de nicotina, pode ter promovido uma maior difusão do fármaco através do gel.

Além da difusão no veículo, a hidro e lipossolubilidade de um fármaco determinam sua absorção através da pele por difusão passiva. E o coeficiente de partilha mede a quantidade de fármaco que se difunde de um veículo líquido, semi-sólido ou sólido para uma fase adjacente, com a finalidade de estabelecer o equilíbrio entre elas (BARRY, 2001). Com o intuito de relacionar a partilha da nicotina das formulações para a pele, com a permeação cutânea, foram realizados

os ensaios de determinação dos coeficientes de partilha pele/veículo e EC/veículo. Conforme observamos nos dados da **Tabela 2**, quando a nicotina está presente em veículos hidrofílicos, sua partilha, tanto para a pele íntegra, quanto para o EC, é muito pequena, o que pode explicar as pequenas quantidades permeadas de nicotina a partir destes veículos. Apesar de a nicotina ser um fármaco de caráter anfifílico, os resultados dos estudos de coeficiente de partilha demonstraram que ela possui uma maior afinidade pela água e veículos hidrofílicos, explicando sua dificuldade de se difundir pelo gel para atingir a pele. A primeira camada para qual o fármaco tem que se partilhar e difundir ao permear a pele é a região lipofílica do estrato córneo e a nicotina provavelmente se manteve estável dispersa na água livre presente entre as cadeias poliméricas da quitosana. Os hidrogéis hidratados possuem uma grande quantidade de água e a estabilidade da nicotina nessa região hidrofílica impediu que ela saísse da formulação para atingir a barreira lipofílica da pele.

Uma alternativa para promover a penetração cutânea de fármacos com características hidrofílicas é empregá-lo na sua máxima atividade termodinâmica quando ocorre uma tendência do fármaco a escapar da formulação e entrar na pele (AULTON, 2005). No entanto, uma das dificuldades encontradas no desenvolvimento de hidrogéis de quitosana contendo nicotina foi exatamente o processo de carregamento do fármaco no hidrogel. O gel de quitosana deve ser preparado, dispersando-se a quitosana em meio ácido e a nicotina é um fármaco de caráter alcalino. Devido a essas características, ao se adicionar uma alta concentração de nicotina na formulação, o pH do meio ficava próximo da neutralidade, impedindo a dispersão adequada da quitosana. Como alternativa para aumentar o carregamento de fármaco no sistema e eliminar parte da água presente, procedeu-se a secagem parcial do solvente, obtendo-se sistemas matriciais pelo método de modelagem sobre suporte e secagem parcial do solvente nos sistemas.

Os resultados de permeação cutânea *in vitro* da nicotina a partir dos géis parcialmente secos estão ilustrados na **Figura 7** e **Tabela 4**. Podemos observar que os sistemas foram capazes de controlar a permeação da nicotina por 48 horas. Entre os géis reticulados e não reticulado, observamos que o fluxo de nicotina foi 6 vezes maior a partir do gel não reticulado (Teste Scott-Knott, $p=0,0001$) e que não houve

diferença significativa entre os géis reticulados com as duas concentrações de glutaraldeído testadas.

A liberação de moléculas a partir de hidrogéis pode ocorrer de três modos diferentes, por difusão, estimulação química e física ou enzimática. A difusão é regulada pelo movimento das moléculas através da matriz do polímero ou por grandes quantidades de erosão no hidrogel (BHATTARAI; GUNN; ZHANG; 2010). A difusão do fármaco na matriz também sofre influência da presença e da densidade de reticulação no hidrogel. As cadeias poliméricas formam uma rede que contém muitos poros preenchidos com as moléculas do fármaco e água, que podem estar livres ou ligadas aos grupos hidrofílicos da rede. Para promover a liberação da nicotina a partir do hidrogel parcialmente seco, as moléculas de água livre são responsáveis pelo arraste e difusão do fármaco dentro da estrutura porosa das cadeias poliméricas até atingir a pele. No caso do gel não reticulado, o fluxo da nicotina foi maior do que a partir dos géis reticulados, uma vez que, na ausência de reticulação, a água penetra na rede polimérica livremente e promove a difusão da nicotina.

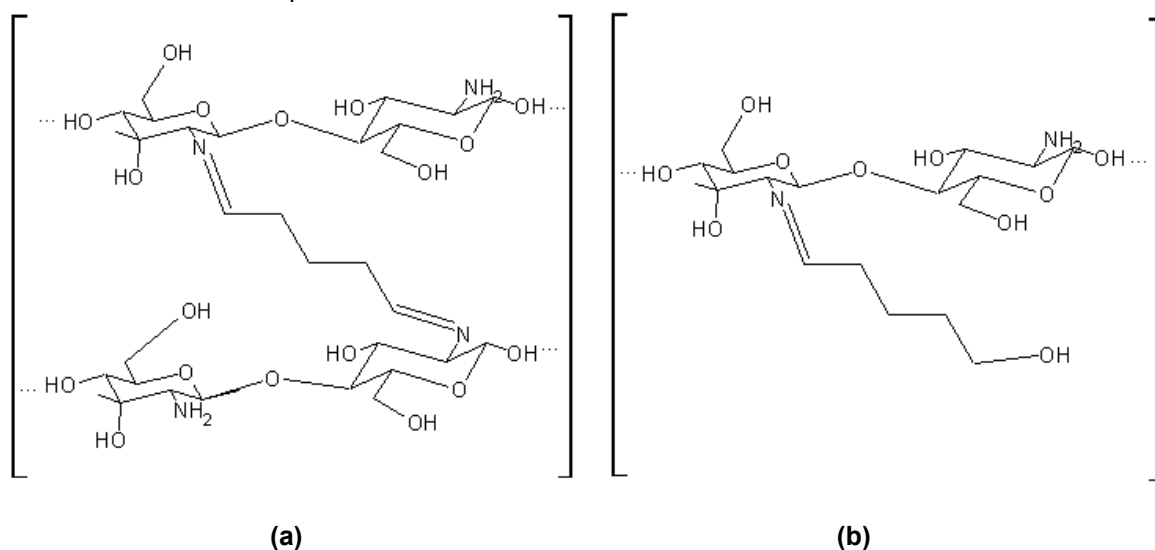
A quantidade de água ligada e livre no hidrogel é o que determina a absorção, partição e difusão de moléculas através da rede polimérica do gel. Ao absorver a água, as primeiras moléculas que entram na matriz irão hidratar os grupos hidrofílicos mais polares, inclusive a nicotina, e é chamada de água primária. Após a hidratação dos grupos polares, os grupos hidrofóbicos da rede polimérica ficarão expostos e também irão interagir com as moléculas de água formando a água secundária, ou água hidrofobicamente ligada. A água primária e água secundária são combinadas e chamadas simplesmente de água total (HOFFMAN, 2002).

Após a entrada da água total, a matriz polimérica irá absorver água adicional devido à direção da força osmótica da rede com tendência à diluição infinita. A água de intumescimento é chamada de “água livre” da rede e ocupa o espaço entre os canais da rede ou poros vazios. A difusão das moléculas de nicotina através do hidrogel e o mecanismo de adsorção/absorção são determinados pela quantidade de água no hidrogel (HOFFMAN, 2002).

No hidrogel reticulado, o glutaraldeído, agente reticulante da formulação, possui ao menos dois grupos reativos permitindo a formação de pontes entre as cadeias poliméricas da quitosana responsáveis pela formação porosa do gel. Os

grupamentos aldeídos formam ligações covalentes com a amina da quitosana em meio ácido (BERGER et al., 2004). As principais estruturas propostas para reticulação química da quitosana com o glutaraldeído estão demonstradas na **Figura 15**.

Figura 15 - Estruturas propostas para reticulação da quitosana com glutaraldeído (1,5-pentanodial): (a) Reticulação formada com uma molécula de glutaraldeído e duas unidades de quitosana, e (b) Reticulação formada com um grupo aldeído do glutaraldeído e uma unidade da quitosana.



Fonte: Adaptado de Monteiro e Airoidi (1999).

A reação pode ocorrer entre um grupo aldeído do glutaraldeído e uma unidade da quitosana, formando uma base de Schiff, permanecendo o aldeído remanescente livre para uma reação subsequente, ou entre uma molécula de glutaraldeído e duas unidades de quitosana, envolvendo os dois grupamentos aldeídos do glutaraldeído e formando duas bases de Schiff (MONTEIRO; AIROLDI, 1999). Essas reações são responsáveis pela formação da rede polimérica e aprisionamento da nicotina, o que pode ter sido responsável pelo fluxo menor de nicotina a partir dos géis reticulados.

Os hidrogéis reticulados foram capazes de reter a nicotina na rede polimérica de forma tão eficiente que a velocidade de permeação foi extremamente baixa. Esse fato pode ser explicado porque a absorção de água nesse tipo de gel é limitada pelas reticulações químicas, o que leva a uma força de retração elástica da rede, levando o hidrogel a tender ao equilíbrio no grau de intumescimento (HOFFMAN,

2002). Esse fato pôde ser confirmado nos testes de intumescimento, que demonstraram que o hidrogel reticulado absorveu uma quantidade muito menor de água (**Figura 9**).

Com relação à cinética de permeação, observando os dados da **Tabela 3** e da **Tabela 4**, verifica-se que a permeação cutânea *in vitro* da nicotina a partir de todos os hidrogéis avaliados ajustou-se melhor ao modelo cinético de ordem zero, em que se observa uma relação linear da quantidade de fármaco permeada em função do tempo. Em sistemas matriciais, normalmente observa-se uma liberação de acordo com o modelo de Higuchi, devido ao processo de erosão ou intumescimento da matriz, necessário para que ocorra a difusão do fármaco. Quando o fármaco é liberado da matriz polimérica seguindo uma cinética de ordem zero, esse fato ocorre porque o fármaco está saturado na fase líquida da matriz e a velocidade de difusão do fármaco dentro da matriz é maior do que a velocidade de difusão dentro da pele (WALTERS; BRAIN, 2002), fato observado para os géis desenvolvidos.

A retenção cutânea da nicotina foi determinada após a realização dos estudos de permeação cutânea com os géis parcialmente secos e avaliou-se a concentração de nicotina que permaneceu na pele após o estudo de permeação. Os dados da **Figura 8** demonstram que houve uma maior retenção cutânea a partir da aplicação dos géis não reticulados, que é coerente com as discussões anteriores. A água penetra mais facilmente na matriz do polímero na ausência do glutaraldeído e promove a maior difusão da nicotina para a pele. Quando há glutaraldeído na formulação, a penetração da água na matriz é mais lenta, o que promove uma menor difusão da nicotina para a pele.

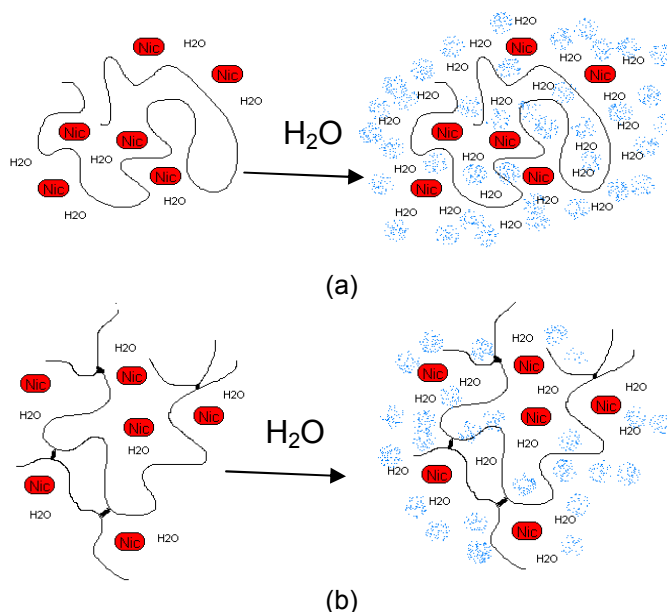
Os hidrogéis de quitosana não reticulados parcialmente secos, por terem apresentados melhores resultados em relação à liberação transdérmica da nicotina, foram caracterizados física e quimicamente.

O grau de intumescimento de uma matriz polimérica é uma medida importante que está relacionada com a resistência mecânica do gel e também com o controle da liberação dos fármacos (BERGER et al., 2004).

Como observado na **Figura 9**, após 6 horas de contato com meio aquoso, o gel reticulado absorveu cerca de 30% do seu peso em água e tendeu ao equilíbrio, enquanto o gel não reticulado absorveu mais de 70% do meio e tendeu à dissolução. Isto ocorre porque nos géis hidrofílicos a rede polimérica irá absorver água quase

que de forma infinita devido à força osmótica. Esse intumescimento é oposto ao que ocorre no hidrogel reticulado covalentemente devido à retração da força elástica entre as cadeias reticuladas (HOFFMAN, 2002). O hidrogel de quitosana consiste de um emaranhado de cadeias formando uma rede, quando o glutaraldeído é adicionado ocorre a reticulação química a partir das ligações covalentes entre as cadeias da quitosana o que resulta em menor espaço entre cadeias para a entrada da água (BERGER et al., 2004). A presença do glutaraldeído promove uma maior rigidez das cadeias poliméricas, reduzindo a flexibilidade e o número de grupamentos hidrofílicos do hidrogel, o que é desfavorável ao intumescimento. A quitosana é um polímero hidrofílico devido à presença dos grupos amina e hidroxila em sua cadeia, e na presença do glutaraldeído esses grupos ficam menos disponíveis para a realização de ligações de hidrogênio e conseqüente absorção de água pela cadeia (BERGER et al., 2004). Sistemas não reticulados ou com pouco grau de reticulação formam hidrogéis mais absorventes, contendo uma grande quantidade de água livre (**Figura 16**). Com a reticulação, o teor de água e a capacidade de intumescimento do hidrogel diminuem resultando em uma redução na velocidade de liberação do fármaco (BHATARAI; GUNN; ZHANG, 2010).

Figura 16 - Representação esquemática de um hidrogel de quitosana carregado com nicotina (Nic) interagindo com moléculas de água (H_2O): (a) não reticulado e (b) reticulado com glutaraldeído.



Fonte: Adaptado de Berger et al. (2004)

As análises térmicas abrangem um grupo de técnicas a partir das quais propriedades físicas e/ou químicas de uma substância e seus produtos de reação são medidas em função da temperatura enquanto essa substância é submetida a uma programação controlada de temperatura e sob atmosfera controlada. Essas técnicas envolvem mudança de massa e energia à medida que a amostra é submetida a uma alteração da temperatura e são amplamente utilizadas em controle de qualidade e em pesquisas sobre polímeros e preparações farmacêuticas (MATOS; MERCURI; BARROS, 2009).

A Termogravimetria (TG) trabalha com a variação da massa da amostra (perda ou ganho) em função da temperatura e/ou tempo, enquanto a amostra é submetida à programação controlada de temperatura. Já a Termogravimetria derivada (DTG) é a primeira derivada da curva de TG. Na DTG os “degraus” correspondentes às variações de massa da curva de TG são substituídos por picos que delimitam áreas proporcionais às variações de massa (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009).

A Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) é a técnica pela qual se mede a diferença de energia fornecida à substância enquanto esta é submetida a uma programação controlada de temperatura. A DSC permite avaliar as variações de entalpia que ocorrem com uma dada amostra durante o período de aquecimento ou resfriamento (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009).

Na maioria das vezes, o uso de uma única técnica de análise térmica pode não fornecer informações suficientes sobre uma amostra. O que pode ser alcançado associando-se os resultados obtidos entre duas ou mais técnicas termoanalíticas (MATOS; MERCURI; BARROS, 2009).

Neste trabalho, o objetivo das análises térmicas foi principalmente caracterizar a água dos sistemas, além de fornecer informações sobre a estabilidade térmica dos mesmos. Para tanto, análises de DSC e TG/DTG foram conduzidas.

A **Figura 10** traz as curvas de TG e DTG dos componentes empregados nos géis, onde podemos observar as temperaturas de cada componente durante o processo de decomposição térmica.

Avaliando-se as curvas de DSC apresentadas na **Figura 13**, percebe-se que para o hidrogel de quitosana sem adição de glutaraldeído ou nicotina o pico endotérmico é bem definido próximo a 100°C, o que indica uma maior pureza do

componente que está sofrendo processo de volatilização, provavelmente a água ligada à cadeia polimérica. O pico em torno de 150°C provavelmente representa a decomposição completa do propilenoglicol, comparando-se com o verificado pelas curvas TG e DTG representadas na **Figura 10**. Nas amostras em que há presença do glutaraldeído e da nicotina verifica-se um alargamento dos picos endotérmicos. Em torno de 130°C e 180°C para o gel carregado com nicotina, 140°C para o gel reticulado com glutaraldeído e um alargamento maior no gel reticulado e carregado com glutaraldeído, o que pode ser explicado pela interação entre esses componentes e entre o propilenoglicol presente em todas as formulações analisadas.

Nas curvas de TG e DTG (**Figuras 11 e 12**), verifica-se que as decomposições térmicas dos hidrogéis ocorrem em duas etapas, melhor visualizadas nas curvas de DTG. O hidrogel de quitosana não reticulado apresentou maior estabilidade térmica, apresentando decomposição em temperaturas mais altas. Já o hidrogel contendo glutaraldeído e carregado com nicotina apresentou uma menor estabilidade térmica, com a volatilização e decomposição de seus componentes a uma temperatura menor, pois a presença de reticulação na cadeia polimérica e a presença da nicotina desestabilizaram o sistema.

O aumento da temperatura promove a volatilização da água e conseqüentemente, uma aproximação das cadeias poliméricas. Após a saída da água do sistema, a repulsão entre as cargas positivas da quitosana e a carga positiva da nicotina irá promover a expulsão da nicotina da cadeia, deixando-a livre para volatilização. Esta observação é coerente com o que foi verificado durante os estudos de permeação em que os hidrogéis parcialmente secos promoveram maior liberação da nicotina.

O hidrogel reticulado com glutaraldeído, porém sem nicotina, apresenta uma curva termogravimétrica próxima a do gel carregado com nicotina, com a finalização das perdas de massa em temperaturas em torno de 180°C, o que pode ser explicado pelas curvas individuais desses componentes (**Figura 10**). A nicotina apresentou volatilização próxima a 180° C e o glutaraldeído próximo a 130°C em suas curvas termogravimétricas, isso explica a influência na volatilização e decomposição das massas quando apenas um desses componentes é alterado na formulação.

A espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier é aplicada como um dos métodos analíticos mais importantes na determinação de grupos orgânicos de materiais no estado líquido e sólido. A espectroscopia de reflexão total atenuada ou ATR é uma técnica de grande utilidade para se obter espectros no infravermelho de materiais densos, como filmes e hidrogéis, sendo uma das mais usadas. Nos ensaios de ATR-FTIR a amostra é colocada em contato direto com o cristal de ATR, que possui alto índice de refração e em seguida é obtido o espectro de absorção (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009). Neste trabalho a ATR-FTIR foi empregada na caracterização dos hidrogéis de quitosana com o intuito de confirmar a reação de reticulação.

A reticulação da quitosana com glutaraldeído ocorre pela reação do grupo amino ($-NH_2$) com o carbono aldeído do glutaraldeído, com a perda de uma molécula de água e formando a ligação $C=N$. Avaliando-se os dados da **Figura 14 e Tabela 5** sugere-se que após a reticulação química da quitosana com glutaraldeído, ocorre a formação da base de Schiff ($C=N$) com a identificação da banda referente em $\sim 1600\text{cm}^{-1}$ (COSTA Jr.; MANSUR, 2008). A ausência da banda característica de aldeído ($\sim 1720\text{cm}^{-1}$) sugere que não há aldeídos livres nas formulações, o que indica que todo o glutaraldeído presente nas formulações reticuladas foi consumido na reticulação (COSTA JR.; MANSUR, 2008).

Os hidrogéis de quitosana apresentam grande potencial como sistemas para liberação transdérmica de fármacos devido principalmente às suas características de atoxicidade, efeito promotor de absorção cutânea e propriedade de controle da liberação de fármacos. Foram obtidas formulações transdérmicas de nicotina empregando quitosana como sistema matricial e os sistemas desenvolvidos foram capazes de controlar a liberação transdérmica da nicotina por um período de 48 horas, sendo o dobro do tempo dos dispositivos presentes no mercado.

A permeação cutânea *in vitro* da nicotina a partir dos hidrogéis parcialmente secos apresentou um perfil cinético de ordem zero, sendo que o hidrogel não reticulado apresentou um controle na liberação da nicotina mais eficiente. Foi possível inferir que a água presente nas formulações promovia o controle da liberação através da difusão da nicotina para a pele.

O emprego de quitosana em sistemas de liberação transdérmica mostrou se promissor para controlar a liberação de nicotina. Como alternativa para contornar a

dificuldade de carregamento de nicotina no hidrogel de quitosana sugere-se a modificação química da cadeia da quitosana de forma a torná-la solúvel em pH mais alcalino e manter a nicotina na sua forma base. Como etapas futuras sugerem-se ainda estudos de permeação cutânea *in vivo* utilizando animais de pequeno porte.

6 CONCLUSÃO

Todos os hidrogéis de quitosana desenvolvidos e avaliados (reticulados ou não reticulados, hidratados ou parcialmente secos) foram capazes de controlar a liberação transdérmica da nicotina por um período de 48 horas, seguindo uma cinética de ordem zero;

O fluxo transdérmico de nicotina a partir dos géis hidratados foi insatisfatório (muito baixo), o que foi atribuído a uma pequena partilha do fármaco para a pele a partir de veículos com alto conteúdo de água;

O fluxo transdérmico da nicotina foi maior a partir dos géis parcialmente secos não reticulados, comparados aos reticulados com glutaraldeído a 0,005% v/v e 0,01% v/v, portanto a reticulação com glutaraldeído diminuiu o fluxo da nicotina;

Os estudos de intumescimento e análises térmicas dos géis parcialmente secos demonstraram que a reticulação diminuiu o grau de intumescimento e a difusão da água no sistema, sendo responsável pelo menor fluxo da nicotina para a pele;

A caracterização dos géis através de ATR-FTIR foi capaz de demonstrar a reticulação do gel de quitosana com o glutaraldeído;

Os hidrogéis parcialmente secos de quitosana não reticulados mostraram-se promissores no controle da permeação cutânea *in vitro* da nicotina, apresentando grande potencial como sistemas para liberação transdérmica de nicotina.

REFERÊNCIAS

ALDANA, A. A. et al., Preparation and characterization of chitosan/genipin/poly(N-vinyl-2-pyrrolidone) films for controlled release drugs. **Materials Chemistry and Physics**. v. 134, n. 1, p. 317-324, 2012.

AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2. ed., Porto Alegre: Artmed, 2005.

BACKER, R. W.; KOCHINKE, F.; HUANG, C. Prolonged activity nicotine patch. **US Patent nº 4943435**, 24 jul., 1990.

BARRY, B. Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 14, n. 2, p. 101-114, 2001.

BENOWITZ, N. L. Neurobiology of Nicotine Addiction: Implications for Smoking Cessation Treatment. **The American Journal of Medicine**, v. 121, p. S3-S10, 2008.

BENOWITZ, N. L.; HUKKANEN, J.; JACOB III, P. Nicotine Chemistry, Metabolism, Kinetics and Biomarkers. **Handbook of Experimental Pharmacology**, v. 192, p. 29–60, 2009.

BENTLEY, M. V. L. B. et al. The influence of lecithin and urea on the in vitro permeation of hydrocortisone acetate through skin from hairless mouse. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 146, p. 255-262, 1997.

BERGER, J. et al. Structure and interactions in covalently an ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 57, p. 19-34, 2004.

BERNKOP-SCHRÜCH, A.; DÜNNHAUPT, S. Chitosan-based drug delivery systems. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v. 81, n. 3, p. 463–469, 2012.

BHATTARAI, N.; GUNN, J.; ZHANG, M. Chitosan-Based Hydrogels for Controlled, Localized Drug Delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 62, p. 83-99, 2010.

CAMPOS, M. G. N. et al. In vitro Gentamicin sustained and controlled release from Chitosan Cross-linked Films. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 20, n. 2, p. 537-542, 2009.

CAN, A.S. et al. Optimization and Characterization of Chitosan Films for Transdermal Delivery of Ondansetron. **Molecules**, v. 18, p. 5455-5471, 2013.

CANELLA, K. M. N. C.; GARCIA, R. B. Caracterização de quitosana por cromatografia de permeação em gel – influência do método de preparação do solvente. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 13-17, 2001.

CAO, Y. et al. Poly(*N*-isopropylacrylamide)-chitosan as thermosensitive *in situ* gel-forming system for ocular drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 120, p. 186-194. 2007.

CEVC, G; VIERL, U. Nanotechnology and the transdermal route: A state of the art review and critical appraisal. **Journal of Controlled Release**, v. 141, n. 3, p. 277-299, 2010.

CHOI, W. I. et al. Efficient skin permeation of soluble proteins via flexible and funcional nano-carrier. **Journal of Controlled Release**, v. 157, p. 272-278. 2012.

CHOONARA, Y. E. et al. Mechanistic evaluation of alginate-HEC gelisphere compacts for controlled intrastriatal nicotine release in Parkinson's disease. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 98, n. 6, p. 2059-2072, 2009.

COSTA JR, E. S.; MANSUR; H. S. Preparação e caracterização de blendas de Quitosana/Poli(Álcool Vinílico) reticuladas quimicamente com glutaraldeído para aplicação em engenharia de tecido. **Química Nova**, v. 31, n. 6, p.1460-1466, 2008.

DAVARAN, S. et al. Development of a novel prolonged-release nicotine transdermal patch. **Pharmacological Research**, v. 51, n. 3, p. 233–237, 2005.

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

FARAHMAND, S.; MAIBACH, H. I. Transdermal drug pharmacokinetics in man: Interindividual variability and partial prediction. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 367, p. 1–15, 2009.

FERREIRA, D. F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Symposium** (Lavras), v. 6, p. 36-41, 2008.

GIRI, T. K. et al., Modified chitosan hydrogels as drug delivery and tissue engineering systems: present status and applications. **Acta Pharmaceutica Sinica B**. v. 2, n. 5, p. 439-449, 2012.

GORE, A. V.; CHIEN, Y. W. The nicotine transdermal system. **Clinics in Dermatology**, v. 16, n. 5, p. 599-615, 1998.

GRATIERI, T. et al Enhancing and sustaining the topical ocular delivery of fluconazole using chitosan solution and poloxamer/chitosan *in situ* forming gel. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 79, p. 320-327, 2011.

HOFFMAN, A. S. Hydrogels for biomedical applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 43, p. 3-12, 2002.

HOLLER, F. J; SKOOG, D. A.; CROUCH, S. **Princípios de análise instrumental** 6.ed. Porto Alegre: Bookman, 2009.

KALIA, Y.N.; GUY, R.H. Modeling transdermal drug release. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 48, p. 159-172, 2001.

KANDAVILLI, S.; NAIR, V.; PANCHAGNULA, R. Polymers in transdermal drug delivery systems. **Pharmaceutical Technology**, p. 62-80, may.2002.

KIM, J. H. et al. Simple fabrication of silver hybridized porous chitosan-based patch for transdermal drug-delivery system. **Materials Letters**, v. 95, p. 48-51, 2013.

KIM, J. H.; LIM, J. I.; PARK, H. K. Porous Chitosan-based Adhesive Patch Filled with poly(l-3,4-dihydroxyphenylalanine) as a Transdermal Drug Delivery System. **Journal of Porous Materials**, v. 20, n. 1, p. 177-182, 2013.

LAI-CHEONG, J.E.; MCGRATH. J.A. Structure and Function of Skin, Hair and Nails. **Medicine**, v. 37, n. 5, p. 223-226, 2009.

LYRA, M.A.M. et al. Sistemas Matriciais Hidrofílicos e Mucoadesivos para Liberação Controlada de Fármacos. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, n. 5, p. 784-793, 2007.

MAGHRABY, G. M. E.; BARRY, B. W.; WILLIAMS, A. C. Liposomes and skin: From drug delivery to model membranes. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 34, n. 4-5, p. 203-222, 2008.

MARCHETTI, J. M.; SARAIVA, J. Sistemas de liberação: Estratégias para medicamentos eficazes In: STORPIRTIS, S. et al. **Ciências Farmacêuticas: Biofarmacotécnica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. cap. 6, p. 72-95.

MATOS, J. R.; MERCURI, L.; BARROS, G. Análise térmica aplicada a fármacos e medicamentos In: STORPIRTIS, S. et al. **Ciências Farmacêuticas: Biofarmacotécnica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. cap. 4, p. 32-65.

MONTEIRO Jr, O. A. C.; AIROLDI, C. Some studies of crosslinking chitosan–glutaraldehyde interaction in a homogeneous system. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 26, p. 119–128, 1999.

MOSER, K. et al. Passive skin penetration enhancement and its quantification in vitro. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 52, p. 103-112, 2001.

PETERSON, T. A. Transdermal drug formulation and process development. **Pharmaceutical Technology**, v. 27, n. 6, p. 18-21, jan.2003.

PICHAYAKORN, W. et al. Nicotine transdermal patches using polymeric natural rubber as the matrix controlling system: Effect of polymer and plasticizer blends. **Journal of Membrane Science**, v. 411-412, p. 81-90, 2012.

_____ Deproteinised natural rubber used as a controlling layer membrane in reservoir-type nicotine transdermal patches. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 91, p. 520-529, 2013.

PONGJANYAKUL, T; SUKSRI, H. Alginate-magnesium aluminum silicate films for buccal delivery of nicotine. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v. 74, p. 103–113, 2009.

_____. Nicotine-loaded sodium alginate–magnesium aluminum silicate (SA–MAS) films: Importance of SA–MAS ratio. **Carbohydrate Polymers**, v. 80, n. 4, p. 1018-1027, 2010.

PRAUSNITZ, M. R.; MITRAGOTRI, S.; LANGER, R. Current Status and Future Potential of Transdermal Drug Delivery. **Nature Reviews**, v. 3, p. 115-124, feb.2004.

PRAUSNITZ, M. R.; LANGER, R. Transdermal drug delivery. **Nature Biotechnology**, v. 26, n. 11, p. 1261-1268, 2008.

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

RODRIGUES, L. B. et al. *In vitro* release and characterization of chitosan films as dexamethasone carrier. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 368, p. 1-6, 2009.

RUELA, A. L. M.; et al. *In vitro* evaluation of transdermal nicotine delivery systems commercially available in Brazil. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 49, n. 3, p. 579-588, 2013.

RUELA, A. L. M., FIGUEIREDO, E. C., PEREIRA, G. R. Molecularly imprinted polymers as nicotine transdermal delivery systems. **Chemical Engineering Journal**, v. 248, p. 1–8, 2014.

SCHEUPLEIN, H. J. Percutaneous Absorption of Steroids. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 52, n. 1, p. 63-70, 1969.

SELZER, D. et al. Finite and infinite dosing: Difficulties in measurements, evaluations and predictions. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, p. 278–294, 2013.

SENYIGIT, T. et al. Lecithin/Chitosan nanoparticles of clobetasol-17-propionate capable of accumulation in pig skin. **Journal of Controlled Release**, v. 142, p. 368-373, 2010.

SILVA, J. A. et al. Administração cutânea de fármacos: desafios e estratégias para o desenvolvimento de formulações transdérmicas. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 31, n. 3, p. 123-131. 2010.

SHAH, V. P. et al. *In vitro* release: Collaborative study using the vertical diffusion cell. **Pharmacoepial Forum**, v. 32, n.5, p. 1590-1596, 2006.

SHUKLA, S. K. et al. Chitosan-based nanomaterials: A state-of-the-art review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 59, p. 46– 58, 2013.

SOHN, M. et al. Tobacco and Dependence. **Seminars in Oncology Nursing**, v. 19, n. 4, p. 250-260, 2003.

USP DI: Informacion de medicamentos. Ministério de Sanidad y Consumo de España. Ediciones informatizadas, S.A. V.2 –1989

THACHARODI, D.; RAO, P. Collagen-Chitosan composite membranes controlled transdermal delivery of nifedipine and propranolol hydrochloride. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 134, p. 239-241, 1996a.

_____. Rate-controlling biopolymer membranes as transdermal delivery systems for nifedipine: development and in vitro evaluations. **Biomaterials**. v. 17, n. 13, p. 1307-1311, 1996b.

THEIN-HAN, W. W.; STEVENS, W. F. Transdermal delivery controlled by a chitosan membrane. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 30, n. 4, p. 397-404, 2004.

TIRNAKSIZ, F.; YUCE, Z. Development of transdermal system containing nicotine by using sustained release dosage design. **Il Farmaco**, v. 60, n. 9, p. 763–770, 2005.

TSAI, C. J. et al. Chitosan Hydrogel as a Base for Transdermal Delivery of Berberine and Its Evaluation in Rat Skin. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v. 22, n. 4, p. 397-401. 1999.

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

WALTERS, K. A.; BRAIN, K. R. Dermatological Formulation and Transdermal Systems In: WALTERS, K. A. **Dermatological and Transdermal Formulations**. Nova York: Marcel Dekker, 2002, cap. 7, p. 319-399.

ZEVIN, S.; GOURLAY, S. G.; BENOWITZ, N. L. Clinical pharmacology of nicotine. **Clinics in Dermatology**, v. 16, n. 5, p. 557–564, 1998.