

Influência do sistema de libertação na permeação de uma molécula hidrofílica

The influence of the delivery systems over the permeation of an hydrophilic active

Catarina Pinto Reis¹, Patricia Carvalho², Maguie Canguero¹, Cátia Fernandes¹, Catarina Rosado²

¹ Laboratory of Nanoscience and Biomedical Nanotechnology, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Campo Grande 376, 1749-024 Lisboa – Portugal

² Experimental Dermatology Unit, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Campo Grande 376, 1749-024 Lisboa – Portugal

E-mail: catarina.rosado@ulusofona.pt

Resumo

Diferentes estratégias têm sido usadas para aumentar a eficácia e a segurança não só de medicamentos tópicos e transdérmicos, mas também de produtos cosméticos. Avanços na tecnologia de encapsulação levaram ao desenvolvimento de polímeros biodegradáveis multifuncionais invocando capacidades promotoras de permeação, permitindo uma libertação controlada de fármacos ou com propriedades protectoras. O objectivo deste estudo foi aplicar um polímero de origem natural – o alginato- na encapsulação de uma molécula hidrofílica modelo- a cafeína.

Este permeante modelo foi encapsulado em três sistemas diferentes de alginato - macrosferas secas, hidratadas e micropartículas de cálcio-alginato. Adicionalmente, a cafeína também foi incorporada em três formulações passivas - uma solução aquosa, um gel de Carbopol© e um creme O/A. Foram feitos estudos de difusão in vitro com células de Franz, utilizando membranas de polidimetilsiloxano como modelo da epiderme humana. Quantidades equivalentes das diferentes formulações de cafeína foram colocadas no compartimento dador das células de Franz. Foram recolhidas amostras do compartimento receptor a cada 2 horas, durante 8 horas. Os vários fluxos em estado estacionário foram calculados.

Os fluxos mais elevados foram obtidos a partir do creme O/A e as macrosferas secas de alginato. A libertação mais lenta de cafeína foi observada quando esta foi encapsulada em macrosferas hidratadas e nas microsferas. Estes diferentes perfis de permeação podem ser explicados pela natureza porosa destes últimos e por um mecanismo de troca iónica.

Estes resultados são indicativos de que esta tecnologia pode ser usada com sucesso na modulação da biodisponibilidade de moléculas para administração transcutânea. Os polímeros de alginato parecem particularmente adequados à utilização na libertação controlada de fármacos com elevada potência farmacológica e estreitas janelas terapêuticas. Por outro lado, a sua aplicabilidade também poderá ser estendida a ingredientes cosméticos que, por razões de segurança, devem estar limitados às camadas mais superficiais da pele.

Palavras chave: Terapia transdérmica, estudos de permeação in vitro, alginato, macrosferas, micropartículas

Abstract

Over the years different strategies have been employed to increase the efficacy and safety of not only topical and transdermal medicines, but also of cosmetics. The encapsulation technology has enabled the development of multifunctional biodegradable polymers claiming permeation enhancement features, controlled release or protective properties. The objective of this study was to test the performance of a natural polymer- alginate- in the encapsulation of a model hydrophilic permeant- caffeine.

The model permeant was encapsulated into three different alginate systems - dry beads, hydrated beads and calcium-alginate microparticles. Additionally, free caffeine was included in three passive formulations - an aqueous solution, a Carbopol© gel and an O/W cream. In vitro diffusion studies with Franz cells were conducted using silastic membranes as a model for human epidermis. Equal amounts of the different caffeine formulations were placed in the donor compartment of the diffusion cells. Samples of the receptor phase were collected every 2 hours for 8 hours. The multiple steady-state fluxes of caffeine were determined.

High flux values were achieved with the O/W cream and dry alginate beads. Conversely, the release rate of caffeine was the lowest when caffeine was encapsulated in hydrated beads and alginate microspheres. The different permeation profiles obtained with hydrated and dry beads are probably attributable to the porous nature of the latter and also to an ion exchange mechanism.

These results indicate that this encapsulation technology can be successfully used to modulate the bioavailability of molecules for transdermal administration. Alginate polymers seem suitable to be employed in the controlled release of drugs with a high pharmacological potency and small therapeutic windows. On the other hand, its applicability can be extended to cosmetic ingredients that, for safety reasons, should be limited to the superficial layers of the skin.

Keywords: Transdermal delivery, in vitro permeation studies, alginate, beads, microparticles

Introdução

Nos sistemas transdérmicos pretende-se uma penetração transcutânea da molécula activa pelo que os formuladores procuram otimizar a sua absorção. Por outro lado, há alguma preocupação das entidades reguladoras com a exposição cutânea ao potencial tóxico de substâncias incluídas nos medicamentos ou de ingredientes cosméticos. Ao longo dos anos têm sido desenvolvidas múltiplas estratégias para obter uma libertação controlada dos componentes de formulações transdérmicas, como a utilização de matrizes de diferentes materiais^[1-3], de promotores ou retardantes de permeação, polímeros marcados molecularmente^[5] ou de microemulsões^[6].

Avanços na tecnologia de encapsulação levaram ao desenvolvimento de polímeros biodegradáveis multifuncionais invocando capacidades promotoras de permeação, permitindo uma libertação controlada de fármacos, ou com propriedades protectoras. Nos últimos anos tem-se notado um interesse crescente em biopolímeros por parte da indústria farmacêutica. Os polímeros obtidos de fontes naturais renováveis adquiriram particular destaque devido ao seu baixo custo, grande disponibilidade, solubilidade em água, biocompatibilidade, biodegradabilidade e capacidade formadora de geles. A utilização de alginato remonta aos anos 40 do século XX^[7,8]. Este polissacárido, obtido a partir de algas castanhas ou bactérias presentes no solo, é biodegradável e biocompatível e forma rapidamente complexos iónicos com catiões divalentes como o cálcio. Os sistemas de alginato podem ser preparados através de métodos de gelificação interna ou externa, que produzem sistemas com diferentes perfis de libertação^[9,10]. De forma resumida, o método de gelificação externa envolve a difusão de cálcio para o interior da gota aquosa de alginato, ou seja, o gel move-se desde a superfície da gota até ao seu interior. A formação de partículas através do método de gelificação interna envolve a libertação de cálcio desde um complexo insolúvel contido dentro da matriz de alginato através de uma redução de pH^[11,12]. Como exemplo de utilizações correntes de alginato podem destacar-se a encapsulação de células^[13-15], bactérias^[16], leveduras^[17], fármacos^[18-20] e outros compostos não biológicos^[21-22].

O objectivo deste estudo foi investigar os efeitos da encapsulação em sistemas de partículas de alginato de diferentes diâmetros e comparar a permeação transcutânea do fármaco modelo obtida com estes sistemas com aquela obtida através de formulações convencionais de fármaco livre.

Introduction

In transdermal drug delivery, skin penetration of the active molecule is a prerequisite and pharmaceutical scientists seek to optimise absorption. Conversely, there is often concern about dermal exposure to the potential toxicity of substances included in drug formulations or in cosmetic ingredients. Over the years multiple strategies have been employed to attempt controlled release of transdermal formulations, such as the use of different matrix systems materials^[1-3], penetration enhancers and retardants^[4], molecularly imprinted polymers^[5] or microemulsions^[6].

The encapsulation technology has enabled the development of multifunctional polymers claiming controlled release, permeation enhancement features or protective properties. Over the last few years, pharmaceutical industries have shown an increased interest in biopolymers. Polymers prepared from renewable natural resources have become increasingly important because of their low cost, ready availability, water-solubility, biocompatibility, biodegradability and gel forming ability. The use of alginate as a biomaterial can be traced to the 1940's^[7,8]. This hydrophilic polysaccharide, obtained from brown algae or soil bacteria, is biodegradable and biocompatible and rapidly forms ionic complexes with divalent cations such as calcium. Alginate systems can be mainly prepared by internal or external gelation methods or by other methods, which produce structurally different carriers with subsequent distinct release properties^[9,10]. Briefly, the external gelation method involves the diffusion of calcium into the aqueous alginate droplet, thus the gel front moves from the bead surface inward toward the core. The formation of particles using the internal gelation method involved the liberation of calcium from an insoluble complex contained within the alginate matrix through a pH reduction^[11,12]. Current applications of alginate include encapsulation of cells^[13-15], bacteria^[16], yeast cells^[17], drugs^[18-20] and other non-biological compounds^[21-22].

The aims of this study were to investigate the effects of the encapsulation in alginate particles of different diameters and to determine the skin permeation of the model drug from the alginate particle systems and to compare it with those obtained from conventional free drug formulations.

Materiais e Métodos

Cafeína, hidróxido de sódio, propilparabeno, cloreto de cálcio, sal de alginato de sódio, Span 80 e hidrogenofosfato dissódico dihidratado foram obtidos a partir da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). Carbopol 940, lauril sulfato de sódio, propilenoglicol e vaselina foram obtidos a partir de José M. Vaz Pereira (Lisboa, Portugal). Cloreto de sódio e ácido acético foram fornecidos por Panreac Quimica SA. (Barcelona, Espanha). Metilparabeno foi obtido a partir da Applichem (Darmstadt, Alemanha). Carbonato de cálcio foi fornecido pela Merck (Darmstadt, Alemanha) e a parafina líquida de Fagron Iberica (Barcelona, Espanha). Dihidrogenofosfato de sódio dihidratado foi obtido a partir da Riedel-de-Haen (Steinheim, Alemanha).

As membranas de polidimetilsiloxano com uma espessura de 75 µm foram fornecidas por Dow Corning Europe S.A. (Seneffe, Bélgica).

Formulações

Gel

A cafeína foi dissolvida em 90% do volume de água e, em seguida, o Carbopol 940 foi adicionado lentamente sob agitação contínua. A mistura foi colocada no banho de ultra-sons durante 20 minutos. O hidróxido de sódio foi dissolvido na quantidade de água restante e em seguida adicionado à solução de cafeína sob agitação suave. A mistura resultante foi misturada por agitação lenta até à formação do gel, que foi posteriormente embalado e etiquetado.

Creme O/A

O álcool estearílico e a vaselina foram fundidos num banho a 75°C. Os outros ingredientes foram dissolvidos em água destilada e aquecidos à mesma temperatura. A fase oleosa foi transferida para um almofariz previamente aquecido e, em seguida, foi-lhe adicionada a fase aquosa. Esta mistura foi continuamente agitada até à formação de um creme homogéneo.

Macrosferas secas e hidratadas- Método de gelificação externa

Uma solução contendo 2% (m/v) de alginato de sódio foi gotejada através de uma ponta de seringa para uma solução aquosa de cloreto de cálcio 50 mM.

As macrosferas hidratadas foram separadas da fase aquosa por filtração. Uma parte do lote foi colocada no frigorífico durante 3 semanas, de forma a obter macrosferas secas.

Micropartículas – Método de gelificação interna

O primeiro passo consistiu na preparação de uma solução de alginato a 2%, 1% de cafeína e 3,5 mL de

Materials and Methods

Caffeine, sodium hydroxide, propylparaben, calcium chloride, sodium alginate salt, Span 80 and disodium hydrogen phosphate dihydrate were purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Carbopol 940, sodium lauryl sulphate, propylene glycol and petrolatum were obtained from José M. Vaz Pereira (Lisbon, Portugal). Sodium chloride and acetic acid were purchased from Panreac Quimica SA. (Barcelona, Spain). Methylparaben was obtained from Applichem (Darmstadt, Germany). Calcium carbonate was purchased from Merck (Darmstadt, Germany) and mineral oil from Fagron Iberica (Barcelona, Spain). Sodium dihydrogen phosphate dehydrate was purchased from Riedel-de-Haen (Steinheim, Germany).

Polydimethylsiloxane membranes with a thickness of 75 µm were supplied by Dow Corning Europe S.A. (Seneffe, Belgium).

Formulations

Gel

Caffeine was dissolved in 90% of the volume of water and then Carbopol 940 was slowly added under continuous stirring. The mixture was placed in the ultrasonic bath for 20 minutes. Sodium hydroxide was dissolved in the remaining amount of water and then added to the caffeine solution by gentle agitation. The resulting mixture was mixed by slow agitation until the gel was formed. The gel was packed and labeled.

O/W Cream

Stearyl alcohol and petrolatum were melted using a bath at 75°C. The other ingredients were dissolved in distilled water and heated at 75° C. The oil phase was transferred to a mortar previously warmed and then the water phase was slowly added to the first one. The mixture was continuously stirred until a homogenous cream was formed.

Dry beads and hydrated beads – External gelation technology

A solution containing 2% (w/v) sodium alginate was extruded through a syringe tip needle into a 50 mM calcium chloride solution.

Hydrated beads were separated from the aqueous phase by filtration. Part of this batch was kept in the fridge for three weeks, in order to obtain dry beads.

Microparticles – Internal gelation technology

The first step consisted in the preparation of a 2% alginate solution, 1% of caffeine and 3.5 mL of calcium

carbonato de cálcio (suspensão a 5%, m/v). A mistura foi deixada sob agitação num agitador orbital durante alguns minutos.

Foi preparada uma fase oleosa com 50 mL de parafina líquida e Span 80 e colocada sob agitação. Em seguida, foi adicionada lentamente a fase aquosa acima descrita. Subsequentemente, a gelificação do alginato foi conseguida por adição de 20 mL de parafina líquida e ácido acético. As micropartículas resultantes foram recuperadas através de sucessivos ciclos de centrifugação e solventes desidratantes.

Estudos de difusão

A permeação de cafeína de diferentes formulações foi investigada usando células de Franz estáticas com um volume receptor de 4 mL e uma área de difusão de 0,95 cm².

A fase receptora consistiu num tampão fosfato PBS a pH=7,4. Foram cortadas porções apropriadas de polidimetilsiloxano, que foram lavadas com água de forma a eliminar algum contaminante superficial. Aliquotas idênticas de cada formulação, contendo 1 ou 1,5% (m/m) de cafeína foram colocadas no compartimento dador.

O compartimento receptor de cada célula foi submergido num banho de água a 37°C (fig.1). O compartimento dador ficou sob oclusão durante toda a experiência. Em intervalos pré-definidos, 500 µL de fase receptora foram recolhidos para análise e substituídos por um volume equivalente de líquido receptor fresco.

carbonate (suspension at 5%, w/v). The mixture was left under agitation on an orbital shaker for a few minutes.

An oily phase was also prepared with 50 mL of mineral oil and Span 80 under stirring. Then, the previous aqueous phase was slowly added to the oily phase under stirring. Subsequently, gelation of alginate was done by addition of 20 mL of liquid paraffin with acetic acid. Resultant microparticles were then recovered by using centrifugation cycles and dehydrating solvents.

Diffusion studies

Permeation of caffeine from the different formulations was investigated using Franz-type static glass diffusion cells with a receptor volume of 4 mL and a diffusion area of 0.95 cm².

The receptor phase was PBS at pH=7.4. Synthetic membranes of polydimethylsiloxane were cut to size and then washed with water in order to remove surface contamination. Calculated amounts of the different formulations, containing 1 or 1.5% (w/w) caffeine, were placed in the donor compartment of the diffusion cells.

The receptor compartment was immersed in a water bath at 37°C (fig.1). The donor compartment remained occluded throughout the experiment. At defined time points, 500 µL of receptor medium was collected for analysis and replaced with an equivalent volume of fresh receptor fluid.



Figura 1 – Formato experimental com células de difusão de Franz.
Figure 1 - Experimental set-up with Franz-diffusion cell.

Análise dos dados

A quantificação das amostras foi realizada num espectrofotómetro UV a 273 nm. Os fluxos de cafeína em cada sistema foram determinados através do declive do gráfico do cumulativo da quantidade de fármaco difundida versus tempo, depois de ter sido alcançado o estado estacionário. O coeficiente de permeabilidade foi determinado através da razão entre fluxos e da concentração do agente permeante em cada veículo. A análise estatística foi feita através de testes não-paramétricos (Kruskal-Wallis e Mann-Whitney). As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

Resultados e Discussão

Como descrito anteriormente, o objectivo deste estudo incidiu na avaliação do comportamento do alginato quando aplicado na encapsulação da cafeína. Dependendo do sistema testado foram obtidos fluxos diferentes conforme representa a figura 2 e Tabela 1. Neste estudo, os resultados dos fluxos demonstraram a seguinte tendência: micropartículas < macroesferas hidratadas < gel < creme < solução aquosa < macroesferas secas. A maior taxa de libertação de cafeína foi observada com as macroesferas secas e a menor foi obtida com as micropartículas. Os perfis de permeação da cafeína a partir dos diferentes sistemas podem ser analisados nas figuras 3 e 4.

Data analysis

Sample analysis was performed on a UV detector set at 273 nm. Steady-state fluxes of caffeine in each system were determined through the slope of the graph cumulative amount diffused versus time obtained once steady-state diffusion was reached. The permeability coefficient was determined through the ratio of the flux-values and the concentration of the permeant in each vehicle. Statistical analysis was conducted using non-parametric tests (Kruskal-Wallis and Mann-Whitney). The differences were considered significant when $p < 0.05$.

Results and Discussion

As stated before, the objective of this study was to test the performance of alginate in the encapsulation of caffeine. Depending of the tested system, different fluxes were obtained, as seen in Fig 2 and Table 1. In this study, flux results showed the following tendency: microparticles < hydrated beads < gel < cream < aqueous solution < dry beads. The highest release rate of caffeine was observed with dry beads and the lowest flux was achieved from microparticles. The permeation profiles of caffeine in the different systems can be seen in figures 3 and 4.

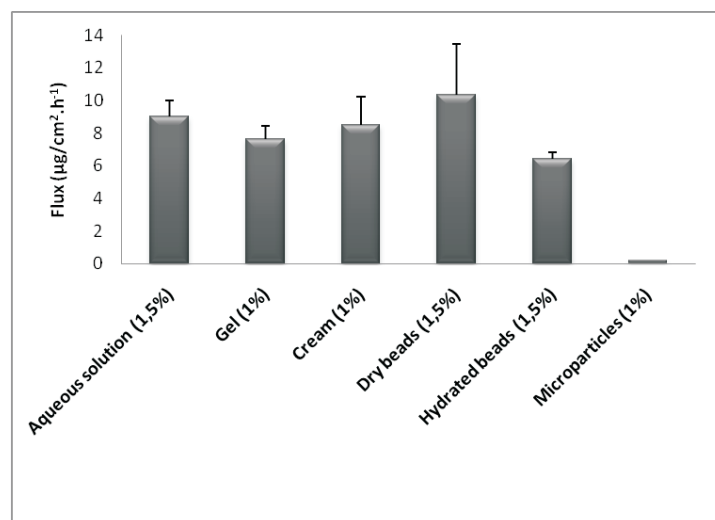


Figura 2 – Valores de fluxo das formulações testadas (média \pm DP, $n=4$ para todos os sistemas excepto $n=5$ no caso das micropartículas).

Figure 2 - Flux values of the tested formulations (mean \pm SD, $n=4$ for all systems except $n=5$ for microparticles).

Tabela 1 - Fluxos em estado estacionário e coeficientes de permeabilidade (K_p) da cafeína nos diferentes sistemas testados (média \pm DP).

Table 1 - Steady-state flux values and permeability coefficients (K_p) of caffeine in the different tested systems (mean \pm SD).

Formulações (Conc. de cafeína %, m/m) <i>Delivery systems (Conc. of caffeine %, w/w)</i>	Fluxo / Flux ($\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$)	$K_p \times 10^3$ ($\text{cm} \cdot \text{h}^{-1}$)
Solução aquosa / <i>Aqueous solution</i> (1.5%)	8.9994 \pm 0.97	0.6 \pm 0.0614
Gel (1%)	7.62 \pm 0.81	0.72 \pm 0.08
Creme / <i>Cream</i> (1%)	8.46 \pm 1.75	0.85 \pm 0.175
Macroesferas secas / <i>Dry beads</i> (1.5%)	10.33 \pm 3.13	0.7 \pm 0.21
Macroesferas hidratadas / <i>Hydrated beads</i> (1.5%)	6.42 \pm 0.39	0.41 \pm 0.002
Micropartículas / <i>Microparticles</i> (1%)	0.179 \pm 0.018	0.0179 \pm 0.0018

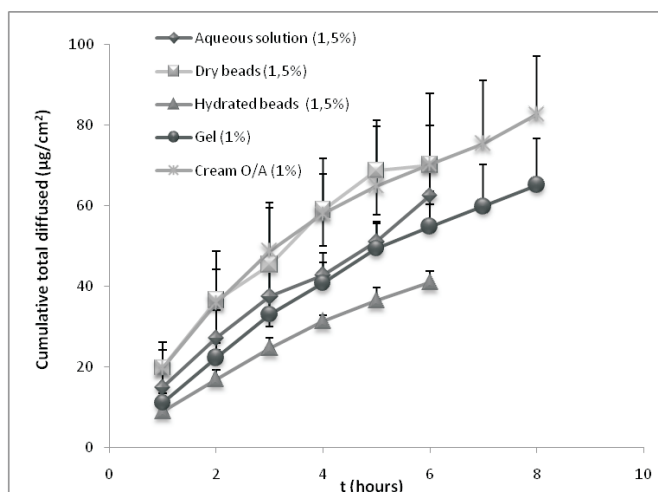


Figura 3 – Perfis de permeação das formulações testadas (média \pm DP, n= 4)

Figure 3 - Permeation profiles in the tested formulations (mean \pm SD, n= 4).

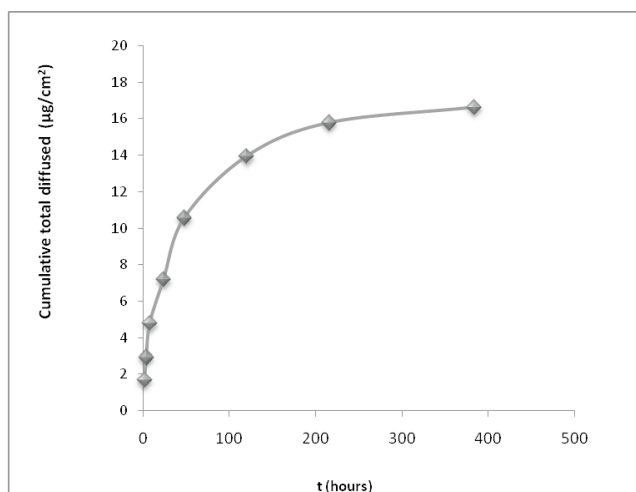


Figura 4 – Perfis de permeação da cafeína em micropartículas (média \pm DP, n=5).

Figure 4 - Permeation profiles of caffeine from the microparticles (mean \pm SD, n=5).

Deve salientar-se que a comparação de todos os veículos é possível, uma vez as variáveis experimentais, designadamente, a área de difusão, o volume da célula, a espessura e o tipo de membrana foram constantes para todas as formulações testadas. Pode-se, ainda, observar que a concentração de cafeína não é exactamente a mesma para todos os veículos. Foram utilizadas concentrações de cafeína de 1 ou 1,5%. O efeito da dose é controverso. Alguns trabalhos demonstraram que uma

It should be noted that the comparison of all vehicles is possible since experimental variables such as diffusion area, cell volume, thickness and type of membrane were the same for all tested formulations. It could be pointed out that the concentration of caffeine is not exactly the same in all the vehicles, since either 1 or 1.5% concentrations were used. However, the dose effect is controversial and some studies showed that an high concentration of permeant does not necessarily

elevada concentração de agente permeante não conduz necessariamente a um aumento do fluxo^[23], sendo a comparação dos valores de fluxo entre os diferentes sistemas de transporte neste estudo, portanto, adequada. O perfil de difusão da cafeína nos diferentes sistemas de veiculação poderá estar relacionado com as interações entre os veículos e a membrana, uma vez que foram observadas diferenças significativas nos fluxos da solução aquosa de cafeína e nos fluxos quando a cafeína se encontra associada aos diferentes veículos ($p = 0,005$).

Os valores médios de fluxo do gel de cafeína foram inferiores aos do creme, mas essa diferença não foi estatisticamente significativa ($p = 0,343$). Estes resultados podem ser atribuídos a dois factores: se por um lado, as características reológicas do gel, como a viscosidade, poderão dificultar a libertação de cafeína a partir da formulação; por outro lado, apesar de ambas as formulações apresentarem uma natureza hidrofílica, essa característica é mais evidente na primeira, logo a cafeína terá mais afinidade para o gel, sendo libertada mais lentamente. Em resumo, o comportamento do gel é claramente marcado pela libertação lenta e pela elevada afinidade da cafeína para o veículo.

A aplicação das macroesferas de alginato, vulgarmente reconhecidas como uma nova geração de sistemas de veiculação para fármacos, proporcionou resultados surpreendentes quando comparados com os obtidos com as macroesferas hidratadas ($p = 0,029$). As macroesferas secas (com um tamanho de 1 mm) apresentaram um fluxo superior ao obtido com a solução aquosa, enquanto as macroesferas hidratadas (com um tamanho de 2-3 mm) apresentaram um fluxo de 1,4 vezes menor quando comparada com a solução de referência. Em ambas as formulações devem ser considerados como principais factores não apenas a porosidade da membrana de alginato mas também o baixo peso molecular da cafeína. No entanto, a pressão osmótica de ambos os lados da membrana nas macroesferas secas e o processo de hidratação do polímero (entrada de água) promove claramente a difusão livre da cafeína^[24]. No caso das macroesferas hidratadas, a lenta libertação da cafeína só pode ser explicada através da porosidade do polímero, uma vez que o nível de hidratação da formulação mantém a cafeína dentro da esfera e não permite difusão livre da mesma^[25]. Em suma, a força e elasticidade mecânica dos núcleos foram contrabalançadas pelo processo de intumescimento do polímero e a força motriz envolvida foi o principal factor responsável pela taxa de libertação e, por conseguinte, responsável pelo fluxo obtido. Realce-se que serão conduzidos outros estudos, que envolverão a aplicação de um agente de reticulação e um processo de revestimento, com o objectivo de modular a taxa de libertação dos princípios activos.

Além disso, como ilustra a Fig. 4, os perfis de

lead to an increase of flux^[23] and thus the comparison between the flux values of the different delivery systems is appropriate.

The diffusion profile of caffeine in the different delivery systems could be strongly explained by the interactions between the vehicles and the membrane, since significant differences were observed in terms of fluxes between aqueous solution of caffeine and caffeine associated to the vehicles ($p = 0.005$). The mean flux values with the caffeine gel were lower than with the cream but this difference was not statistically significant ($p = 0.343$). These results can be attributable to two factors: on the one hand, rheological characteristics of the gel, like viscosity, may hinder the release of caffeine from the formulation; on the other hand, even though both the gel and the cream (O/A) have a hydrophilic nature, this characteristic is more evident in the first, thus caffeine had more affinity for the gelling environment and it will be slowly released from the gel. In summary, the performance of the gel is clearly marked by a weak release and partitioning of caffeine from this vehicle.

The use of alginate beads as a new generation of controlled drug delivery system proved to be a great challenge and provided surprising results when compared to those obtained by hydrated beads ($p = 0.029$). Dry beads (particle size of 1 mm) exhibited a higher flux than the aqueous solution while the hydrated beads (particle size around 2-3 mm) showed a flux 1.4 times lower than the reference solution. In both cases, not only the porosity of the alginate membrane but also the lower molecular mass of caffeine should be considered as the major factors. However, the osmotic pressure of both sides of the membrane in dry beads and the hydration process of the polymer (water input) strongly promotes the free diffusion of caffeine^[24]. In the case of hydrated beads, the restricted release of caffeine can only be explained through the porosity of the polymer since the hydration level of this formulation retains the caffeine inside the bead and does not allow to a free diffusion of the drug^[25]. In brief, the elasticity and mechanical strength of the cores were counterbalanced by the swelling process, and the inherent driving force was the main factor that explains the release rate, therefore, the flux. Future studies should be conducted with application of a cross linking agent or coating process in order to modulate the rate of the active compound release.

As shown in Fig 4, the permeation profiles of caffeine encapsulated into alginate microparticles (particle size ranged from 20 to 50 μm) were much different from every other system and the highest differences in flux were observed when microparticles were compared to hydrated beads formed by the external gelation method ($p = 0.007$). Since the amounts of caffeine that accumulated in the receptor compartment were very

permeação da cafeína encapsulada em micropartículas de alginato (tamanho da partícula variou entre 20 a 50 μm) foram muito diferentes aos obtidos com os sistemas anteriores. As diferenças mais significativas foram observadas com as macroesferas hidratadas preparadas através do método de gelificação externa ($p = 0,007$). Neste caso, e uma vez que a quantidade de cafeína acumulada no compartimento receptor foi muito baixa, foram realizados tempos de amostragem mais prolongados. O perfil de permeação da cafeína foi linear até às 48 horas e, em seguida, foi atingido um plateau. A libertação do princípio activo encapsulado parece ser limitada principalmente pela baixa porosidade das micropartículas, tamanho e estrutura da partícula. Neste sentido, estas micropartículas provaram ser o menor sistema de partículas obtido e os nossos resultados sugerem que as micropartículas poderão apresentar uma densa estrutura em contraste com macroesferas hidratadas formadas pelo método de gelificação externa.

Em termos de porosidade, alguns estudos anteriores demonstraram que a produção de partículas pelo método de gelificação interna geralmente conduz à formação de estruturas mais porosas do que as partículas formadas pelo método de gelificação externa^[9]. Porém, considerando aos resultados do fluxo obtidos neste estudo, que foram significativamente inferiores aos obtidos com as macroesferas, assume-se que a porosidade poderá não ser o principal factor. Por outro lado, no método de gelificação interna, os íões de cálcio estão distribuídos uniformemente na solução de alginato e difusão de protões nas gotículas vai induzir a gelificação desde a superfície até ao núcleo da partícula, dando origem a gotículas homogéneas^[12]. Por conseguinte, assumimos que o outro factor poderá estar relacionado com o tamanho das partículas e não com a tecnologia de gelificação. É bem conhecido que o tamanho das partículas pode também influenciar o tamanho de poros. As macroesferas formadas pelo método de gelificação externa apresentaram um tamanho compreendido entre 2-3 mm. Pelo contrário, o tamanho das micropartículas variou entre 20 e 50 μm . Neste caso, esperamos observar poros mais pequenos no caso das micropartículas. Consequentemente, espera-se obter uma rede mais compacta de alginato e, por conseguinte, espera-se obter valores de fluxos reduzidos.

Conclusão

O tipo de veículo é um elemento vital no processo de permeação. Como não há nenhum veículo universal, cada modelo molecular deve ser analisado individualmente de forma a maximizar o seu potencial farmacológico com a selecção de um sistema de

low, longer sampling times were taken. The permeation profile of caffeine was linear for up to 48 hours and then a plateau was emerged. The release of the active compound seems to be limited mainly by the low porosity of microparticles, size and their particle structure. These microparticles prove to be the smallest particle system and our results suggest that they may have a dense amorphous structure in contrast to hydrated beads formed by external gelation. In terms of porosity, previous study demonstrated that the production of particles using internal gelation method generally allows to the formation of more porous than those formed via external gelation^[9] but since the flux value of the microparticles obtained in this study was significantly lower comparing with beads, the porosity does not seem to be the main factor that explains previous results. On the other hand, in internal gelation method, calcium ions are homogeneously distributed in the alginate solution initially, thus diffusion of protons into the pre-gel droplets will induce gelation starting at the surface, giving rise to homogenous droplets^[12]. Thus, we assumed that the other factor could be related to the particle size and not related to the gelation technology. It is well-known that particle size may also influence porous size. Beads formed by external method were around 2-3 mm. In contrast, microparticles ranged from 20-50 μm . In this case, we expected to have small pores in the microparticles. Consequently, a more compact alginate network is present in microparticles and thus it may achieve to the lowest fluxes.

Conclusion

The type of vehicle is key issue of the permeation process. Since there is no universal vehicle, each molecular model must be analyzed individually in order to maximize its pharmacological potential with a suitable delivery system.

veiculação adequado.

Este estudo abordou o impacto do intumescimento das macroesferas secas na libertação do agente permeante. Tal facto demonstrou ser responsável por um comportamento diferente quando comparado com as formulações tradicionais, tais como, o creme ou o gel. Por outro lado, as macroesferas hidratadas e micropartículas foram capazes de retardar a libertação de cafeína e demonstraram ser potenciais sistemas promissores para a aplicação tópica de vários princípios activos.

Estes resultados sugerem que a resposta para conseguir uma formulação otimizada não depende apenas de um conhecimento completo do perfil físico-químico dos fármacos e excipientes mas também das propriedades e os mecanismos inerentes à acção do sistema de veiculação, quando este é considerado como uma unidade.

Futuramente, serão conduzidos outros estudos que envolverão um composto modelo lipofílico, seguido por métodos experimentais com a pele humana e a aplicação desta tecnologia a outros fármacos mais relevantes a nível terapêutico.

This study brought into the limelight the impact of the swelling property of the dry beads in the release of the model permeant, which was responsible for a different performance of this system when compared to the well-known traditional formulations such as cream and gel. Conversely, hydrated beads and microparticles were able to delay the release of caffeine and showed potential to become promising systems for the topical delivery of several active compounds.

These results lead to the conclusion that the answer to achieve an optimized formulation is not only a complete knowledge of the physicochemical profile of the drugs and excipients but also the properties and inherent mechanisms of action of the delivery system as a unit.

Future studies will be conducted with a lipophilic model compound, followed by experimental methods with human skin and more therapeutically relevant drugs.

Referências / References

- [1] Murdan S. Organogels in drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv* 2005; 2: 489-505.
- [2] Hair PI, Keating GM, McKeage K. Transdermal matrix fentanyl membrane patch (matrifen): in severe cancer-related chronic pain. *Drugs* 2008; 68: 2001-2009.
- [3] Cilurzo F, Minghetti P, Gennari CG, Casiraghi A, Montanari L. A novel polymethylmethacrylate hydrophilic adhesive matrix intended for transdermal patch formulations. *Drug Deliv* 2010; 17: 171-177.
- [4] Kaushik D, Batheja P, Kilfoyle B, Rai V, Michniak-Kohn B. Percutaneous permeation modifiers: enhancement versus retardation. *Expert Opin Drug Deliv* 2008; 5: 517-529.
- [5] Alvarez-Lorenzo C, Concheiro A. Molecularly imprinted polymers for drug delivery. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2004; 5: 231-245.
- [6] Santos P, Watkinson AC, Hadgraft J, Lane ME. Application of microemulsions in dermal and transdermal drug delivery. *Skin Pharmacol Physiol* 2008; 21: 246-259.
- [7] Blaine G. Experimental observations on absorbable alginate products in surgery: gel, film, gauze and foam. *Ann Surg* 1947; 125: 102-114.
- [8] Gacesa P. Alginates. *Carbohydr Polym* 1988; 8: 161-182.
- [9] Vandenberg GW, Nouè JDL. Evaluation of protein release from chitosan-alginate microcapsules produced using external or internal gelation. *J Microencapsul* 2001; 18: 433-441.
- [10] Chan LW. Production of alginate microspheres by internal gelation using emulsification method. *Int J Pharm* 2002; 242: 259-262.
- [11] Reis CP, Neufeld RJ, Vilela S, Ribeiro AJ, Veiga F. Review and current status of emulsion/dispersion technology using an internal gelation process for the design of alginate particles. *J Microencapsul* 2006; 23: 245-257.
- [12] Quong D, Neufeld RJ, Skjak-Braek G, Poncelet D. External versus internal source of calcium during the gelation of alginate beads for DNA encapsulation. *Biotechnol Bioeng* 1998; 57: 438-446.
- [13] Redenbaugh K, Paasch BD, Nichol JW, Kossler ME, Viss PR, Walker KA. Somatic seeds: encapsulation of asexual plant embryos. *Bio Technol* 1986; 4: 797-801.
- [14] Lim F, Sun AM. Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas. *Science* 1980; 210: 908-910.
- [15] Lamberti FV, Sefton MV. Microencapsulation of erythrocytes in Eudragit-RL-coated calcium alginate. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1983; 759: 81-91.

- [16] Provost H, Divies C, Rousseau E. Continuous production with *Lactobacillus bulgarius* and *Streptococcus termophilus* entrapped in calcium alginate. *Biotechnol Lett* 1985; 7: 247-252.
- [17] Shiotani T, Yamane T. A horizontal packed-bed bioreactor to reduce carbon dioxide gas holdup in the continuous production of ethanol in immobilized yeast cells. *Eur J Appl Microbiol Biotechnol* 1981; 13: 96-101.
- [18] Salib NN, El Menshawy MA, Ismail AA. Utilization of sodium alginate in drug microencapsulation. *Pharm Ind* 1978; 40: 1230-1234.
- [19] Badwan AA, Abumalooch A, Sallam E, Abukalaf A, Jawan O. Sustained-release drug delivery system using calcium alginate beads. *Drug Dev Ind Pharm* 1985; 11: 239-256.
- [20] Gray CJ, Dowsett J. Retention of insulin in alginate gel beads. *Biotechnol Bioeng* 1988; 31: 607-612.
- [21] Canon K. Electrostatic image development toners. Japan, 1984: 59170853.
- [22] Burns MA, Kvesitadze GI, Graves DJ. Dried calcium alginate/magnetite spheres: a new support for chromatographic separations and enzyme immobilization. *Biotechnol Bioeng* 1985; 27: 137-145.
- [23] Akhter SA, Barry BW. Absorption through human skin of ibuprofen and flurbiprofen; effect of dose variation, deposited drug films, occlusion and the penetration enhancer N-methyl-2-pyrrolidone. *J Pharm Pharmacol* 1985; 37: 27-37.
- [24] Sugawara S, Imai T, Otagiri M. The controlled release of prednisolone using alginate gel. *Pharm Res* 1994; 11: 272-277.
- [25] Thu B. Alginate polycation microcapsules. I Interaction between alginate and polycation. *Biomaterials* 1996; 17: 1031-1040.