

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

FORMULAÇÕES PARA USO TÓPICO CONTENDO DEXAMETASONA
ASSOCIADA A PARTÍCULAS POLIMÉRICAS PRODUZIDAS POR
DEPOSIÇÃO INTERFACIAL DO POLIMERO PRÉ-FORMADO OU
ATOMIZAÇÃO VIBRACIONAL

TIAGO COSTA BEBER

PORTO ALEGRE, MARÇO DE 2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

FORMULAÇÕES PARA USO TÓPICO CONTENDO DEXAMETASONA
ASSOCIADA A PARTÍCULAS POLIMÉRICAS PRODUZIDAS POR
DEPOSIÇÃO INTERFACIAL DO POLIMERO PRÉ-FORMADO OU
ATOMIZAÇÃO VIBRACIONAL

Dissertação apresentada por **Tiago
Costa Beber** para obtenção do GRAU
DE MESTRE em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. Ruy Carlos Ruver Beck

Porto Alegre, 2014

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas em nível de Mestrado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 31.03.2014, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dr. Cassia Virginia Garcia
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dr. Cristiane de Bona da Silva
Universidade Federal de Santa Maria

Profa. Dr. Silvia Stanisçuaski Guterres
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Beber, Tiago Costa

Formulações para uso tópico contendo dexametasona associada a partículas poliméricas produzidas por deposição interfacial do polímero pré-formado ou atomização vibracional / Tiago Costa Beber. -- 2014. 175 f.

Orientador: Ruy Carlos Ruver Beck.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2014.

1. Partículas submicrométricas. 2. Atomização vibracional. 3. Dexametasona. 4. Formulações semissólidas. 5. Penetração cutânea. I. Beck, Ruy Carlos Ruver, orient. II. Título.

Agradecimentos à CAPES, órgão que financiou a bolsa de estudos para o desenvolvimento deste trabalho, e ao Laboratório 405 da Faculdade de Farmácia que disponibilizou equipamentos e materiais necessários para a realização dos experimentos práticos na elaboração da presente dissertação.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Maria Nelci e Valdir Costa Beber, pelo apoio incondicional, paciência, fé e compreensão;

Aos meus irmãos Tobias e Bárbara Costa Beber e minha cunhada Ana Paula Gerhardt pelo apoio nos momentos difíceis e alegres;

Aos meus amigos, colegas de residência e de laboratório Noé da Fonseca e Willian Prado pelo apoio emocional, companheirismo, ensinamentos e amizade;

Ao meu orientador professor Dr. Ruy Carlos Ruver Beck pelos ensinamentos, paciência, orientação dedicada e oportunidade de participar do grupo de pesquisa;

Às professoras Silvia Stanisçuaski Guterres e Adriana R. Pohlmann pela oportunidade acadêmica e excelentes aprendizados;

Aos queridos amigos, colaboradores e colegas Márcia Camponogara Fontana e Diego Fontana Andrade que me acolheram e me proporcionaram, com muita paciência, inúmeros ensinamentos;

Aos amigos e colegas que ingressaram comigo no mestrado, Diego Andrade, Joana Forgearini, Luiza Frank e Márcia Adorne que me proporcionaram grande apoio emocional, incentivo, contribuições e ensinamentos;

Aos demais colegas do grupo de pesquisa do laboratório 405 e K204 pelas discussões de resultados, ideias, ajudas, amizade e pelos demais momentos compartilhados neste período;

Ao Abatedouro Araldi (Nova Roma do Sul – RS), pela gentileza em ceder a pele suína para realização deste trabalho;

À UFRGS e ao curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, pela oportunidade na construção do meu conhecimento;

Aos demais amigos e pessoas que de alguma forma fizeram parte dessa etapa da minha vida.

RESUMO

Nanocápsulas poliméricas têm sido estudadas como carreadores de fármacos por suas propriedades de controle de liberação e direcionamento nas camadas da pele. Mais recentemente, partículas submicrométricas obtidas por atomização vibracional empregando o equipamento Nano Spray Dryer[®] são descritas na literatura com potencial para administração de fármacos em diversas vias de administração. Entretanto, não há relatos do potencial desse tipo de sistema para aplicação tópica. O presente trabalho teve como objetivo desenvolver formulações semissólidas contendo dexametasona (DEX) associada a nanocápsulas poliméricas de superfície aniônica (NC-) e catiônica (NC+) além de partículas poliméricas submicrométricas (PS) e não-poliméricas (PNP) para uso tópico. As NC- e NC+ apresentaram diâmetro médio de 200 e 150 nm e potencial zeta negativo e positivo, respectivamente. Elas foram incorporadas em hidrogéis, sendo que somente o hidrogel contendo NC+ promoveu o controle da liberação da DEX em comparação aos hidrogéis com as NC- e o fármaco livre. As PS e PNP foram obtidas na forma de aglomerados de partículas de formato esférico e superfície rugosa, na forma de pós, com teor próximo ao teórico, diâmetro médio < 1 µm (PS: 975 nm e PNP: 523 nm) e rendimento de processo variando de 38 a 81%. Os pós foram dispersos em cremes (fase oleosa da emulsão), os quais apresentaram comportamento reológico não-newtoniano do tipo plástico. O melhor controle da liberação *in vitro* foi verificado para o creme contendo as PS (C-PS) em comparação aos cremes com PNP (C-PNP) e com o fármaco livre (C-D) podendo esse controle ser atribuído à presença do polímero e à distribuição homogênea da DEX na matriz polimérica, verificada por microscopia Raman confocal. Além disso, estudos de penetração e permeação *in vitro* em pele abdominal suína mostraram que o C-PS conferiu um acúmulo de DEX no estrato córneo ao longo do tempo (efeito reservatório). Após 12 horas, quantidades superiores e significativas de DEX foram encontradas na epiderme viável e na derme para o C-PS em comparação às demais formulações, demonstrando o potencial das PS como sistemas para controle e vetorização da DEX nas camadas da pele, sem aumentar o risco de absorção sistêmica.

Palavras-chave: dexametasona, nanocápsulas, partículas submicrométricas, atomização vibracional, formulações semissólidas, penetração cutânea.

ABSTRACT

Polymeric nanocapsules have been studied as drug carriers due to their controlled release and skin targeting properties. Recently, submicron particles obtained by vibrational atomization using the Nano Spray Dryer[®] equipment have been described in the literature, showing the drug delivery potential of these particles in several administration routes. However, no study on the potential of this type of system for topical application has been published. This work aimed to develop semisolid formulations containing dexamethasone (DEX) associated with anionic (NC-) and cationic polymeric nanocapsules (NC+), as well as polymeric submicron particles (SP) and non-polymeric submicron particles (SNP) for topical use. Mean size of NC- and NC+ was between 200 and 150 nm, and zeta potential was negative and positive, respectively. They were incorporated into hydrogels, and only the one containing NC+ promoted DEX control release, compared to the other formulations, with NC- and free drug. SP and SNP were prepared in the powder form, consisting of agglomerated particles with spherical shape and rough surface, drug content close to the theoretical, mean size < 1 μm (PS: 975 nm and PNP: 523 nm) and process yield ranging from 38 to 81%. The powders were dispersed in creams (oil phase of the emulsion), which presented non-Newtonian rheological behavior of the plastic type. The better control of *in vitro* release was observed for the cream containing SP (C-SP), compared to the formulations with SNP (C-SNP) and free drug (C-D), which can be attributed to the presence of the polymer and homogeneous distribution of DEX in the polymer matrix, as observed by confocal Raman microscopy. In addition, *in vitro* penetration and permeation studies using porcine abdominal skin showed that C-SP led to accumulation of DEX in the stratum corneum over time (depot effect). After 12 h, higher and significant amounts of DEX were found in the viable epidermis and dermis, compared to the other formulations, indicating the potential of SP as drug delivery systems for the controlled release and targeting of DEX into skin layers, without increasing the risk of systemic absorption.

Key-words: dexamethasone, nanocapsules, submicron particles, vibrational atomization, semisolid formulations, skin penetration.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

- Figura 3.1. Estrutura química da dexametasona. 38
- Figura 3.4. Esquema da técnica de secagem vibracional com o Nano Spray Dryer B-90® 44

CAPÍTULO 1

- Figura 4.1. Representação esquemática da célula de difusão de Franz utilizada neste trabalho. 65
- Figura 4.2. Distribuição granulométrica do tamanho de partícula, por difratometria de laser para as nanocápsulas poliméricas de superfície aniônica (NC- e NCD-). 67
- Figura 4.3. Distribuição granulométrica do tamanho de partícula, por difratometria de laser para as nanocápsulas poliméricas de superfície catiônica (NC+ e NCD+). 67
- Figura 4.4. Fotomicrografias obtidas por MET das suspensões de nanocápsulas carregadas de DEX de superfície aniônica (NCD-) em aumentos de 50.000x (A), 100.000x (B) e 200.000x (C). 70
- Figura 4.5. Fotomicrografias obtidas por MET das suspensões de nanocápsulas carregadas de DEX de superfície catiônica (NCD+) em aumentos de 50.000x (A), 100.000x (B) e 200.000x (C). 70
- Figura 4.6. Gráfico de variação de *backscattering* das NCD-. 71
- Figura 4.7. Gráfico de variação de *backscattering* das NCD+. 71
- Figura 4.8. Distribuição granulométrica do tamanho de partícula, por difratometria de laser, analisada por volume (a) e por número (b) para os géis branco (GB), com fármaco livre (GD) e com as nanocápsulas poliméricas de superfície aniônica (GNCD-). 73
- Figura 4.9. Distribuição granulométrica do tamanho de partícula, por difratometria de laser, analisada por volume (a) e por número (b) para os géis branco (GB), com fármaco livre (GD) e com as nanocápsulas poliméricas de superfície catiônica (GNCD+). 74
- Figura 4.10. Reogramas, da tensão de cisalhamento *versus* taxa de cisalhamento, dos hidrogéis. 76
- Figura 4.11. Perfil de liberação *in vitro* da DEX a partir das formulações

semissólidas do tipo gel usando célula de difusão de Franz. 78

CAPÍTULO 2

Figure 1. SEM images of submicron particles. (A) polymeric particles (SP) and (B) submicron non-polymeric particles (SNP). 98

Figure 2. Particle size distribution of submicron particles (SP and SNP) calculated from SEM images. 99

Figure 3. Investigation of drug distribution with confocal Raman microscopy. A) Single Raman spectra of individual components DEX (red), deoxycholate (green) and PCL (blue). B and C) Overlay of topography image with false color Raman image for SNP (B) and SP (C) powders. 100

Figure 4. Polymeric film weight (mg) after immersion in emulsifier system during 28 days at 25 °C. 101

Figure 5. Granulometric profiles of creams C-B, C-SP, C-SNP and C-D determined by laser diffraction. 102

Figure 6. Photomicrographs of creams containing free drug (A) and submicron polymeric particles (B). 102

Figure 7. Rheological profiles of creams. Shear stress (Pa x 10) is plotted against shear rate (s⁻¹). 102

Figure 8. *In vitro* release profile of DEX from semisolid formulations using vertical Franz diffusion cells. 104

Figure 9. Flux (µg.cm².h^{-1/2}) of DEX from creams calculated from *in vitro* drug release experiments. 104

Figure 10. Amount of DEX penetrated in the *stratum corneum* (SC) after 2, 4, 8, 10 and 12 hours. 106

Figure 11. Amount of DEX penetrated in the viable epidermis (VE) after 2, 4, 8, 10 and 12 hours. 106

Figure 12. Percutaneous penetration of DEX into the dermis (DE) after 2, 4, 8, 10 and 12 hours. 107

Figure 13. Mean cumulative amount of DEX permeated from semisolid formulations (creams) versus time. 108

ANEXOS

Figura 9.1.1 Curva analítica média para quantificação da DEX nas formulações semissólidas, partículas submicrométricas e nanocápsulas

poliméricas.	153
Figura 9.1.2. Cromatogramas de CLAE para o método analítico de quantificação da DEX nas formulações semissólidas do tipo creme (A: CB; B: CPS; C: partículas poliméricas submicrométricas; D: amostra da curva-padrão na concentração de 1,5 µg/mL e E: fase móvel).	157
Figura 9.1.3. Cromatogramas de CLAE para o método analítico de quantificação da DEX nas formulações semissólidas do tipo gel (A: GB; B: GD; C: GDLNC- e D: amostra da curva-padrão na concentração de 1,5 µg/mL).	158
Figura 9.2.1 Curva analítica média para doseamento de DEX em meio receptor (PBS pH 7,4 contendo 0,02% de polissorbato 80).	163
Figura 9.2.2. Cromatogramas de CLAE para o método analítico de quantificação da DEX no meio receptor (a: meio receptor; b: amostra da curva de calibração na concentração de 10,0 µg/mL; C: creme branco após 16 h de liberação; D: gel branco após 8 horas de liberação).	166
Figura 9.3.1 Curva analítica média para quantificação da DEX no meio receptor (excesso de formulação) e nas camadas da pele (estrato córneo, epiderme viável e derme).	170
Figura 9.3.2. Cromatogramas de CLAE para o método analítico de extração e quantificação da DEX nas camadas da pele (A: <i>Tape stripping</i> do estrato córneo; B: epiderme viável; C: derme; D: amostra de pele contaminada com 10 µg/mL de solução de DEX; e E: amostra da curva de calibração na concentração de 10 µg/mL de DEX).	175

LISTA DE TABELAS

REVISÃO DE LITERATURA

Tabela 3.4. Tipos de partículas preparadas por atomização vibracional e vias de administração	50
---	----

CAPÍTULO 1

Tabela 4.1. Composição da suspensão de nanocápsulas de superfície catiônica contendo DEX (NC+).	56
Tabela 4.2. Composição da suspensão de nanocápsulas de superfície aniônica contendo DEX (NC-).	56
Tabela 4.3. Composição quali-quantitativa das formulações de hidrogéis.	61
Tabela 4.4. Modelos matemáticos empregados para estudar o tipo de comportamento não-newtoniano.	64
Tabela 4.5. Diâmetro médio, span e índice de polidispersão das nanocápsulas poliméricas determinados pelas diferentes técnicas.	68
Tabela 4.6. Características organolépticas, pH e teor de DEX dos hidrogéis.	72
Tabela 4.7. Diâmetro médio e índice de polidispersão (PDI) dos géis determinados por DLS.	75
Tabela 4.8. Coeficiente de regressão (r^2) para os modelos de fluxo dos lotes dos hidrogéis (GB, GD, GNCD- e GNCD+).	76

CAPÍTULO 2

Table 1. Qualitative and quantitative composition of semisolid formulations.	94
Table 2. Physicochemical characteristics of DEX submicron particles (Mean \pm SD, n = 3).	98
Table 3. Physicochemical characteristics of creams (mean \pm standard deviation, n = 3).	101
Table 4. Mean size, SPAN and PDI of creams (mean \pm standard deviation, n = 3).	101
Table 5. Regression coefficient (r^2) for mathematical modeling in shear rate-shear stress curves according to different flow models (n = 3).	103
Table 6. Plastic viscosity and yield stress of the creams according to the Casson model.	103
Table 7. Rate constant (k), correlation coefficients (r) and MSC determined for	

DEX released from creams using the Higuchi's square root model. 105

ANEXOS

Tabela 9.1.1. Parâmetros cromatográficos utilizados na metodologia analítica para doseamento da DEX em formulações semissólidas, partículas submicrométricas e nanocápsulas poliméricas. 151

Tabela 9.1.2. Preparação dos níveis de concentração das curvas de calibração para quantificação da DEX. 152

Tabela 9.1.3: ANOVA da linearidade do método analítico para quantificação da DEX nas formulações semissólidas, partículas submicrométricas e nanocápsulas. 154

Tabela 9.1.4. Avaliação dos coeficientes de variação (CV %) intra e inter-dia do método analítico para extração da DEX nas formulações semissólidas 155

Tabela 9.1.5. Avaliação da exatidão do método analítico para extração da DEX nas formulações semissólidas. 156

Tabela 9.2.1. Parâmetros cromatográficos utilizados na metodologia analítica para doseamento da DEX no meio receptor. 162

Tabela 9.2.2. Preparação dos níveis de concentração das curvas analíticas de DEX. 163

Tabela 9.2.3: ANOVA da linearidade do método analítico para quantificação da DEX nas formulações semissólidas. 164

Tabela 9.2.4. Avaliação dos coeficientes de variação (CV %) intra e inter-dia do método analítico para doseamento da DEX no meio de liberação. 165

Tabela 9.3.1. Parâmetros cromatográficos utilizados na metodologia analítica para doseamento da DEX nas camadas da pele. 169

Tabela 9.3.2. ANOVA da linearidade do método analítico para quantificação da DEX no meio acceptor (excesso de formulação) e nas camadas da pele (estrato córneo, epiderme viável e derme). 171

Tabela 9.3.3. Exatidão da extração de DEX nas fitas. 172

Tabela 9.3.4. Avaliação da exatidão (%) do método de extração de DEX recuperada na pele abdominal suína inteira. 173

Tabela 9.3.5. Avaliação dos coeficientes de variação (CV %) intra e inter-dia do método de extração de DEX em pele de abdômen suíno. 174

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA: Análise de variância

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

cP: Centipoise

CT: corticoides tópicos

CV: Coeficiente de variação

DEX: dexametasona

dp: Desvio padrão

EC: Estrato córneo

GB: Gel branco

GD: Gel contendo dexametasona livre

GNCD-: Gel contendo dexametasona associada à nanocápsulas de superfície aniônica

GNCD+: Gel contendo dexametasona associada à nanocápsulas de superfície catiônica

ICH: International Conference on Harmonisation

LD: Limite de Detecção

LQ: Limite de Quantificação

Log D: coeficiente de distribuição octanol/água

LSS: Lauril sulfato de sódio

MET: Microscopia eletrônica de transmissão

MEV: Microscopia eletrônica de varredura

mV: Milivolts

n: Número de réplicas

NCL: Nanocápsulas de núcleo lipídico

NC-: nanocápsulas poliméricas de superfície aniônica

NC+: nanocápsulas poliméricas de superfície catiônica

nm: Nanômetros

O/A: Óleo/água

PCL: poli (ϵ -caprolactona)

PS: partículas poliméricas submicrométricas

PNP: partículas não-poliméricas submicrométricas

pH: Potencial de Hidrogeniônico

PDI: Índice de polidispersão

% Percentual

% (m/v) Percentual massa/volume

% (p/v) Percentual peso/volume

% (v/v) Percentual volume/volume

q.s.p.: Quantidade suficiente para

r: Coeficiente de correlação

R²: Coeficiente de determinação

SM: Solução-mãe

T80: Polissorbato 80

UV: Ultravioleta

µg: Microgramas

µm: Micrômetros

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	23
2. OBJETIVOS	29
2.1 Objetivo geral	31
2.2 Objetivos específicos	31
3. REVISÃO DE LITERATURA	33
3.1 Pele e vias de penetração cutânea	35
3.2 Corticóides tópicos e dexametasona	37
3.3 Micro e nanopartículas como sistemas de liberação de fármacos na Pele	40
3.4 Atomização vibracional ou <i>Nano Spray Drying</i>	43
4. CAPÍTULO 1. Hidrogéis tópicos contendo dexametasona associada a nanocápsulas poliméricas: preparação, caracterização e liberação <i>in vitro</i>	51
4.1 Introdução	53
4.2 Material e Métodos	54
4.2.1 Material	54
4.2.1.1 Matérias-primas	54
4.2.1.2 Solventes e outros materiais	54
4.2.1.3 Aparelhos e Equipamentos	55
4.2.2 Métodos	55
4.2.2.1 Preparação de suspensões aquosas de nanocápsulas poliméricas	55
4.2.2.2 Caracterização físico-química das nanocápsulas poliméricas	57
4.2.2.2.1 Características organolépticas	57
4.2.2.2.2 Determinação do pH	57
4.2.2.2.3 Determinação do teor de DEX e eficiência de encapsulação	57
4.2.2.2.4 Determinação do diâmetro médio de partícula, distribuição granulométrica e índice de polidispersão	58
4.2.2.2.4.1 Difratometria de laser	58
4.2.2.2.4.2 Espalhamento de luz dinâmico	58
4.2.2.2.5 Determinação do potencial zeta (ξ)	59
4.2.2.2.6 Avaliação da morfologia das nanocápsulas	59

4.2.2.2.7 Avaliação de fenômenos de instabilidade física por espalhamento múltiplo de luz	59
4.2.2.3 Preparação das formulações de hidrogéis	60
4.2.2.4 Caracterização físico-química dos hidrogéis	61
4.2.2.4.1 Características organolépticas	62
4.2.2.4.2 Determinação do pH	62
4.2.2.4.3 Determinação do teor de DEX	62
4.2.2.4.4 Determinação do diâmetro médio de partícula distribuição granulométrica e índice de polidispersão	62
4.2.2.4.4.1 Difractometria de laser	62
4.2.2.4.4.2 Espalhamento de luz dinâmico	63
4.2.2.4.5 Determinação do comportamento reológico	63
4.2.2.5 Estudo de liberação <i>in vitro</i> da DEX a partir dos géis	64
4.3 Resultados e discussão	65
4.3.1 Caracterização físico-química das nanocápsulas poliméricas	65
4.3.1.1 Características organolépticas	65
4.3.1.2 Determinação do pH	66
4.3.1.3 Determinação do teor de DEX e eficiência de encapsulação	66
4.3.1.4 Determinação do diâmetro médio de partícula, distribuição granulométrica e índice de polidispersão	66
4.3.1.5 Determinação do potencial zeta (ξ)	69
4.3.1.6 Avaliação da morfologia das nanocápsulas	69
4.3.1.7 Avaliação de fenômenos de instabilidade física por espalhamento múltiplo de luz	71
4.3.2 Caracterização físico-química dos hidrogéis	72
4.3.3 Estudo de liberação <i>in vitro</i> da DEX a partir dos géis	77
5. CAPÍTULO 2. Partículas submicrométricas preparadas por atomização vibracional: obtenção, caracterização, e estudos <i>in vitro</i> de liberação, penetração e permeação cutânea	81
5.1 Introdução	83
5.2 Submicron polymeric particles prepared by vibrational spray-drying: semisolid formulation and skin penetration/permeation studies	85
6. DISCUSSÃO GERAL	123

7. CONCLUSÕES	131
8. REFERÊNCIAS	135
9. ANEXOS	147
9.1 ANEXO 1. Validação de método analítico de doseamento da DEX em formulações semissólidas	149
9.2 ANEXO 2. Validação de método analítico de doseamento da DEX no compartimento receptor dos estudos de liberação e permeação <i>in vitro</i>	159
9.3 ANEXO 3. Validação de método analítico de doseamento da DEX nos estudos de penetração cutânea <i>in vitro</i>	167

1. INTRODUÇÃO GERAL

Os corticóides tópicos constituem uma classe de fármacos amplamente empregada na área dermatológica para o tratamento de doenças de pele como a psoríase e a dermatite atópica devido a suas atividades anti-inflamatória, imunossupressora, vasoconstritora e anti-proliferativa (FERENCE e LAST, 2009; WIEDERSBERG et al., 2008). Sua eficácia assim como seus efeitos adversos estão bem documentados na literatura. Mesmo quando aplicados topicamente, esses fármacos podem causar efeitos locais e sistêmicos prejudiciais para o paciente. Os efeitos adversos locais mais importantes incluem a atrofia da pele, formação de vasos proeminentes e hipopigmentação (BELTRANI, BARSANTI e BIELORY, 2005).

Os principais desafios da terapia com corticóides tópicos incluem aumentar sua penetração e retenção nas camadas internas da pele, especialmente na epiderme viável e diminuir a sua absorção sistêmica (SENYIGIT E OZER, 2012). Para isso, eles precisam ultrapassar o estrato córneo, que é a etapa limitante para a penetração de qualquer substância exógena na pele (HARDING, 2004).

Nesse sentido, o desenvolvimento de formas farmacêuticas se faz necessário, de maneira a proporcionar a difusão do fármaco para fora do veículo, liberando-o para a superfície da pele e em seguida permitindo a sua penetração pela partição e difusão de uma camada para outra através da pele (DANIELS e KNIE, 2007). O processo de difusão do veículo também inclui sua liberação a partir de sistemas carreadores que veiculam o fármaco. Os veículos clássicos empregados para administração tópica de fármacos incluem pomadas, emulsões (loções ou cremes), géis hidrofílicos, espumas e aerossóis (SURBER e SMITH, 2005).

Sistemas de entrega de fármacos têm sido empregados para proporcionar liberação controlada e melhora da estabilidade dos fármacos, aumento de sua biodisponibilidade, modulação da penetração e permeação cutânea, aumento de sua eficácia e segurança (BECK, GUTERRES e POHLMANN, 2011; PAPAKOSTAS *et al.*, 2011). Dessa forma, encontra-se na literatura uma extensa quantidade de publicações sobre microemulsões, ciclodextrinas e, mais recentemente, micro e nanopartículas para liberação cutânea de fármacos

(BECK *et al.*, 2012; FOUAD *et al.*, 2013; GUTERRES *et al.*, 2007; LOPEZ *et al.*, 2000; NEUBERT, 2011; SANTOS *et al.*, 2013).

As nanopartículas são atualmente os carreadores em maior evidência para administração cutânea de fármacos, devido as suas características especiais como tamanho muito reduzido, propriedades químicas de superfície e melhora da solubilidade aparente de moléculas pouco solúveis em água. O aumento da área superficial resultado da redução drástica do tamanho de partícula pode aumentar o contato íntimo do fármaco com o estrato córneo e, conseqüentemente, aumentar sua penetração nas camadas adjacentes (ALVAREZ-ROMÁN *et al.*, 2004; JENNING *et al.*, 2000). Da mesma forma, nanocarreadores com carga de superfície positiva podem aumentar a aderência na superfície cutânea e o seu tempo de residência, contribuindo para diminuir a absorção sistêmica do fármaco (HASANOVIC *et al.*, 2009; SENYIGIT *et al.*, 2010).

As micro- e nanopartículas geralmente não penetram na pele pela via intercelular, sendo que a via folicular é considerada a via preferencial nesse caso (LADEMANN *et al.*, 2007). Cada vez mais estudos demonstram que essas partículas coloidais podem se acumular nos folículos pilosos e nos sulcos cutâneos, permitindo um acesso mais facilitado do fármaco para as camadas viáveis (PATZELT *et al.*, 2011; PROW *et al.*, 2011; VOGT *et al.*, 2005). Recentemente, Raber e colaboradores (2014) quantificaram a captação de nanopartículas de PLGA com diferentes recobrimentos de superfície marcadas com corante fluorescente, tanto em pele de orelha de porco quanto no antebraço de voluntários humanos, estabelecendo ótima correlação *in vitro-in vivo* entre os métodos. Foi observado que o recobrimento das nanopartículas de PLGA com fosfolipídios promoveu sua maior penetração nos folículos pilosos.

Uma das estratégias mais interessantes para diminuir os efeitos colaterais dos corticóides tópicos é aumentar sua localização e retenção nas camadas viáveis pele, sem aumento da permeação cutânea, possibilitando dessa maneira diminuir a dose requerida de administração e os riscos de absorção sistêmica. Dentre os corticóides tópicos, a dexametasona é um dos mais empregados para o tratamento de desordens cutâneas e tem sido utilizada como fármaco modelo em muitos estudos sobre liberação de fármacos na pele.

As nanocápsulas poliméricas, sistemas vesiculares contendo um núcleo oleoso envolto por uma parede polimérica, podem constituir uma ótima alternativa para atingir os objetivos descritos acima na terapia com corticóides tópicos. Nesse caminho, outras tecnologias de preparo de micro- e nanopartículas como a atomização vibracional, recentemente descrita, precisam ser estudadas para avaliar o seu potencial para superar todos os desafios nessa área.

De maneira a promover uma entrega controlada e vetorizada nas camadas viáveis da pele de corticóides tópicos como a DEX, as hipóteses levantadas neste trabalho foram: verificar se há influência do tipo de estrutura supramolecular na liberação do fármaco, qual a viabilidade de incorporar partículas submicrométricas preparadas por atomização vibracional em formulações semissólidas e qual a capacidade dessas partículas (poliméricas ou não) na entrega do fármaco nas diferentes camadas cutâneas.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver formulações semissólidas para uso tópico contendo dexametasona associada a partículas poliméricas para controle de liberação do fármaco, avaliando a sua permeação e penetração cutâneas *in vitro*.

2.2 Objetivos Específicos

- Preparar e avaliar as características físico-químicas de partículas submicrométricas obtidas por atomização vibracional e nanocápsulas poliméricas obtidas pelo método de nanoprecipitação contendo dexametasona;
- Preparar formulações semissólidas para uso tópico para incorporação de dexametasona associada à partículas submicrométricas (cremes) ou nanocápsulas poliméricas (hidrogéis) e avaliar suas características físico-químicas incluindo o seu comportamento reológico, em comparação às formulações contendo a dexametasona na forma livre (cremes e hidrogéis);
- Estudar a liberação *in vitro* da dexametasona a partir de formulações semissólidas contendo dexametasona associada a partículas submicrométricas poliméricas (cremes) ou nanocápsulas poliméricas (hidrogéis) comparando com formulações contendo o fármaco na forma livre;
- Avaliar a permeação e a penetração cutâneas *in vitro* da dexametasona a partir das formulações semissólidas contendo dexametasona associada às partículas submicrométricas, utilizando célula de Franz e pele abdominal de porco como membrana biológica.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Pele e vias de penetração cutânea

A pele, além de ser considerada o maior órgão humano por ocupar uma área de 2 m² e pesar cerca de 15 % do peso corporal, é formada por uma complexidade anatômica e bioquímica que a torna uma excelente barreira biológica (ELIAS e WAKEFIELD, 2011; MADISON, 2003). Anatomicamente, a pele é dividida em três camadas: a epiderme, a derme e o tecido subcutâneo ou hipoderme.

A epiderme é a camada mais superficial e é a responsável por formar a barreira que impede tanto a entrada de substâncias exógenas como microrganismos, agentes químicos e radiação solar, quanto a perda de água transepidermal (ELIAS e WAKEFIELD, 2011). Ela costuma ser dividida em duas outras subcamadas: o estrato córneo (EC) com espessura de 10-20 µm, e a epiderme viável (EV), com 50 – 100 µm (SELZER *et al.*, 2013). A renovação celular epidérmica ocorre através da migração e diferenciação dos queratinócitos desde a camada basal até a morte celular e consequente formação do EC, também chamado de camada córnea (MENON, 2002). As células mortas e queratinizadas do EC são então chamadas de corneócitos. Esse processo de diferenciação e proliferação celular deve ser equilibrado, caso contrário, seu excesso provoca desordens hiperproliferativas, enquanto a baixa atividade ocasiona afinamento e diminuição da proteção da pele. Células-tronco têm papel fundamental nesse processo homeostático, tanto de estratificação epidermal, quanto na formação de glândulas sebáceas e folículos pilosos (FUCHS, 2007). Existem outros tipos celulares na EV, como os melanócitos envolvidos no processo de melanogênese e as células de Langerhans que participam do sistema imunológico da pele (PARK *et al.*, 2009; POULIN *et al.*, 2007).

Os corneócitos estão cercados por um envelope celular formado por ligações cruzadas de proteínas e lipídeos ligados covalentemente (BOUWSTRA e HONEYWELL-NGUYEN, 2002). No seu espaço intercelular há ainda uma complexa composição lipídica na forma de bicamadas lipídicas lamelares. Os principais tipos de lipídeos são as ceramidas, o colesterol e os ácidos graxos livres (JUNGERSTED *et al.*, 2008; BOUWSTRA *et al.*, 1998). Os corneócitos e os lipídios intercelulares do EC formam um modelo bicompartimental e costumam ser comparados a uma organização de uma parede (“*brick and mortar*”) onde os tijolos são os corneócitos e

o cimento são as bicamadas lipídicas (MENON, 2002). O EC é composto por complexos processos bioquímicos como enzimas precursoras de lipídios, proteases envolvidas no processo de descamação e peptídeos com ação antimicrobiana (β -defensinas) (ELIAS, 2005; OREN *et al.*, 2003). No entanto, o modelo da organização de parede do EC não inclui os folículos pilosos e as glândulas sudoríparas que surgem na porção inferior da derme e também terminam na epiderme, liberando sebo e suor na superfície cutânea (SELZER *et al.*, 2013).

A derme é o tecido conjuntivo subjacente e que sustenta a epiderme. Próxima à epiderme localiza-se a derme papilar e mais profundamente a derme reticular. Nessa camada são encontrados os fibroblastos, células responsáveis pela produção dos principais constituintes da matriz extracelular, o colágeno, a elastina e os glicosaminoglicanos (MURTHY, 2011; FARAGE *et al.*, 2008). Além disso, nessa camada são encontrados diversos íons e uma grande quantidade de água. É na derme que se localiza a microcirculação sanguínea, além dos vasos linfáticos, que vascularizam a epiderme. Também é nesta camada que se encontram os nervos responsáveis pelas funções sensoriais da pele.

A penetração e difusão do fármaco nas camadas da pele podem ocorrer através de três vias (EL MAGHRABYA, BARRYC e WILLIAMS, 2008), sendo o EC o passo limitante para a penetração e absorção percutânea:

- ✓ Via intercelular: o fármaco difunde-se entre os corneócitos, através da matriz lipídica dos espaços intercelulares. Essa se constitui, geralmente, na principal via de penetração de fármacos;
- ✓ Via transcelular ou intracelular: nesse caso o fármaco deve se difundir tanto pelo ambiente lipofílico (lipídios intercelulares) quanto hidrofílico (corneócitos/queratinócitos);
- ✓ Via transfolicular: é a via em que o fármaco penetra nas camadas da pele através dos folículos pilosos, das glândulas sebáceas e sudoríparas.

Apesar de constituir cerca de apenas 0,1% da área superficial cutânea, a via transfolicular tem sido considerada atualmente uma alternativa e muitas vezes uma estratégia para liberação de fármacos (MEIDAN, BONNER e MICHNIAK, 2005; VOGT *et al.*, 2005). Esta tem sido uma das vias estudadas para a penetração de micro e nanopartículas nas camadas cutâneas e tem sido relatada como um

reservatório desses carreadores, permitindo a entrega controlada de fármacos (PATZELT *et al.*, 2011; PROW *et al.*, 2011; TOLL *et al.*, 2004).

A permeação cutânea de um fármaco é influenciada pelas características físico-químicas da molécula (peso molecular, lipofilia/hidrofilia, grau de ionização), pela natureza do veículo e/ou carreador, pela região do corpo, pela idade, pela integridade do tecido cutâneo (se encontra-se saudável, acometido por alguma doença ou danificado por agentes físicos e/ou químicos), pela temperatura da pele e pelo estresse físico (massagem) (ALEXANDER *et al.*, 2012; TINKLE *et al.*, 2003; GENINA *et al.*, 2002).

Além de todas as considerações acima descritas, o fármaco deve ser primeiramente liberado a partir do veículo ou forma farmacêutica para que esteja disponível para penetração e/ou permeação na pele (DANIELS e KNIE, 2007). Se estiver veiculado em um carreador como uma nanopartícula, ele deve ser também liberado desse sistema. Só então ele poderá se difundir e penetrar no EC e posteriormente se particionar do EC para a epiderme viável e/ou derme (WIEDERSBERG, LEOPOLD e GUY, 2008). Se atingir a microcirculação cutânea, ele ainda pode ser absorvido sistemicamente atingindo outros órgãos do corpo. Esse último caso é o objetivo de sistemas transdérmicos de liberação, que permitem a absorção percutânea (ALEXANDER *et al.*, 2012). No entanto, em se tratando de ação tópica, o fármaco deve agir localmente na pele, sem risco de absorção pela circulação sanguínea.

3.2 Corticóides tópicos e dexametasona

Medicamentos tópicos contendo glicocorticoides são frequentemente prescritos por dermatologistas devido a sua efetividade no tratamento de doenças de pele, como psoríase e dermatite atópica. Sua aplicação clínica está relacionada a seus efeitos anti-inflamatórios, vasoconstritores, imunossupressores e antiproliferativos (WIEDERSBERG, LEOPOLD e GUY, 2008).

A DEX é um glicocorticoide obtido sinteticamente com baixa solubilidade em água (100 µg/mL) (HUUSKONEN *et al.*, 1997) cuja estrutura química é mostrada na Figura 1. Pode ser encontrada na forma livre (base), acetato (éster) ou fosfato de sódio e tem sido utilizada clinicamente como fármaco anti-inflamatório e agente

imunossupressor no tratamento de diversas desordens cutâneas, como dermatite atópica, psoríase, dermatite eczematosa e acne rosácea (BURKHOLDER, 2000).

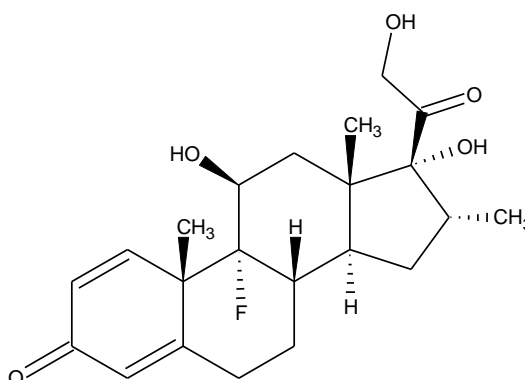


Figura 3.1. Estrutura química da dexametasona (PM = 392,47 g/mol).

A intensidade do efeito clínico dos corticóides tópicos (CT) é avaliada através de sua potência. Como os CT provocam um efeito vasoconstritor na microcirculação cutânea, o teste padrão ouro para avaliar sua potência é o ensaio de vasoconstrição ou branqueamento da pele (*skin-blanching assay*) (SMIT, NEUMANN e THIO, 2012). Esse ensaio mensura o efeito branqueador na pele após a aplicação de uma formulação no antebraço de voluntários saudáveis. O branqueamento pode ser avaliado visualmente por pessoas treinadas ou através de medidas colorimétricas usando equipamentos apropriados que mensuram o sistema de coloração $L^* a^* b^*$ como o Chroma Meter. A *Food and Drug Administration* (FDA) dos EUA recomenda esta metodologia para ensaios de bioequivalência de formulações de uso tópico contendo corticóides (GUIDANCE, 1995). A medida colorimétrica para avaliar a potência na pele de animais também tem sido reportada na literatura (ISHII *et al.*, 2012).

A potência dos CT, segundo a classificação americana, inclui sete grupos de potência, enquanto que a classificação britânica possui quatro grupos (WIEDERSBERG, LEOPOLD e GUY, 2008). Dentro de um grupo, os CT possuem eficácia similar e também potencial similar de causar efeitos adversos. A DEX é classificada no grupo “Suave” e indicada na dose de 0,01 a 0,1 % (p/v) de acordo com a classificação britânica. Só para comparar, a hidrocortisona e a prednisolona que estão no mesmo grupo, são indicadas em concentração superior, 1,0 e 0,5 % (p/v), respectivamente (SENYIGIT e OZER, 2012). Por outro lado, na classificação americana a DEX é classificada no grupo VII (menos potente) juntamente com a hidrocortisona, prednisolona e metilprednisolona. Os CT de baixa potência como a

DEX são mais indicados para tratamento prolongado ou para áreas sensíveis como as regiões periorbital, axilar e virilha (BELTRANI *et al.*, 2005). CT de alta potência são indicados para períodos de tratamento curtos ou regiões de difícil penetração, como mãos e sola dos pés (BRAZZINI e PIMPINELLI, 2002).

A potência dos CT está relacionada, além da estrutura química da molécula, ao veículo e à área de aplicação. Os veículos são uma estratégia bastante interessante para modificar a potência dos CT, podendo aumentar a penetração do fármaco e sua biodisponibilidade movendo sua classificação para cima ou para baixo (WIEDERSBERG *et al.*, 2008). Os veículos para incorporação dos fármacos podem ser pomadas, cremes, loções, géis, espumas e aerossóis. Geralmente, em função do efeito oclusivo, as pomadas aumentam a hidratação e conseqüentemente a penetração e eficácia dos CT (SENYIGIT e OZER, 2012). No entanto, esses veículos são muito gordurosos e tem baixa adesão pelo paciente. Cremes e géis são formulações com excelente aceitação, porém novos veículos também têm surgido no mercado com resultados bastante promissores (FERENCE e LAST, 2009). Stein (2005) publicou estudo clínico de espumas de valerato de betametasona e propionato de clobetasol para tratamento da psoríase no couro cabeludo ou outras regiões, demonstrando que essas formulações apresentaram menor número de efeitos adversos e excelente aceitação pelos pacientes em comparação com veículos convencionais.

A DEX, assim como outros CT, possui dois importantes efeitos farmacológicos para o tratamento de doenças proliferativas, como a psoríase. A ação antiproliferativa, que ocorre a partir da redução da atividade mitótica epidérmica e a ação atrofogênica, responsável pela inibição da proliferação dos fibroblastos dérmicos. No entanto, durante o uso prolongado, altas doses e dependendo do local de aplicação, esses efeitos podem ser prejudiciais (BELTRANI *et al.*, 2005). A nível molecular, os CT, ao se ligarem aos receptores celulares no citoplasma das células, são transportados para o núcleo, afetando a transcrição gênica (FEDERMAN *et al.*, 1999).

Entretanto, um dos maiores problemas do uso dos CT são seus efeitos adversos, tanto locais quanto sistêmicos (HENGEE *et al.*, 2006). Os principais efeitos sistêmicos são: supressão do eixo hipotálamo-pituitário e adrenal; síndrome de Cushing; agravamento da diabetes mellitus; hipertensão; e osteoporose. Mesmo

na aplicação tópica, os CT podem ser absorvidos atingindo a microcirculação cutânea e, conseqüentemente a via sistêmica. No entanto, os efeitos adversos locais decorrentes do tratamento tópico dos CT são os que ocorrem com maior frequência, tais como: atrofia (afinamento epidérmico e dérmico devido ação supressora na proliferação celular e inibição da síntese de colágeno); telangiectasia (dilatação anormal dos vasos sanguíneos); estrias por distensão cutânea; hipopigmentação; Indução ou exacerbação de acne (“acne esteroide”); e retardamento na cicatrização de feridas (HENGGE *et al.*, 2006; SCHÄCKE, DÖCKE e ASADULLAH, 2002).

3.3 Micro e nanopartículas como sistemas de liberação de fármacos na pele

Os sistemas coloidais incluem uma série de carreadores de fármacos na escala micro e nanométrica, como lipossomas, nano e microesferas, nanocápsulas, nanoemulsões, microemulsões e nanopartículas lipídicas sólidas (POLETTI *et al.*, 2011; KUMARI, YADAV e YADAV, 2010; MONTENEGRO *et al.*, 2012). Os carreadores citados são classificados como solúveis e/ou biodegradáveis, e são geralmente formados por materiais biodegradáveis e biocompatíveis possuindo, portanto, um potencial muito amplo de aplicação na vetorização de fármacos para as mais diversas vias de administração além de baixa toxicidade, ao contrário das nanopartículas insolúveis e/ou biopersistentes (nanopartículas metálicas, *quantum dotz* e fulerenos), que exigem uma avaliação de risco minuciosa e rigorosa (PROW *et al.*, 2011). Dessa forma, os sistemas nano e microparticulados têm sido objeto de pesquisa e desenvolvimento de novos produtos para a administração tópica ou ainda como sistemas de liberação transdérmicos (CEVC e VIERL, 2010).

As vantagens desses carreadores incluem a liberação controlada e prolongada de fármacos (JÄGER *et al.*, 2009; KUMARI, YADAV e YADAV, 2010), sua vetorização em sítios específicos da pele (possibilitando aumentar a penetração nas camadas cutâneas ou aumentar o tempo de residência na superfície da pele) (CONTRI *et al.*, 2013; MONTENEGRO *et al.*, 2012; SIQUEIRA *et al.*, 2011), melhora da estabilidade do fármaco (OURIQUE *et al.*, 2011; PAESE *et al.*, 2009), aumento da eficácia da formulação (DESAI *et al.*, 2013), além do potencial em reduzir a toxicidade aumentando o seu índice terapêutico (ZHANG *et al.*, 2008).

O uso de polímeros biodegradáveis como os poliésteres (poli-epsilon-caprolactona, poli(ácido láctico), poli(ácido glicólico) e seus copolímeros e polissacarídeos catiônicos (quitosana) são objeto de pesquisa para obtenção de micro e nanopartículas poliméricas. Os métodos de preparação dessas partículas incluem a polimerização *in situ* dos monômeros, a deposição interfacial do polímero pré-formado, a emulsificação-difusão e o *salting out* (FRIEDRICH *et al.*, 2008; JÄGER *et al.*, 2009; KUMARI *et al.*, 2010; PINTO REIS *et al.*, 2006).

As nanopartículas poliméricas são sistemas carreadores de fármacos com tamanho na ordem submicrométrica. Podem ser de dois tipos, dependendo de sua morfologia e constituição físico-química: nanocápsulas e nanoesferas. Nanocápsulas poliméricas são sistemas vesiculares formados por um núcleo oleoso e revestidos por um invólucro polimérico enquanto as nanoesferas são sistemas matriciais constituídos por uma rede polimérica (COUVREUR *et al.*, 2002; MORA-HUERTAS, FESSI e ELAISSARI, 2010; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). No caso das nanocápsulas, o fármaco pode estar dissolvido no núcleo ou adsorvido na interface e das nanoesferas o fármaco pode ficar retido ou adsorvido na matriz polimérica (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

Nanocápsulas de núcleo lipídico ou *lipid core nanocapsules* (LNC) foram recentemente desenvolvidas e são formadas por um lipídio sólido, como por exemplo o monoestearato de sorbitano disperso no óleo do núcleo oleoso, por sua vez revestido por uma parede polimérica (JÄGER *et al.*, 2009). As proporções de lipídio sólido (monoestearato de sorbitano – MS), óleo (triglicerídios de cadeia média – TCM) e polímero (poli-epsilon-caprolactona – PCL) foram otimizadas por VENTURINI e colaboradores em 2011. Mantendo fixa a concentração do polímero e diminuindo as concentrações do MS e do TCM os autores obtiveram a formação de estruturas vesiculares com organização e tamanho de partícula otimizados (1:4,1:2,6 (m/m) do MS, TCM e PCL, respectivamente). O espalhamento múltiplo de luz (Turbiscan Lab[®]) foi utilizado para avaliar e demonstrar a estabilidade física desses sistemas coloidais. Essa composição e estrutura das LNC originam propriedades mecânicas como rigidez diferentes das nanocápsulas convencionais (FIEL *et al.*, 2011).

Na literatura pode ser encontrada uma extensa variedade de vantagens do emprego de micro e nanopartículas como sistemas de liberação de fármacos para

administração cutânea. Ourique e colaboradores (2012) avaliaram a fotoestabilidade e a penetração cutânea *in vitro* de hidrogéis contendo tretinoína encapsulada em nanocápsulas de núcleo lipídico. Foi observado que a nanoencapsulação protegeu o fármaco da degradação frente à radiação UVA além de aumentar o seu tempo de residência na superfície da pele, quando comparada à formulação com tretinoína não encapsulada. Campbell e colaboradores (2012) estudaram a penetração na pele de nanoesferas de poliestireno (20 a 200 nm) marcadas por fluorescência através de microscopia de laser confocal. Após 16 horas decorrentes da aplicação cutânea, tanto em pele íntegra quanto em pele com a barreira comprometida (depois de repetidas aplicações de *tape stripping* no EC), as nanopartículas poliméricas penetraram somente na sua superfície (aproximadamente 3 µm de profundidade na camada córnea). No entanto, os nanocarreadores, dependendo de seu tamanho e natureza, podem atuar como reservatórios na superfície e/ou nos folículos e sulcos cutâneos, possibilitando a liberação controlada de fármacos ao longo do tempo (PARK, 2012).

A técnica de *tape-stripping* usando cianoacrilatos na superfície cutânea tem sido empregada para avaliar a penetração de fármacos e partículas nos folículos pilosos (TEICHMANN *et al.*, 2005). Microesferas fluorescentes de tamanho variando de 0,75 a 6 µm foram estudadas empregando essa técnica. Biópsias de pele foram avaliadas e se demonstrou que micropartículas com tamanho de 1,5 µm se localizaram em 55 % da via folicular, com penetração de até 2.300 µm de profundidade (TOLL *et al.*, 2004).

Mak e colaboradores (2012) demonstraram que a combinação de dois tipos de partículas de tamanhos aproximados de 520 nm provocaram a liberação do fármaco modelo (isotianato de fluoresceína) especificamente no interior dos folículos pilosos. Partículas de carbonato de cálcio carregadas de proteases e marcadas com rodamina foram combinadas com partículas de albumina sérica bovina carreadoras do fármaco (1:1) e avaliadas por microscopia de fluorescência em pele de orelha de porco, após 1 minuto de massagem e decorridos 60 minutos da aplicação. Foi observado que, além do fármaco se distribuir em toda a extensão do folículo, ele conseguiu se localizar nas glândulas sebáceas, mostrando que a combinação das partículas é uma abordagem promissora para o tratamento de doenças dermatológicas.

Em relação à encapsulação da DEX em nanopartículas, há poucos estudos avaliando sua retenção e permeação cutânea. Em 1997, Cevc, Blume e Schätzlein avaliaram a biodisponibilidade e farmacocinética de vesículas lipídicas altamente deformáveis (Transfersomas[®]) contendo CT como a DEX após aplicação cutânea em camundongos. Doses altas dos carreadores promoveram aumento da sua permeação, sendo comparáveis a uma injeção subcutânea. Esses carreadores contendo DEX ou hidrocortisona foram posteriormente estudados por Cevc e Blume (2004). Em estudo *in vitro* de penetração em pele de porco, foi observado um acúmulo da DEX a partir do carreador, significativamente superior a uma formulação comercial (creme). Além disso, em estudos *in vivo* em modelo de edema de orelha de camundongos, os carreadores proporcionaram atividade mais rápida e mais prolongada que os veículos convencionais além de proporcionarem redução da dose administrada.

3.4 Atomização vibracional ou *Nano Spray Drying*

Em 2010, a empresa suíça BÜCHI Labortechnik AG (Flawil, Suíça) introduziu no mercado uma nova geração de secadores por aspersão em escala laboratorial, o Nano Spray Dryer B-90[®]. Este equipamento emprega uma tecnologia de atomização vibracional através de um dispositivo piezoelétrico que permite a conversão de soluções, suspensões ou emulsões em partículas secas com estreita faixa de tamanho, em apenas uma única etapa (BÜCHI, 2009; HENG *et al.*, 2011).

De uma maneira geral, o equipamento pode ser dividido em três partes principais (Figura 3.4): o atomizador, a câmara de secagem e o coletor eletrostático de partículas.

O atomizador é composto por um dispositivo do tipo cristal piezoelétrico que, quando conduzido a uma frequência ultrassônica de 60 Hz, produz intensa vibração em uma membrana de aço inoxidável com tamanho de poro definido e bastante pequeno, permitindo a formação de um fino aerossol de gotículas de tamanho muito reduzido e controlado (BÜCHI, 2009). As membranas (*spray caps*) disponíveis comercialmente são três, de acordo com o tamanho da abertura do *mesh*: 4,0; 5,5 e 7,0 μm . Geralmente, quanto menor o tamanho de poro da membrana, menor será o tamanho das gotículas geradas pelo spray e conseqüentemente, menor será o

tamanho das partículas secas obtidas (BABA e NISHIDA, 2013; SCHAFROTH *et al.*, 2012). Segundo HENG e colaboradores (2011), podem ser obtidas partículas de tamanhos variando de 300 nm até 5 μm . O desenho do atomizador (cabeça de pulverização ou *spray head*) foi baseado nos nebulizadores que convertem líquidos em gotículas respiráveis para administração pulmonar, utilizadas no tratamento de asma. O equipamento só pode operar com a passagem de líquidos de até 10 cPs de viscosidade.

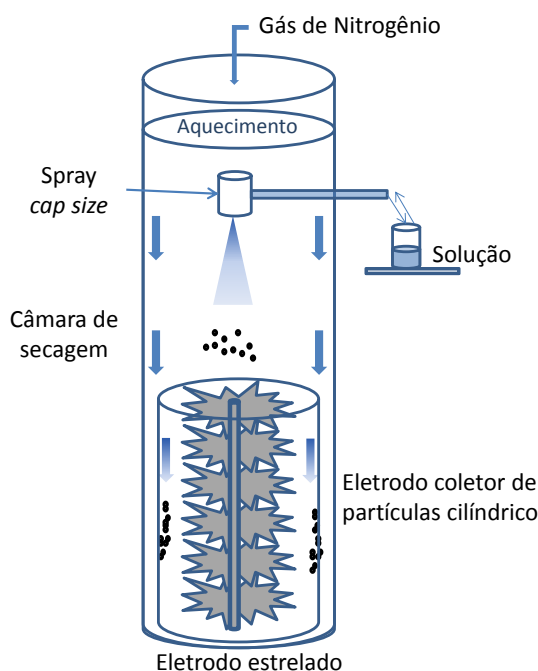


Figura 3.4 Esquema da técnica de secagem vibracional com o Nano Spray Dryer B-90[®] (BÜCHI Labortechnik AG, Flawil, Suíça).

Através de um fluxo de ar laminar e aquecimento, o solvente é removido das gotículas geradas pelo spray durante a passagem pela câmara de secagem. Podem ser empregados como gases oxigênio (para soluções aquosas) ou um gás inerte, como o nitrogênio (para soluções orgânicas ou misturas destas com água). No primeiro caso, o equipamento opera no modo aberto e no segundo caso, no modo fechado. O fluxo laminar permite uma secagem suave de fármacos termonsensíveis e ainda previne a deposição de partículas na parede de vidro da câmara de secagem (SCHMID, ARPAGAUS e FRIESS, 2010).

Finalmente, a alta eficiência na coleta das partículas secas obtidas no Nano Spray Dryer B-90[®] se deve ao mecanismo de coleta por precipitação eletrostática. Nesse processo de coleta, uma voltagem bastante alta é aplicada entre dois

eletrodos – o eletrodo estrelado (cátodo) e o eletrodo coletor de partícula cilíndrico (ânodo) – gerando um campo eletrostático que ocasiona a deposição de partículas negativamente carregadas na parede do cilindro. Enquanto que nos *sprays dryers* convencionais são obtidos rendimentos de até 50%, na atomização vibracional os rendimentos variam de 60 a até 90%. Este processo também permite coletar partículas de tamanho muito pequeno, enquanto que no processo convencional de secagem por aspersão, as partículas de tamanho reduzido não são separadas adequadamente nos ciclones coletores e ficam aderidas na torre de secagem. Além disso, há grande perda de massa no processo, diminuindo o rendimento do pó coletado, especialmente em escala laboratorial (PRINN, COSTANTINO e TRACY, 2002). No Nano Spray Dryer B-90[®], ao final do processo, o pó aderido à parede cilíndrica do coletor eletrostático é retirado através de uma espátula e possibilita alto rendimento (de 70 a 90 %), mesmo com baixas concentrações de sólidos na solução de partida (HENG *et al.*, 2011).

Diversos parâmetros de processo podem ser alterados para proporcionar a obtenção de diferentes tipos de partículas empregando esse processo, com características e aplicações distintas: temperatura; taxa de pulverização; taxa de fluxo do gás; membranas ou *spray cap* (ARPAGAUS, 2012).

A temperatura de entrada (*inlet temperature*) do equipamento pode atingir até 120°C e influencia diretamente a temperatura de saída (*outlet temperature*). De acordo com diversos estudos, a temperatura de entrada normalmente não provoca grandes variações nas características das partículas obtidas, pois o tempo de residência médio no atomizador e na câmara de secagem é muito baixo. SCHMID e colaboradores (2009) não verificaram variações significativas no tamanho de partícula quando diferentes temperaturas de entrada foram comparadas (60, 80 e 100°C) para a preparação de partículas de trealose com ou sem tensoativo. Da mesma forma, LEE e colaboradores (2011) relataram mínima influência na morfologia das partículas, de acordo com imagens obtidas por MEV. No entanto, BÜRKI e colaboradores (2011) verificaram, em um estudo fatorial, que a temperatura de entrada máxima (120°C) ocasionou perda da atividade enzimática da β -galactosidase quando comparada com temperaturas inferiores (80 e 100°C), além de menor rendimento de processo.

Um dos fatores de maior influência no tamanho de partícula é o tamanho do *mesh* da membrana. Partículas na escala submicrométrica geralmente são obtidas utilizando a membrana de 4,0 μm . SCHAFROTH e colaboradores (2012) observaram que houve diferença no rendimento e no tamanho de partícula ao compararem a membrana de 5,5 μm com a de 4,0 μm durante a preparação de partículas de PLGA carregadas de ciclosporina ou dexametasona. Rendimentos menores foram obtidos para a membrana de menor tamanho de poro.

As soluções, suspensões ou dispersões utilizadas como amostras de partida neste processo são previamente preparadas e em seguida alimentam o equipamento através de uma bomba peristáltica que leva o líquido até a cabeça do spray, onde está a membrana, para atomização e posterior secagem. O líquido pode conter um solvente ou mistura de solventes, materiais poliméricos, excipientes, fármacos e/ou outros adjuvantes (BÜCHI, 2009; HENG *et al.*, 2011). Obviamente, a composição quali-quantitativa das formulações de partida poderão influenciar as características físico-químicas e a performance das partículas obtidas.

A influência da composição de solventes e de excipientes farmacêuticos empregando como fármacos modelo a griseofulvina, a benzocaína e o ácido salicílico foram previamente estudadas (SCHMID, ARPAGAUSS e FRIESS, 2011). Fixando parâmetros como *mesh* de membrana e temperatura de entrada, foi variado o tipo de solvente orgânico utilizado na preparação das soluções dos fármacos e sua influência na qualidade e características dos pós finais. Por exemplo, a griseofulvina dissolvida em acetona resultou na formação de crostas no bico do atomizador além de grumos no pó coletado, enquanto que quando dissolvida em uma mistura de metanol/acetona (80:20, v/v) isso não foi observado. Por outro lado, o ácido salicílico dissolvido em acetona não formou crostas, enquanto que em acetato de etila ocorreu essa formação. Da mesma forma, excipientes com características higroscópicas como a trealose resultam em pós com teor de umidade maior quando comparados com sais. Apesar de variações no teor de sólidos das soluções primárias não provocarem alterações no tamanho de gotícula gerada pelo atomizador para diferentes concentrações de trealose (0,1; 1,0 e 10,0 %), a menor concentração do excipiente resultou em menor tamanho de partículas sólidas após a secagem.

BÜRKI e colaboradores (2011) também estudaram a influência da concentração do solvente (etanol) e dos parâmetros tamanho de *mesh* da membrana e a temperatura de entrada, no rendimento do pó, tamanho de partícula, span e atividade enzimática de soluções da proteína β -Galactosidase estabilizadas com trealose. Os melhores rendimentos foram obtidos com a solução de maior concentração de etanol, os menores *meshs* de membrana e a menor temperatura de entrada.

A influência do tipo de polímero (amido modificado, álcool polivinílico, goma arábica, maltodextrina e proteína de soro) em três níveis de concentração (solução aquosa a 0,1; 1,0 e 10,0 %) foi estudada na preparação de partículas submicrométricas por LI e colaboradores (2010). Na concentração 0,1% de goma arábica ocorreu a formação de partículas de tamanho menor (353 nm) e menor desvio-padrão (107 nm) enquanto que observou-se um aumento no tamanho de partícula e no desvio-padrão de 581 ± 363 nm e 589 ± 545 nm, nas concentrações de 1,0 e de 10,0%, respectivamente. Foi demonstrado também o potencial do uso da atomização vibracional para encapsulação de lipídios a partir de nanoemulsões obtidas por processo de emulsificação de baixa energia empregando acetato de tocoferol como modelo de fase oleosa.

A obtenção de nanocristais por atomização vibracional também foi investigada, já que estes também são considerados sistemas de liberação de fármacos com propriedades de interesse na nanomedicina (LI *et al.*, 2010). Foram produzidos nanocristais empregando cloreto de sódio e furosemida como substâncias modelo, sem adição de polímeros ou excipientes. Tanto para o sal quanto para a furosemida, foram obtidos pós com aparência homogênea. Após a atomização vibracional da furosemida dissolvida em acetona a 1,25 %, obteve-se um pó de nanocristais de formato esférico com tamanho médio de $1,24 \pm 0,48$ μ m, de acordo com imagens obtidas por MEV, mostrando potencial como sistema de liberação na área farmacêutica.

Baba e Nishida (2013) prepararam nanocristais de dexametasona e fluorometolona com potencial uso como colírios para tratamento de doenças oftálmicas. Para isso, foram preparadas soluções etanólicas dos fármacos (10 mg/mL para a dexametasona e 1 mg/mL para a fluorometolona) que foram submetidas à atomização vibracional utilizando os três tipos de membranas

disponíveis (4,0; 5,5 e 7,0 μm). Como esperado, os pós apresentaram menor tamanho de partícula para o menor mesh e maior tamanho para o maior mesh. Foram obtidos pós de DEX com tamanho de partícula de 833 ± 402 nm, 1118 ± 573 nm e 1344 ± 857 nm, para os tamanhos de abertura de mesh de 4,0, 5,5 e 7,0 μm , respectivamente. Similarmente, para os nanocristais de fluorometalona obteve-se tamanho médio de partícula de 620 ± 268 , 795 ± 285 e 856 ± 344 nm para os tamanhos de abertura de mesh de 4,0, 5,5 e 7,0 μm , respectivamente. O maior tamanho de partícula observado para os nanocristais de dexametasona pode ser atribuído a maior concentração do fármaco na solução primária, que resulta na preparação de partículas maiores. A natureza cristalina das partículas foi confirmada pela difração de raios-X de pós. No entanto, não foram realizados ensaios de liberação dos fármacos ou estudos para avaliar a eficácia no tratamento de desordens oftalmológicas.

O emprego do Nano Spray Dryer[®] para o preparo de nanocristais também se estende para outras áreas além da nanomedicina. SUN e colaboradores (2011) prepararam nanocristais esféricos de carbonato de lítio com potencial uso como baterias de lítio para telefones celulares, carros elétricos e notebooks. Nesse estudo, dois *spray dryers* de escala laboratorial, um baseado na geração de gotículas em um bico de dois fluidos (Shanghai SY-6000[®]) e outro baseado na atomização vibracional (Nano Spray Dryer B-90[®]) foram utilizados para obtenção dos pós ultrafinos. A técnica de atomização vibracional demonstrou melhor performance na redução do tamanho de partícula dos nanocristais – de aproximadamente 4 μm – do que os pós preparados pelo SY-6000[®] (aproximadamente o dobro de tamanho).

Como forma alternativa ao uso de antibióticos para o tratamento de infecções pulmonares, MATINKHOO e colaboradores (2011) avaliaram a viabilidade de preparar pós inaláveis a partir de bacteriófagos contornando a inatividade de antibióticos no caso de cepas resistentes. Diferentes espécies de bacteriófagos da família *Myoviridae* foram associados à trealose, leucina e/ou tensoativos. As respectivas soluções primárias preparadas foram submetidas à atomização vibracional empregando membrana de 4 μm , fluxo de ar de 100 L/min e temperatura de entrada de 75°C. Essa estratégia mostrou-se viável, pois o Nano Spray Dryer[®] permitiu o uso de temperaturas baixas e a secagem das gotículas geradas ocorreu de maneira rápida e branda. As partículas obtidas apresentaram formato esférico e,

aquelas obtidas com as combinações de leucina/trealose e leucina/trealose/caseína, apresentaram superfície com pronunciada rugosidade, que pode facilitar a dispersibilidade. A dispersibilidade é uma propriedade importante em dispositivos de administração pulmonar de pós inaláveis, pois indica o grau de dispersão ou desaglomeração do pó em partículas individuais ou aglomerados de tamanho menor após a aplicação de uma força (VEHRING, 2008).

Durli e colaboradores (2013) avaliaram a influência do tipo de solvente e do tensoativo nas propriedades de partículas submicrométricas de DEX obtidos por atomização vibracional e sem uso de polímero. Os melhores resultados de rendimento de pó foram obtidos para soluções orgânicas de menor viscosidade e maior tensão superficial. Dentre os solventes testados, a acetona promoveu a maior diminuição da tensão superficial, facilitando a passagem da solução orgânica no atomizador e a formação de um jato fino de gotículas. Dentre os tensoativos avaliados, os de natureza iônica (lauril sulfato de sódio e cloreto de cetil trimetil amônio) possibilitaram a obtenção de maiores rendimentos de pós (> 60%), quando comparados ao tensoativo não-iônico (Poloxamer 188). Isso pode ser atribuído pela melhora na deposição eletrostática das partículas quando são empregados tensoativos com cargas.

Recentemente nosso grupo de pesquisa desenvolveu pós inaláveis de partículas poliméricas submicrométricas contendo como fármaco a DEX para administração pela via pulmonar (FONTANA *et al.*, 2013). Os parâmetros de processo e diferentes composições da solução orgânica de partida foram estudados até a obtenção de uma formulação otimizada. A solução orgânica (acetona:água 20:1, v/v) contendo PCL, DEX e deoxicolato de sódio foi empregada com sucesso em uma única etapa aplicando a técnica de secagem vibracional para obtenção dos pós. As partículas submicrométricas apresentaram diâmetro médio inferior a 1 μm e a difratometria de raios-X demonstrou a estrutura cristalina das partículas. De acordo com o estudo de liberação *in vitro* (método do saco de diálise), o pó com a menor proporção fármaco:polímero (1:1, p/p) foi capaz de promover melhor controle da liberação da DEX. Os pós demonstraram uniformidade da dose próximo a 100% e diâmetro aerodinâmico médio inferior a 5 μm . O estudo empregando o impactador de cascata de Andersen demonstrou que a fração respirável do pó obtido foi maior

que 40% revelando que as partículas poliméricas submicrométricas são uma estratégia promissora para a rota pulmonar.

A tabela 3.4 apresenta os diferentes tipos de partículas micro- e submicrométricas estudadas empregando a técnica de atomização vibracional, assim como os fármacos e materiais poliméricos utilizados e o potencial de aplicação, relacionado à via de administração.

Tabela 3.4 Tipos de partículas preparadas por atomização vibracional e vias de administração

Preparação	Fármaco/Polímero	Via de administração	Referência
Nanopartículas	Furosemida/ 5 polímeros	Diversas	Li <i>et al.</i> , 2010
Nanopartículas	Albumina sérica	Diversas	Lee et al, 2010
Pó inalável	β -galactosidase	Pulmonar	Bürki <i>et al.</i> , 2011
Partículas poliméricas	Sildenafil/PLGA	Pulmonar	Beck-Broichsitter <i>et al.</i> , 2011
Pó inalável	Bacteriófagos	Pulmonar	Matinkhoo <i>et al.</i> , 2011
Nanopartículas poliméricas	Ciclosporina e dexametasona/PLGA	n.e.	Schafroth et al., 2012
Nanopartículas amorfas	Nicergolina	Oral	Materna et al., 2012
Nanocristais	Fluorometolona e dexametasona	Ocular	Baba & Nishida, 2013
Pó inalável	Oleato de capreomicina	Pulmonar	Schoubben <i>et al.</i> , 2013
Partículas submicrométricas	Dexametasona	n.e.	Durli <i>et al.</i> , 2013
Nanopartículas	Amoxicilina/gelatina	Oral	Harsha <i>et al.</i> , 2013
Micropartículas poliméricas	Nimodipina/PLGA	Cerebral	Bege <i>etal.</i> , 2013
Microesferas	Carboplatina/gelatina	Pulmonar	Harsha et al., 2014
Partículas submicrométricas	Dexametasona	Pulmonar	Fontana <i>et al.</i> , 2014

4. CAPÍTULO 1

Hidrogéis tópicos contendo dexametasona associada a nanocápsulas poliméricas: preparação, caracterização e liberação *in vitro*

4.1 Introdução

A abordagem deste capítulo consiste em avaliar uma possível modulação da liberação *in vitro* da dexametasona (DEX) a partir de dois tipos de nanocápsulas (NC) poliméricas (superfície aniônica e catiônica) quando veiculadas em formulações semissólidas.

Anteriormente, a liberação *in vitro* de DEX associada à nanocápsulas poliméricas de PCL incorporadas em hidrogéis para uso tópico foi estudada (MARCHIORI *et al.*, 2010). Em ensaios empregando células de difusão de Franz e membranas de acetato de celulose, a nanoencapsulação promoveu uma liberação sustentada da DEX. Além disso, as NC contendo DEX apresentaram melhor atividade antiproliferativa em comparação ao fármaco livre, de acordo com ensaios de citotoxicidade *in vivo* empregando o modelo do *Allium cepa*, o que demonstrou seu potencial no tratamento de doenças proliferativas como a psoríase.

Os polímeros poli (ϵ -caprolactona) (PCL) e Eudragit® RS100 são descritos na literatura para a preparação de micro- e nanopartículas poliméricas podendo promover a liberação controlada de fármacos (POHLMANN *et al.*, 2013; JOSHI, 2013; SANTOS *et al.*, 2013).

Nesse contexto, a motivação do presente capítulo foi produzir e comparar NC poliméricas com superfície catiônica (NC+) e aniônica (NC-) quanto às suas características físico-químicas e o seu comportamento quanto à liberação *in vitro* da DEX a partir de hidrogéis. A técnica de preparação empregada foi a deposição interfacial do polímero pré-formado. Neste caso, foram utilizados a PCL e o Eudragit® RS 100, como polímeros, para a produção de NC de superfície aniônica e catiônica, respectivamente. Após a etapa de produção das suspensões coloidais, as NC foram incorporadas em formulações semissólidas do tipo hidrogel e suas características físico-químicas, comportamento reológico e liberação *in vitro* empregando células de difusão de Franz foram estudadas.

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Material

4.2.1.1 Matérias-primas

- Carbopol Ultrez[®] 10 NF (Deg, São Paulo – SP, Brasil);
- Dexametasona (DEX) - Multilab (São Jerônimo – RS, Brasil);
- Eudragit[®] RS 100 – Degussa (Darmstadt, Alemanha).
- Imidazolidinil uréia (Delaware, Porto Alegre – RS, Brasil);
- Monoestearato de sorbitano (Span 60) (Sigma, São Paulo - SP, Brasil);
- Poli (ϵ -caprolactona) (PCL) $M_w = 80.000$ (Sigma, São Paulo - SP, Brasil);
- Polissorbatato 80 (Tween 80) (Henrifarma, São Paulo – SP, Brasil).
- Trietanolamina (Delaware, Porto Alegre – RS, Brasil);
- Triglicerídeos de cadeia média (TCM) (Brasquim, Porto Alegre – RS, Brasil).

4.2.1.2 Solventes e outros materiais

- Água Milli-Q[®] (Destilador/deionizador Milli-Q[®] - Millipore, Billeria – MA, EUA);
- Acetonitrila grau CLAE (Tédia Brazil, Rio de Janeiro – RJ, Brasil);
- Membranas de polivideno HVLP 0,45 μm (Millipore, Billeria – MA, EUA);
- Algodão hidrofílico (Cremer, Blumenau – SC, Brasil);
- Fita adesiva 3M (Durex, Sumaré – SP, Brasil);
- Membrana de diálise - M.W = 12,4 kDa - (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA);
- Tubos de ensaio falcon (TPP, Switzerland, Suíça);
- Fosfato de potássio (KH_2PO_4) (Nuclear, Diadema – SP, Brasil);
- Fosfato de sódio bifásico ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) (Nuclear, Diadema – SP, Brasil)
- Lâminas de bisturi número 21 (Feather, Osaka, Japão);
- Bisturi número 4 (Feather, Osaka, Japão);
- *Grids* de cobre com revestimento carbono-formvarm (Electron Microscopy Science, Hatfield – PA, EUA)

4.2.1.3 Aparelhos e Equipamentos

- Balança analítica modelo APX-200 (Denver Instrument, Bohemia – NY, EUA);
- Centrífuga modelo 5417R (Eppendorff, São Paulo – SP, Brasil);
- Zetasizer[®], Zetasizer Nanoseries, modelo ZEN 3600 (Malvern instruments, Southborough - MA, EUA);
- Ultrassom - 1400A Ultracleaner, (Unique, Indaiatuba - SP, Brasil);
- Potenciômetro B474 (Micronal, Brasil) e Ultra-Basic (Denver Instrument, Bohemia – NY, EUA);
- Mastersizer 2000[®] (Malvern - Worcestershire, Reino Unido)
- Turbiscan[®] LAb (Formulacion, França):
 - Software: TLab EXPERT 1.13;
- Viscosímetro LV-DV-II+Pro (Brookfield, Middleboro – MA, EUA):
 - Spindle SC4-25 e ULA
 - Software: Rheocalc[®];
- Microscópio eletrônico de transmissão JEM-1200 ExII (Jeol, Tóquio, Japão);
- Célula de difusão de *Franz* Automatizada (Célula de *Franz* Microette Plus-Hanson Research[®] - Chatsworth, EUA);
- Medidor de espessura (Mitutoyo, Kanagawa, China);
- Pele de abdômen de porcas (Abatedouro Araldi, Nova Roma do Sul – Brasil)
- Vórtex (Certomat MV, B. Braun Biotech)
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) (Shimadzu[®] - Tóquio, Japão):
 - Auto-injetor (LC-20A prominence)
 - Detector UV-Vis
 - Bomba S-200
 - Software: Lab Solutions[®];

4.2.2 Métodos

4.2.2.1 Preparação de suspensões aquosas de nanocápsulas poliméricas

As suspensões de DEX associada à nanocápsulas poliméricas (Tabelas 4.1 e 4.2) foram preparadas, em triplicata, segundo o método de deposição interfacial do polímero pré-formado (FESSI *et al.*, 1989). Obtiveram-se dois tipos de nanocápsulas poliméricas: nanocápsulas poliméricas convencionais de superfície catiônica (NC+)

preparadas com o polímero Eudragit® RS 100 e nanocápsulas de núcleo lipídico de superfície aniônica (NC-), obtidas segundo Venturini e colaboradores (2011) utilizando como polímero, a poli (ϵ -caprolactona).

A fase orgânica foi mantida sob agitação magnética em banho aquecido à temperatura de 40°C até a completa dissolução de todos os componentes. Em seguida, a fase orgânica foi injetada, com o auxílio de um funil, na fase aquosa, também mantida sob agitação magnética e à mesma temperatura. A suspensão foi mantida sob agitação moderada durante 10 minutos e então, concentrada a um volume final de 25 mL, em evaporador rotatório, para eliminação do solvente orgânico e ajuste da concentração final de DEX (0,5 mg/mL). Para fins comparativos, foram preparadas suspensões de nanocápsulas brancas, omitindo-se a presença do fármaco.

Tabela 4.1. Composição da suspensão de nanocápsulas de superfície catiônica contendo DEX (NC+)

Fase Orgânica	Fase Aquosa
Triglicerídeos dos ácidos cáprico e caprílico..... 825 μ L	Polissorbato 80 191,5 mg
Eudragit® RS100..... 250 mg	Água ultrapura 135 mL
Acetona 69 mL	
Dexametasona12,5 mg	

Tabela 4.2. Composição da suspensão de nanocápsulas de superfície aniônica contendo DEX (NC-)

Fase Orgânica	Fase Aquosa
Triglicerídeos dos ácidos cáprico e caprílico..... 413 μ L	Polissorbato 80 191,5 mg
Poli (ϵ -caprolactona)..... 250 mg	Água ultrapura 135 mL
Moestearato de sorbitano..... 95,1 mg	
Acetona 69 mL	
Dexametasona12,5 mg	

4.2.2.2 Caracterização físico-química das nanocápsulas poliméricas

As suspensões aquosas de nanocápsulas poliméricas foram caracterizadas quanto às características organolépticas (aparência e cor), pH, teor de fármaco, eficiência de encapsulação, diâmetro médio de partícula, distribuição granulométrica, índice de polidispersão, potencial zeta e morfologia.

4.2.2.2.1 Características organolépticas

As suspensões de nanocápsulas foram analisadas quanto à aparência (homogeneidade ou heterogeneidade, presença ou não de partículas precipitadas) e cor através de avaliação visual sob iluminação natural.

4.2.2.2.2 Determinação do pH

A determinação do pH foi realizada por potenciometria. Para isso, foi empregado um potenciômetro previamente calibrado (soluções de calibração pH 7,0 e 4,0). Para a solução aquosa de nanocápsulas, o valor de pH foi determinado através de imersão direta do eletrodo. Os resultados foram expressos pela média e desvio-padrão de três lotes analisados para cada formulação.

4.2.2.2.3 Determinação do teor de DEX e eficiência de encapsulação

O teor de DEX das nanocápsulas foi determinado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) empregando um método analítico adaptado (FRIEDRICH *et al.*, 2010a; FRIEDRICH *et al.*, 2010b) e revalidado. As condições cromatográficas estão descritas no ANEXO 1. Os resultados foram expressos pela média e desvio-padrão de três lotes analisados (miligrama de DEX por milímetro de suspensão).

Para a determinação da eficiência de encapsulação (EE) da DEX às nanocápsulas, foi utilizada a técnica de ultrafiltração-ultracentrifugação (Ultrafree-MC[®] 10.000 MW, Millipore, Bedford, USA). A DEX livre, ou seja, não associada às nanocápsulas, foi determinada no ultrafiltrado após centrifugação a 5.000 r.p.m. por 10 minutos. A EE foi calculada através da diferença entre o teor de fármaco total e o teor de fármaco livre encontrado no ultrafiltrado.

4.2.2.2.4 Determinação do diâmetro médio de partícula, distribuição granulométrica e índice de polidispersão

Para a determinação de diâmetro médio de partícula, distribuição granulométrica e polidispersão foram empregadas as seguintes técnicas: difratometria de laser para avaliar possíveis populações com tamanho superior a 1 µm (Mastersizer 2000®, Malvern Instruments, UK) e espalhamento de luz dinâmico (Zetasizer Nanoseries, Malvern Instruments, Worcestershire, UK).

4.2.2.2.4.1 Difratometria de laser

Para a determinação do diâmetro médio e da distribuição granulométrica das formulações foi empregada a técnica de difratometria de laser (DL) (Mastersizer 2000®, Malvern, UK). O diâmetro médio baseado no volume (D[4,3]) foi utilizado como parâmetro para a distribuição de tamanho das nanopartículas nas amostras. Para avaliar a distribuição granulométrica, foi calculado o *span*, que emprega medidas do diâmetro de partículas correspondentes a 10 %, 50 % e 90 % da distribuição acumulada ($d_{0,1}$, $d_{0,5}$ e $d_{0,9}$, respectivamente). O *span* foi calculado através da equação: $Span = d_{0,9} - d_{0,1}/d_{0,5}$.

As nanocápsulas foram adicionadas, sem diluição, na unidade dispersora (Hydro SM *small volume sample dispersion unit*, Malvern, UK) até atingir um índice de obscuração de 2 %. Foi utilizado como parâmetro o índice de refração de 1,59 para a PCL e 1,38 para o Eudragit® RS100.

4.2.2.2.4.2 Espalhamento de luz dinâmico

O espalhamento de luz dinâmico ou *dynamic light scattering* (DLS) é uma técnica que determina o diâmetro hidrodinâmico das partículas, permitindo a obtenção do perfil granulométrico, diâmetro médio e índice de polidispersão (PDI) (Zetasizer® nano-ZS modelo ZEN 3600 - Malvern, EUA). Os cálculos são realizados através da equação Stokes-Einstein, a partir das diferentes intensidades da luz espalhada pelas partículas em movimento browniano. As amostras das suspensões foram diluídas 500 vezes (v/v) em água ultrapura MilliQ®. Em seguida, para eliminar partículas maiores que pudessem interferir nas análises, as amostras diluídas dos géis foram filtradas através de filtro de 1,2 µm (Millipore®) diretamente para a cubeta de análise. A água ultrapura MilliQ® utilizada nas diluições foi previamente filtrada em filtro de 0,45 µm (Millipore® Millex-HV). O diâmetro médio foi avaliado por volume

e por número. Os resultados do diâmetro médio e do índice de polidispersão foram expressos pela média e desvio-padrão para cada triplicata.

4.2.2.2.5 Determinação do potencial zeta (ξ)

O potencial zeta das suspensões foi determinado através de mobilidade eletroforética (Zetasizer® nano-ZS modelo ZEN 3600 - Malvern, EUA). Esta análise foi realizada após diluição das amostras (500 vezes, v/v) em solução de NaCl 10 mM (previamente filtrada em filtro 0,45 μ m, Millipore® Millex-HV). Os resultados foram expressos através da média e desvio-padrão de três repetições.

4.2.2.2.6 Avaliação da morfologia das nanocápsulas

As amostras das nanocápsulas foram analisadas quanto à morfologia das partículas por microscopia eletrônica de transmissão (MET) em microscópio de transmissão JEM 1200 ExII, operando a 80 kV (Centro de Microscopia Eletrônica, UFRGS, Brasil). As suspensões de nanocápsulas foram diluídas 10 vezes (v/v) em água ultrapura MilliQ®. Em seguida cada amostra foi depositada em *grid*, de aproximadamente 200 mesh composto de cobre e revestido com filme de absorção de elétrons de Formvar-Carbono (Electron Microscopy Sciences). Após adição das amostras, os *grids* ficaram em repouso por 1 minuto e o excesso foi retirado com papel filtro. Na sequência, para carregar negativamente as amostras, foi adicionada uma solução de acetato de uranila a 2% (m/v) previamente filtrada em filtro 0,45 μ m (Millipore® Millex-HV) que permaneceu em contato por 1 minuto. O excesso da solução foi retirado com auxílio de papel filtro. As amostras foram armazenadas em dessecador 24 horas antes da análise. As magnitudes utilizadas para as análises microscópicas foram 50.000, 100.000 e 200.000 vezes. O diâmetro médio das nanocápsulas foi calculado utilizando o software Image J (version 1.44u, National Institutes of Health, EUA) para as fotomicrografias com magnificação de 100.000 x.

4.2.2.2.7 Avaliação de fenômenos de instabilidade física por espalhamento múltiplo de luz

Possíveis fenômenos de instabilidade física (migração de partículas: cremagem e sedimentação; alteração no diâmetro de partículas: floculação e coalescência) foram investigados para as suspensões aquosas pela técnica de

espalhamento múltiplo de luz usando o equipamento Turbiscan *LAB*[®] (Formulation, França), que permite a caracterização óptica de suspensões e emulsões utilizando uma fonte de infravermelho próximo (850 nm) e detectores que medem a luz transmitida (a 180° do feixe incidente) ou refletida (a 45° do feixe incidente). O princípio da técnica se baseia na variação da fração volumétrica da partícula que gera uma variação de transmissão e *backscattering* (MENGUAL *et al.*, 1999). As amostras das suspensões de NC foram colocadas diretamente (sem diluição) nas células de vidro e foram analisadas a 25°C durante 1 hora com *scan* a cada 6 minutos.

4.2.2.3 Preparação das formulações de hidrogéis

Géis hidrofílicos ou hidrogéis de carbômero (Carbopol Ultrez[®] 10 NF) foram produzidos e denominados da seguinte forma:

- Gel branco: **GB**
- Gel contendo nanocápsulas brancas de superfície aniônica: **GNC-**
- Gel contendo nanocápsulas brancas de superfície catiônica: **GNC+**
- Gel contendo nanocápsulas de superfície aniônica com DEX: **GNCD-**
- Gel contendo nanocápsulas de superfície catiônica com DEX: **GNCD+**
- Gel contendo DEX (fármaco livre): **GD**

A tabela 4.3 apresenta a composição quali-quantitativa das seis formulações de géis hidrofílicos.

Tabela 4.3. Composição quali-quantitativa das formulações de hidrogéis

Componente	Formulação (gramas)					
	G	GNC-	GNC+	GNCD-	GNCD+	GD
Carbopol Ultrez [®] 10 NF	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
Imidazolidinil uréia	0,60	0,60	0,60	0,60	0,60	0,60
Trietanolamina	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20
Dexametasona	-	-	-	-	-	0,05
Polissorbato 80	-	-	-	-	-	0,076
NC-	-	98,70	-	-	-	-
NC+	-	-	98,70	-	-	-
NCD-	-	-	-	98,70	-	-
NCD+	-	-	-	-	98,70	-
Água destilada	98,70	-	-	-	-	98,574

A preparação de cada formulação se deu através da dispersão do carbômero em água destilada. Lentamente, o Carbopol Ultrez[®] 10 NF foi adicionado na água ou na suspensão de nanocápsulas contendo o conservante. Homogeneizou-se até completa dispersão. Adicionou-se trietanolamina à dispersão para ocorrer a neutralização da rede polimérica e a formação do gel. No caso do gel GD, o fármaco foi previamente dispersado em polissorbato 80 e só então adicionado ao gel até completa homogeneidade do sistema. Para fins comparativos, utilizou-se a mesma concentração de polissorbato 80 presente nas suspensões aquosas de nanocápsulas.

4.2.2.4 Caracterização físico-química dos hidrogéis

As formulações semissólidas (géis) foram caracterizadas quanto às características organolépticas (aparência e cor), pH, teor de fármaco, diâmetro médio de partícula, distribuição granulométrica, índice de polidispersão e comportamento reológico.

4.2.2.4.1 Características organolépticas

Os hidrogéis foram analisados quanto à aparência e à cor através de avaliação visual, sob iluminação natural.

4.2.2.4.2 Determinação do pH

A determinação do pH dos hidrogéis foi realizada por potenciometria empregado um potenciômetro previamente calibrado (soluções de calibração pH 7,0 e 4,0). O eletrodo foi imerso em uma dispersão aquosa da formulação a 10 % (p/v), previamente preparada. Os resultados foram expressos pela média e desvio-padrão de três lotes analisados para cada formulação.

4.2.2.4.3 Determinação do teor de DEX

O teor de DEX dos géis foi determinado por CLAE empregando um método analítico previamente validado (FRIEDRICH *et al.*, 2010a; FRIEDRICH *et al.*, 2010b). As condições cromatográficas assim como a extração das amostras e sua validação estão descritas no ANEXO 1. Os resultados foram expressos pela média e desvio-padrão de três lotes analisados (miligrama de DEX por grama de gel).

4.2.2.4.4 Determinação do diâmetro médio de partícula, distribuição granulométrica e índice de polidispersão

Para a determinação de diâmetro médio de partícula, distribuição granulométrica e polidispersão foram empregadas as técnicas de difratometria de laser e espalhamento de luz dinâmico descritas a seguir.

4.2.2.4.4.1 Difratometria de laser

O diâmetro médio e a distribuição granulométrica das formulações foi estudada empregado a técnica de difratometria de laser (DL) (Mastersizer 2000[®], Malvern, UK). O diâmetro médio foi calculado baseado no volume (D[4,3]) e também no número (D[3,0]) para avaliar os hidrogéis. Para a distribuição granulométrica, foi calculado o *span*, que emprega medidas do diâmetro de partículas correspondentes a 10 %, 50 % e 90 % da distribuição acumulada ($d_{0,1}$, $d_{0,5}$ e $d_{0,9}$, respectivamente) conforme descrito no item 4.2.2.2.4.1 anteriormente. Os géis foram previamente diluídos em água destilada (10%, p/v) e só então a dispersão obtida foi adicionada à unidade dispersora em quantidade suficiente para atingir 2% de obscuração. Foi

utilizado como parâmetro o índice de refração de 1,59 para a PCL e 1,38 para o Eudragit® RS100.

4.2.2.4.4.2 Espalhamento de luz dinâmico

O espalhamento de luz dinâmico (DLS) foi também empregado para a obtenção do diâmetro médio e índice de polidispersão (PDI) (Zetasizer® nano-ZS modelo ZEN 3600 - Malvern, EUA) das formulações.

As amostras dos hidrogéis foram preparadas com diluição de 2.000 vezes (p/v) em água ultrapura MilliQ® e homogeneizadas em vórtex. Em seguida, para eliminar partículas maiores que pudessem interferir nas análises, as amostras diluídas dos géis foram filtradas através de filtro de 1,2 µm (Millipore®) diretamente para a cubeta de análise. A água ultrapura MilliQ® utilizada nas diluições foi previamente filtrada em filtro de 0,45 µm (Millipore® Millex-HV). Os resultados do diâmetro médio e do índice de polidispersão foram expressos pela média e desvio-padrão para cada triplicata.

4.2.2.4.5 Determinação do comportamento reológico

Os estudos reológicos das formulações semissólidas foram conduzidos com controle de temperatura ($25 \pm 1^\circ\text{C}$) usando um viscosímetro rotacional (LVDV II + Pro model, Brookfield, USA), *spindle* SC4-25 e um adaptador para pequeno volume de amostra. Uma rampa de tensão de cisalhamento (τ) foi conduzida de modo crescente a partir de 0,40 até 2,00 rpm e em seguida, decrescente, totalizando 18 pontos registrados.

Os reogramas foram obtidos através da representação gráfica da taxa de cisalhamento (s^{-1}), em função da tensão de cisalhamento média (Pa). Os dados foram analisados através do software Rheocalc (v3. versão 1-1, Brookfield) e quatro modelos de fluxo para fluidos não-newtonianos foram usados para avaliar os reogramas: Bingham, Casson, Ostwald e Hershel-Bulkley (Tabela 4.4). A escolha do modelo mais adequado se baseou naquele que apresentou o maior coeficiente de correlação.

Tabela 4.4. Modelos matemáticos empregados para estudar o tipo de comportamento não-newtoniano (BARNES, 2000; KIM *et al.*, 2003)

Modelo	Equação	Comportamento
Bingham	$\tau = \tau_0 + \eta\dot{\gamma}$	Fluxo plástico perfeito
Casson	$\tau = \tau_0^{0.5} + \eta^{0.5}\dot{\gamma}^{0.5}$	Fluxo Plástico
Ostwald	$\tau = K\dot{\gamma}^n$	Fluxo pseudoplástico ($n < 1$)
Herschel-Bulkley	$\tau = \tau_0 + K\dot{\gamma}^n$	Fluxo pseudoplástico com valor de cedência

Onde η representa a viscosidade (Pa.s), K a consistência (Pa.sⁿ), τ_0 a tensão de cisalhamento limite ou valor de cedência (Pa), $\dot{\gamma}$ é a taxa de cisalhamento (s⁻¹) e n é o índice da lei das potências. Os resultados apresentados foram baseados na média e desvio-padrão de três lotes analisados para cada formulação.

4.2.2.5 Estudo de liberação *in vitro* da DEX a partir dos géis

A liberação *in vitro* da DEX das formulações semissólidas foi estudada empregando células verticais de difusão do tipo Franz (Figura 4.1) em equipamento automatizado (MicroettePlus Multi-Group®, Hanson Research Corporation, Chatsworth, CA, USA). A temperatura foi mantida a 37 ± 0.5°C e cada formulação foi analisada em triplicata. A área de difusão da formulação foi de 1,766 cm² e o volume do compartimento receptor foi de 7,0 mL. Uma membrana sintética de diálise (12 kDa, Sigma-Aldrich) foi colocada cuidadosamente entre os compartimentos doador e receptor. Um meio receptor composto de tampão fosfato (pH 7,4) e polissorbat 80 (0,02%) foi utilizado para manter a condição *sink*. O meio foi mantido em constante agitação magnética a 400 r.p.m. Uma quantidade aproximada de 300 mg de cada formulação foi aplicada de maneira homogênea sobre a superfície da membrana. Em seguida um disco de vidro foi adicionado sobre a área de aplicação e o compartimento doador foi fechado com auxílio de presilhas metálicas.

Em intervalos predeterminados de 1, 2, 3, 4 e 5 horas, alíquotas de 0,5 mL do meio receptor foram coletadas para análise e o mesmo volume de meio fresco foi repostado automaticamente. A quantidade de DEX liberada em cada intervalo de tempo foi determinada por CLAE de acordo com método descrito e validado no ANEXO 2.

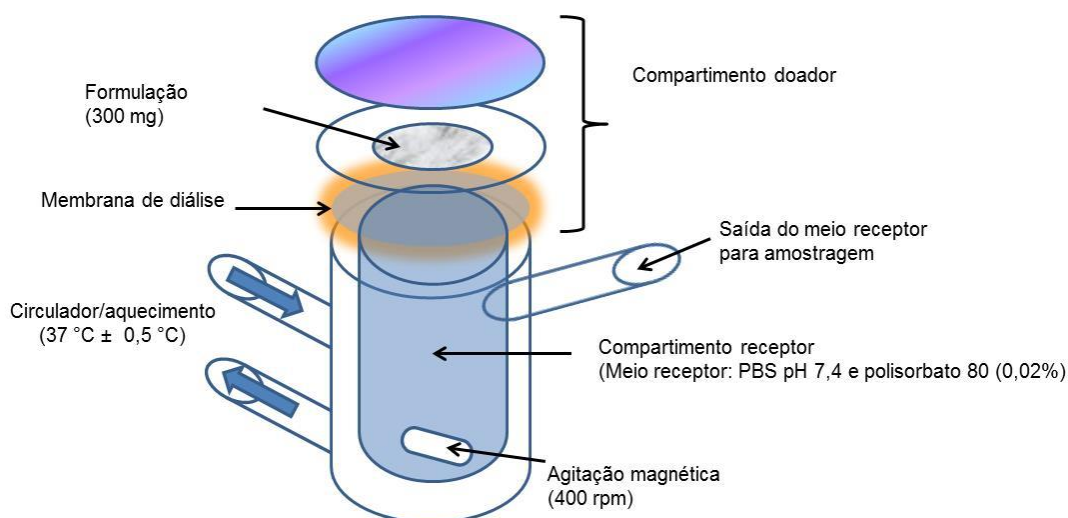


Figura 4.1. Representação esquemática da célula de difusão de Franz utilizada neste trabalho.

O software MicroMath[®] Scientist[®] (St. Louis, MO, USA) para Windows[™] foi utilizado para a realização da modelagem matemática. Foram analisados os seguintes modelos matemáticos: Mono-exponencial, Bi-exponencial e Higuchi. A seleção do modelo foi baseada nos melhores valores de coeficiente de correlação e critério de seleção do modelo (*model selection criteria* ou MSC) obtidos pelo software.

4.3 Resultados e discussão

4.3.1 Caracterização físico-química das nanocápsulas poliméricas

4.3.1.1 Características organolépticas

Todas as suspensões de nanocápsulas apresentaram aspecto turvo leitoso, homogêneo com reflexo azulado (efeito *Tyndall*) devido o movimento browniano das partículas em suspensão.

4.3.1.2 Determinação do pH

Os valores de pH das suspensões de nanocápsulas foram obtidos logo após sua preparação (n = 3) e apresentaram-se levemente ácidos. As nanocápsulas de superfície aniônica branca e com fármaco associado apresentaram valores de pH de $5,79 \pm 0,11$ e $5,88 \pm 0,02$, respectivamente. Por sua vez, as nanocápsulas de superfície catiônica branca e com fármaco associado, apresentaram valores de $5,43 \pm 0,07$ e $5,64 \pm 0,18$, respectivamente. Não há diferença significativa entre o pH das nanocápsulas brancas e nanocápsulas carregadas de fármaco. Todos os valores estão adequados para incorporação em formulações semissólidas de uso tópico (ALVES *et al.*, 2007).

4.3.1.3 Determinação do teor de DEX e eficiência de encapsulação

O teor de DEX foi determinado por CLAE. Os valores encontrados foram próximos de 100% para ambas as suspensões de nanocápsulas ($0,485 \pm 0,004$ mg.mL⁻¹ e $0,497 \pm 0,009$ mg.mL⁻¹ para NCD- e NCD+, respectivamente).

Os valores de eficiência de encapsulação (EE) encontrados foram de 85% e 81% para NCD- e NCD+, respectivamente. A EE encontrada para a NCD- está próxima aos valores determinados por Beck *et al.* (2003) e Friedrich *et al.* (2008) para suspensões de nanocápsulas preparadas com DEX e o mesmo polímero (PCL), que encontraram valores de aproximadamente 77 e 89 %, respectivamente.

4.3.1.4 Determinação do diâmetro médio de partícula, distribuição granulométrica e índice de polidispersão

Nas Figuras 4.2 e 4.3 são apresentados os resultados da distribuição granulométrica (em volume) por difratometria de laser (DL) para as suspensões aquosas de NC.

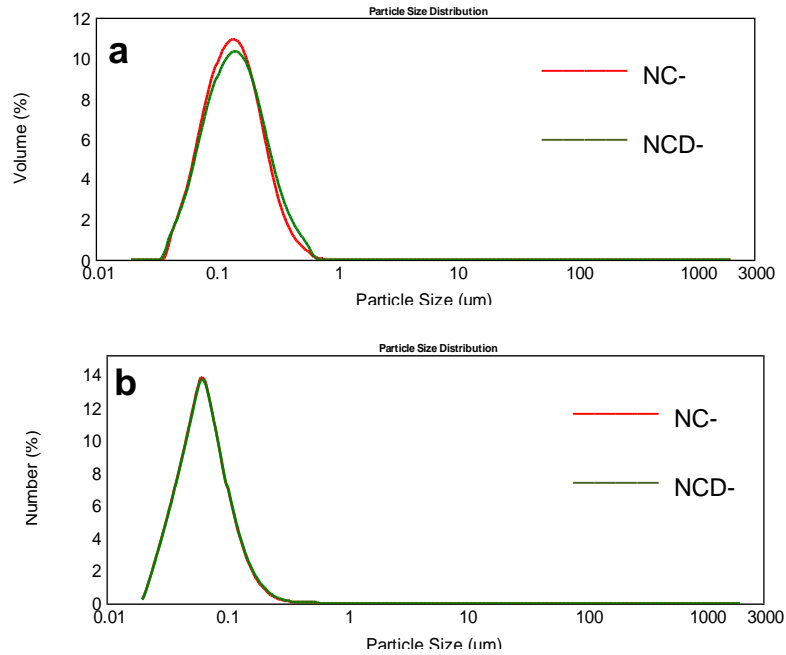


Figura 4.2. Distribuição granulométrica do tamanho de partícula, por difratometria de laser, analisada por volume (a) e por número (b) para as nanocápsulas poliméricas de superfície aniônica (NC- e NCD-).

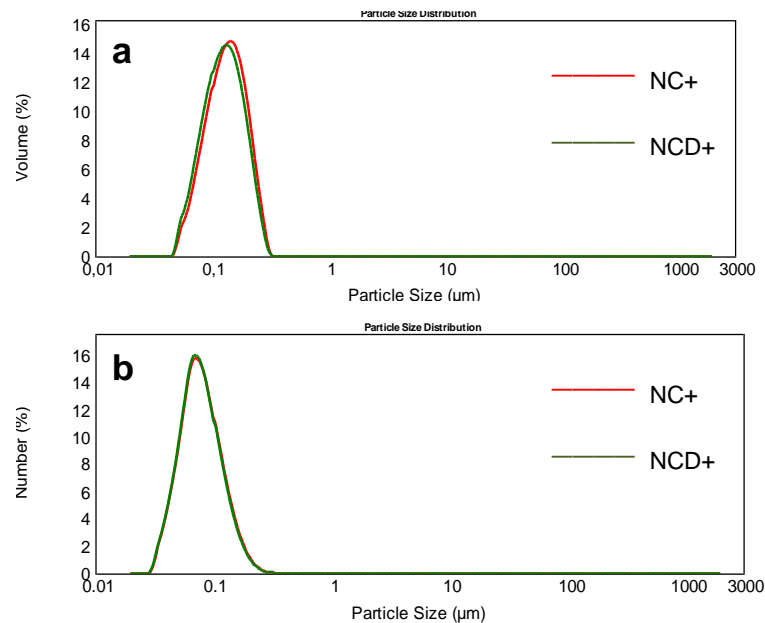


Figura 4.3. Distribuição granulométrica do tamanho de partícula, por difratometria de laser, analisada por volume (a) e por número (b) para para as nanocápsulas poliméricas de superfície catiônica (NC+ e NCD+).

É possível observar que não foram verificadas populações micrométricas para as suspensões preparadas com ambos os polímeros (com ou sem fármaco), sendo observadas distribuições granulométricas unimodais e com distribuição estreita de

tamanho. Esses resultados indicam que o método de preparação (nanoprecipitação) e a composição quali-quantitativa das formulações possibilitou obter carreadores de tamanho nanométrico.

Os valores médios de diâmetro de partícula medidos a partir das duas técnicas utilizadas neste trabalho (difratometria de laser e espalhamento dinâmico de luz) estão descritos na Tabela 4.5.

Tabela 4.5. Diâmetro médio, Span e índice de polidispersão (PDI) das nanocápsulas poliméricas determinados pelas diferentes técnicas (n=3)

Formulação	Difratometria de laser		Espalhamento de luz dinâmico	
	D[4,3]*	Span*	Média	PDI
NC-	159 ± 5,00	1,48 ± 0,07	202 ± 3	0,09 ± 0,01
NCD-	166 ± 6,43	1,55 ± 0,15	193 ± 3	0,07 ± 0,02
NC+	135 ± 3,51	1,02 ± 0,01	150 ± 2	0,08 ± 0,02
NCD+	139 ± 3,61	0,90 ± 0,04	152 ± 6	0,07 ± 0,01

* por volume das partículas.

O diâmetro médio D[4,3] para as NC- (159 nm) corroboram com aquele obtido para a mesma formulação do tipo LNC (150 nm), previamente otimizada por Venturini e colaboradores (2011).

De acordo com a técnica de espalhamento dinâmico de luz, as NC brancas preparadas com o polímero PCL (NC-) apresentaram diâmetro médio de 202 nm enquanto que as NC contendo o fármaco (NCD-) apresentaram 193 nm. Estes valores estão um pouco abaixo daqueles encontrados por Friedrich e colaboradores (2008), mas próximos daqueles verificados por Marchiori e colaboradores (2010). Como no presente trabalho foram preparadas NC de núcleo lipídico (LNC), esses resultados são esperados já que a proporção entre os constituintes é diferente. Foi verificado que ambas as suspensões possuem baixa polidispersão uma vez que foram encontrados valores de PDI inferiores a 0,2 (PDI 0,09 e 0,07 para NC- e NCD, respectivamente).

Por outro lado, as NC preparadas com o polímero catiônico apresentaram diâmetros médios inferiores às NC de PCL (150 e 152 nm para NC+ e NCD+, respectivamente). Porém, a polidispersão foi similar se comparadas essas formulações (PDI: 0,08 e 0,07 para as NC+ e NCD+, respectivamente). Esses valores menores do diâmetro para as NC+ corroboram com valores encontrados na literatura

para nanocápsulas também preparadas com Eudragit® RS 100 (CONTRI et al., 2013; SANTOS et al., 2013).

4.3.1.5 Determinação do potencial zeta (ξ)

As nanocápsulas preparadas com o polímero PCL apresentaram valores de potencial zeta negativos ($-8,16 \pm 1,01$ mV para as NCD-). Esses valores negativos estão de acordo com aqueles verificados na literatura para nanocápsulas poliméricas preparadas com PCL e polissorbatato 80 (JÄGER *et al.*, 2009; KÜLKAMP *et al.*, 2009; MARCHIORI *et al.*, 2010).

Por outro lado, o emprego do polímero catiônico Eudragit® RS100, como esperado, resultou em nanocápsulas com valor positivo ($+11,38 \pm 1,7$ mV). O Eudragit® RS100 é um copolímero de acrilato de etila, metacrilato de metila e ácido metacrílico esterificado com grupos quaternários de amônio bastante estudado para a liberação controlada de fármacos e devido suas propriedades bioadesivas (DILLEN *et al.*, 2006; SANTOS *et al.*, 2013). O potencial zeta pode fornecer indícios sobre a estabilidade de um sistema coloidal. No entanto, o mecanismo de estabilização das nanocápsulas poliméricas preparadas neste trabalho seja utilizando PCL ou Eudragit® RS100 está mais relacionado ao efeito estérico do polissorbatato 80 presente na interface partícula/água (JÄGER *et al.*, 2009) do que à repulsão eletrostática resultante dos valores de carga de superfície. (COUVREUR *et al.*, 2002).

4.3.1.6 Avaliação da morfologia das nanocápsulas

A análise morfológica das suspensões de nanocápsulas foi realizada por MET com aumentos de 50.000, 100.000 e 200.000 vezes (Figuras 4.4 e 4.5).

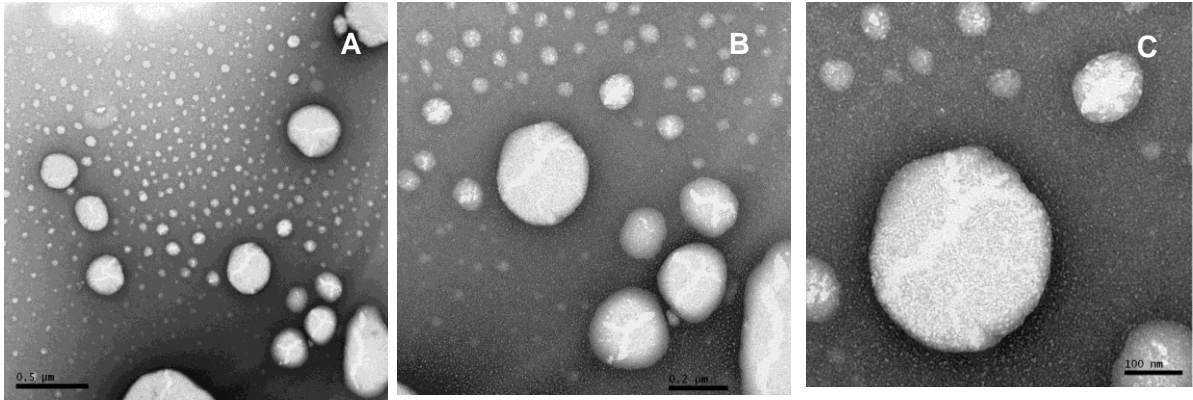


Figura 4.4. Fotomicrografias obtidas por MET das suspensões de nanocápsulas carregadas de DEX de superfície aniônica (NCD-) em aumentos de 50.000x (A), 100.000x (B) e 200.000x (C)

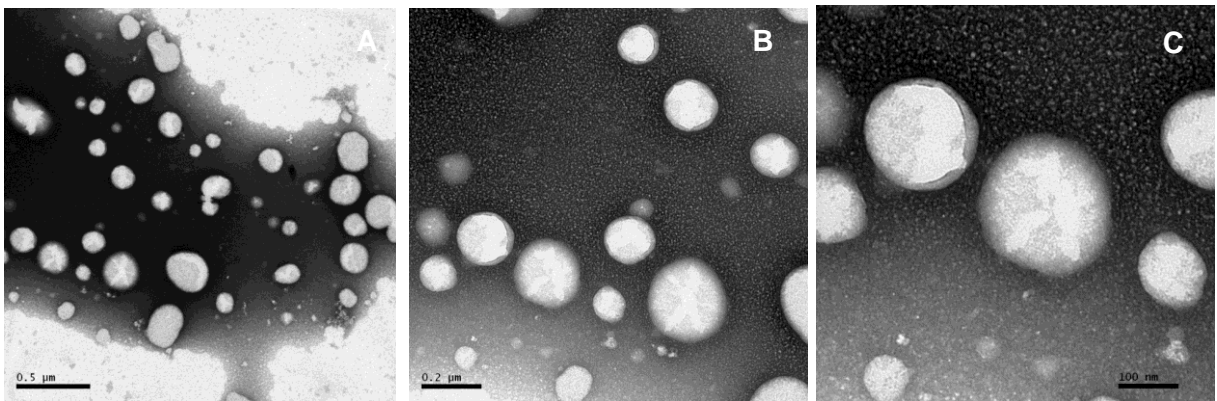


Figura 4.5. Fotomicrografias obtidas por MET das suspensões de nanocápsulas carregadas de DEX de superfície catiônica (NCD+) em aumentos de 50.000x (A), 100.000x (B) e 200.000x (C)

As fotomicrografias obtidas por MET demonstraram que as nanocápsulas poliméricas apresentaram formato esférico e os diâmetros encontrados foram calculados com auxílio de software Image J. As NCD- apresentaram diâmetro de 230 nm pela imagem enquanto que por DLS o valor médio encontrado foi de 192 nm. Já as NCD+ apresentaram diâmetro ligeiramente superior (177 nm) ao encontrado por DLS (152 nm). Essa diferença de valores pode ser explicada pelos princípios das técnicas, considerando que a técnica de DLS mede o raio hidrodinâmico da partícula, além de ser uma média de várias populações de partículas, enquanto que na MET são realizadas apenas as medidas de algumas partículas individuais isoladas da imagem.

4.3.1.7 Avaliação de fenômenos de instabilidade física por espalhamento múltiplo de luz

As Figuras 4.6 e 4.7 apresentam os gráficos da variação de *backscattering* para as suspensões aquosas de NCD- e NCD+. Como os valores de variação de transmissão foram inferiores a 0,2%, foram analisados somente os dados referentes à variação dos valores de *backscattering* (BS).

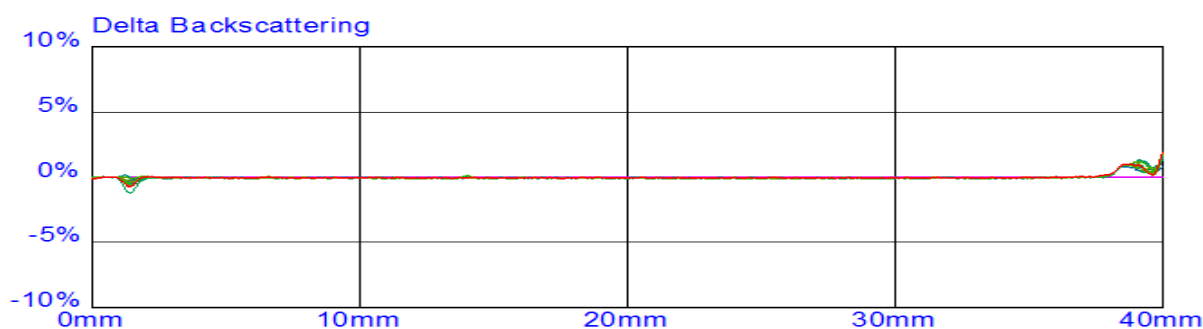


Figura 4.6. Gráfico de variação de *backscattering* das NCD-.

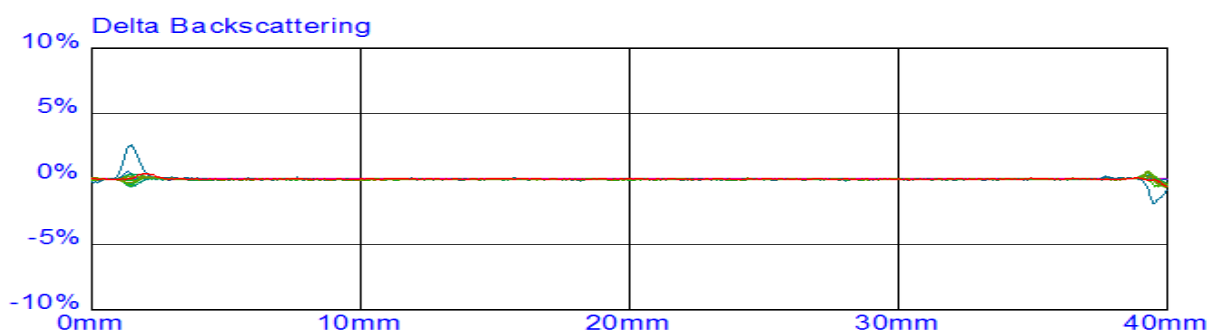


Figura 4.7. Gráfico de variação de *backscattering* das NCD+.

A parte esquerda do gráfico corresponde à base da cubeta enquanto que a direita corresponde ao topo da cubeta. As NCD- mostraram diminuição e aumento do BS, na base e no topo, respectivamente. Já as NCD+ apresentaram na base da cubeta diminuição do BS enquanto no topo da cubeta, discreto aumento o que pode indicar leve tendência à migração das partículas. No entanto, variações no BS pequenas como observadas nesse caso, indicam estabilidade da suspensão coloidal. Da mesma forma, as suspensões de nanocápsulas não apresentaram variações de BS na região central da cubeta, indicando que não houve aumento do tamanho das partículas, como floculação e coalescência (fenômenos irreversíveis). Análises por espalhamento múltiplo de luz têm demonstrado pequena tendência à

sedimentação e cremagem para suspensões aquosas de NC poliméricas. No entanto, a adição dessas NC a formulações semissólidas como hidrogéis tem atenuado essa tendência devido ao aumento da viscosidade da fase externa (CONTRI *et al.*, 2010).

No entanto, as suspensões NCD+ se mostraram visualmente mais estáveis que aquelas preparadas com a PCL (NCD-) após 3 dias da sua preparação.

Em ambos os casos, para prevenir fenômenos de instabilidade do sistema, as suspensões aquosas foram incorporadas no veículo semissólido em até 24 horas após a sua preparação.

4.3.2 Caracterização físico-química dos hidrogéis

A Tabela 4.6 apresenta os resultados referentes à aparência, cor, pH e teor de fármaco dos hidrogéis. Os resultados de pH e teor de DEX são expressos como média e desvio-padrão de cada triplicata.

Tabela 4.6. Características organolépticas, pH e teor de DEX dos hidrogéis

Formulação	Aspecto	Cor	pH	Teor DEX (mg.g ⁻¹)
GB	Gel homogêneo	Incolor	6,15 ± 0,05	-
GD	Gel homogêneo	Levemente opalescente	5,88 ± 0,05	0,47 ± 0,01
GNC-	Gel homogêneo	Branco	5,77 ± 0,02	-
GNCD-	Gel homogêneo	Branco	5,75 ± 0,03	0,46 ± 0,01
GNC+	Gel homogêneo	Branco	5,85 ± 0,11	-
GNCD+	Gel homogêneo	Branco	5,92 ± 0,09	0,48 ± 0,01

A formulação GB, isto é, o gel branco sem fármaco livre ou nanoencapsulado, apresentou aparência translúcida e coloração incolor enquanto o gel contendo o fármaco livre (GB), coloração opalescente devido à dispersão da DEX em polissorbato 80. Por sua vez, os géis contendo nanocápsulas carregadas de DEX (GNCD- e GNCD+) ou nanocápsulas sem fármaco (GNC- e GNC+) apresentaram aspecto homogêneo e coloração branca devido ao tamanho nanométrico das partículas que espalham a luz.

Em relação às análises da distribuição granulométrica por DL dos hidrogéis, os resultados são apresentados nas Figuras 4.8 e 4.9.

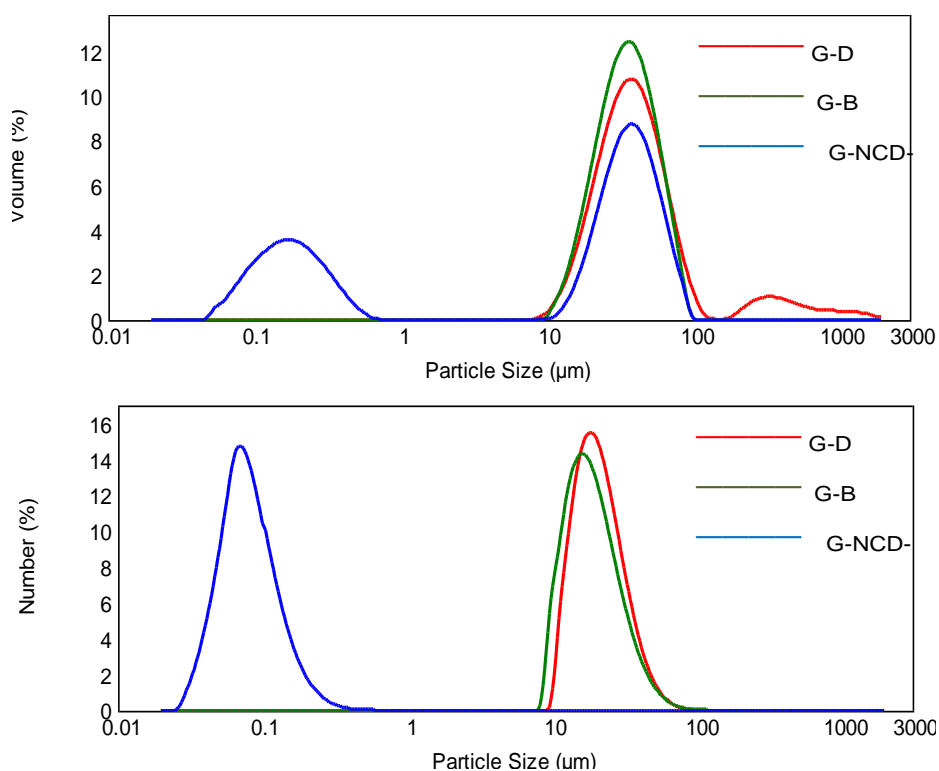


Figura 4.8. Distribuição granulométrica do tamanho de partícula, por difratometria de laser, analisada por volume (a) e por número (b) para os géis branco (GB), com fármaco livre (GD) e com as nanocápsulas poliméricas de superfície aniônica (GNCD-).

As formulações de hidrogel branco (GB) e com a DEX não encapsulada (GD) apresentaram tamanho micrométrico pela técnica de DL, tanto quando analisadas por volume quando analisadas por número. Quando às NCD- foram adicionadas à formulação (GNCD-), houve o aparecimento de um perfil bimodal, na análise por volume, sendo que a primeira população se refere às partículas nanométricas e a segunda à população micrométrica oriunda da rede polimérica (carbômero).

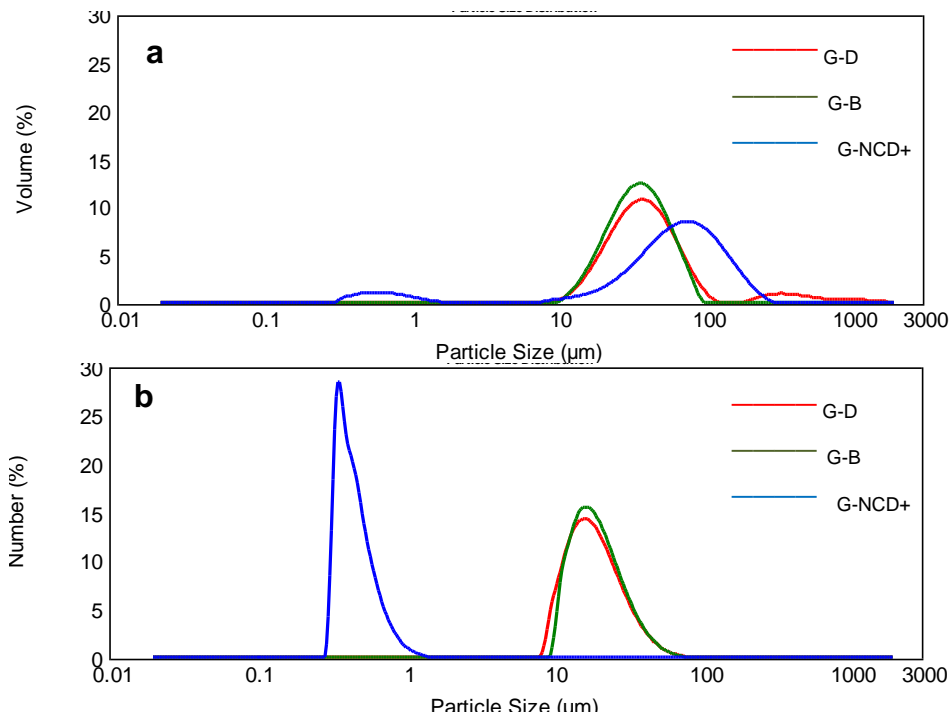


Figura 4.9. Distribuição granulométrica do tamanho de partícula, por difratometria de laser, analisada por volume (a) e por número (b) para os géis branco (GB), com fármaco livre (GD) e com as nanocápsulas poliméricas de superfície catiônica (GNCD+).

Da mesma forma, a adição das NCD+ ao hidroel (GNCD+) também ocasionou o aparecimento de um perfil bimodal pela análise do perfil granulométrico por DL. No entanto, a primeira população nanométrica apresentou uma pequena quantidade de partículas ligeiramente superior a 1 µm, além de um tamanho médio superior às suspensões de NCD+. Uma das hipóteses para explicar esse resultado é que as nanopartículas de superfície catiônica podem ter se ligado em parte ao carbômero provocando um aumento no diâmetro médio da primeira população de partículas. Isso foi evidenciado no momento da análise por DL para essa formulação. Foi necessário aguardar aproximadamente 2 minutos para estabilizar o índice de obscuração (2%) e ocorrer a desaglomeração permitindo a visualização da primeira população. Quando essa formulação foi analisada por número, observou-se o aparecimento somente de uma população, correspondente às nanopartículas.

Os resultados de diâmetro médio e PDI determinados por DLS para as formulações GB, GD, GNCD- e GNCD+ estão apresentados na Tabela 4.7.

Tabela 4.7. Diâmetro médio e índice de polidispersão (PDI) dos géis (n = 3) determinados por DLS.

Formulação	Diâmetro médio (nm)	PDI
GD	519 ± 35	0.60 ± 0.09
GNCD-	193 ± 4	0.11 ± 0.01
GNCD+	158 ± 1	0,15 ± 0,04
GB	646 ± 137	0.67 ± 0.10

As formulações GD e GB apresentaram diâmetro médio entre 519 e 646 nm com altos valores de polidispersão (> 0,6). Esses resultados estão de acordo com Marchiori e colaboradores (2010) que relataram que hidrogéis contendo DEX livre apresentaram altos valores de tamanho médio de partícula e PDI (733 nm e 0,74, respectivamente). A distribuição de diâmetro do gel branco e do gel contendo o fármaco livre não se sobrepôs à população nanométrica das formulações GNCD- e GNCD+. O diâmetro médio do GNCD- (193 nm) foi compatível com aquele verificado para a suspensão de NCD- original (192 nm), assim como o PDI (< 0,2). Da mesma forma, o diâmetro médio e o PDI do GNCD+ (158 nm e 0,15, respectivamente) foi similar àqueles das nanocápsulas NCD+ (152 nm e 0,07, respectivamente). Portanto, pode-se sugerir que essas nanocápsulas, quando incorporadas em hidrogéis, são mantidas intactas nesse tipo de veículo.

A adição do fármaco e das suspensões de nanocápsulas ao veículo promoveu ligeira redução dos valores de pH, quando comparado com a formulação branco (GB). Esses valores de pH levemente ácidos são adequados para administração cutânea (ALVES *et al.*, 2007). O teor de fármaco obtido experimentalmente para os hidrogéis foi próximo ao valor teórico (92 ± 2 % para o GD, 94 ± 2 % para o GNCD- e 96 ± 2 % para o GNCD+).

As características reológicas das formulações de hidrogéis foram avaliadas utilizando um viscosímetro rotacional e estão representadas pela Figura 4.10.

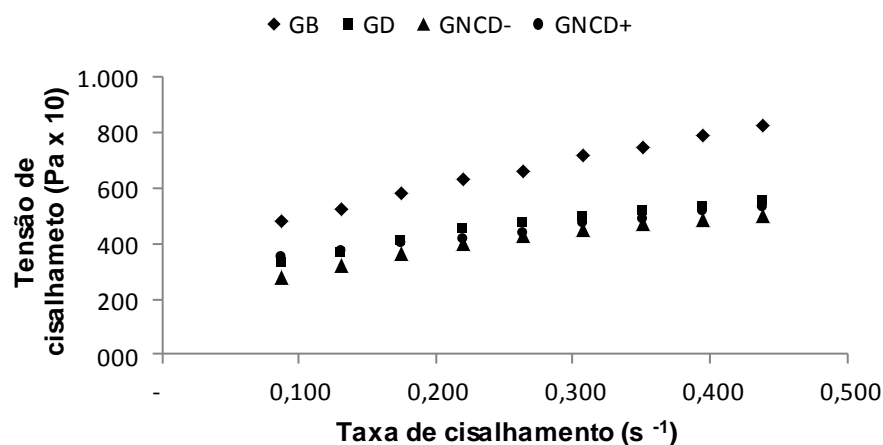


Figura 4.10. Reogramas, da tensão de cisalhamento (τ) *versus* taxa de cisalhamento ($\dot{\gamma}$), dos hidrogéis.

Na Tabela 4.8 são apresentados os coeficientes de regressão e seus respectivos desvios-padrão referentes aos modelos matemáticos que descrevem os fluxos plástico, dilatante e pseudoplástico.

Tabela 4.8. Coeficiente de regressão (r^2) para os modelos de fluxo dos lotes dos hidrogéis (GB, GD, GNCD- e GNCD+)

Formulação	Bingham	Casson	Ostwald	Herschel-Bulckley
GB	0,981 ± 0,005	0,989 ± 0,005	0,971 ± 0,016	0,991 ± 0,001
GD	0,964 ± 0,008	0,981 ± 0,001	0,968 ± 0,011	0,961 ± 0,013
GNCD-	0,956 ± 0,019	0,980 ± 0,014	0,959 ± 0,029	0,940 ± 0,076
GNCD+	0,858 ± 0,039	0,932 ± 0,016	0,863 ± 0,031	0,750 ± 0,007

Todas as formulações apresentaram comportamento não-newtoniano uma vez que não houve relação linear entre os valores de tensão de cisalhamento e taxa de cisalhamento. De acordo com os valores encontrados para os coeficientes de regressão, o modelo matemático que melhor descreveu o tipo de fluxo foi o de Casson ($> r^2$). O fluxo plástico se caracteriza pela necessidade de superar uma tensão de cisalhamento limite (τ_0) para que o fluido comece a fluir, ou seja, quando uma tensão de cisalhamento é aplicada, a formulação não flui imediatamente (KIM et al., 2003). A maioria dos estudos reológicos na literatura relata que hidrogéis

contendo nanopartículas como nanocápsulas poliméricas e carreadores lipídicos nanoestruturados apresentam fluxo do tipo pseudoplástico ou plástico (ALVES, RAFFIN e FAGAN, 2011). Milão e colaboradores (2003) avaliaram a reologia de hidrogéis de Carbopol 940® e verificaram que as formulações apresentaram comportamento não-newtoniano do tipo plástico e esse resultado não foi alterado após incorporação de nanocápsulas poliméricas contendo diclofenaco de sódio. Dragicevic-Curic e colaboradores (2009) também verificaram que hidrogéis preparados com Carbopol 980 NF contendo lipossomas carregadas de Temoporfina apresentaram fluxo plástico.

4.3.3 Estudo de liberação *in vitro* da DEX a partir dos hidrogéis

Antes da realização de estudos de penetração e permeação cutânea, é necessário avaliar se o veículo permite a liberação do fármaco. O fármaco deve ser liberado do veículo para que possa se difundir através do EC podendo penetrar ou não nas camadas adjacentes. Nos estudos de liberação *in vitro*, são utilizadas membranas sintéticas, como acetato de celulose. Recentemente, Andrade e colaboradores (2014) demonstraram que, no caso de semissólidos contendo nanocarreadores, a membrana de diálise (*cut off* de 12 Kda) é mais indicada para avaliar o perfil de liberação *in vitro* em célula de difusão de Franz. Esse tipo de membrana sintética permite a passagem somente do fármaco, sem promover a passagem de nanopartículas do meio acceptor para o receptor e superestimar a quantidade de fármaco liberado para o meio.

No presente trabalho, foram empregadas para o estudo de liberação *in vitro*, doses infinitas (aproximadamente 300 mg de hidrogel). Segundo o guia 28 da *Organization for Economic Co-Operation and Development* (OECD), quantidades entre 1 e 10 mg/cm² são consideradas doses finitas para veículos semissólidos. Altas doses minimizam a possibilidade de depleção da substância permeante sendo consideradas constantes e infinitas (SELZER et al., 2013) e permitem o cálculo de parâmetros como o fluxo no *steady-state* (OECD, 2004).

A Figura 4.11 reporta os resultados obtidos no estudo de liberação *in vitro* da DEX a partir das formulações do gel contendo o fármaco livre (GD), o gel contendo as NCD- (GNCD-) e o gel contendo as NCD+ (GNCD+).

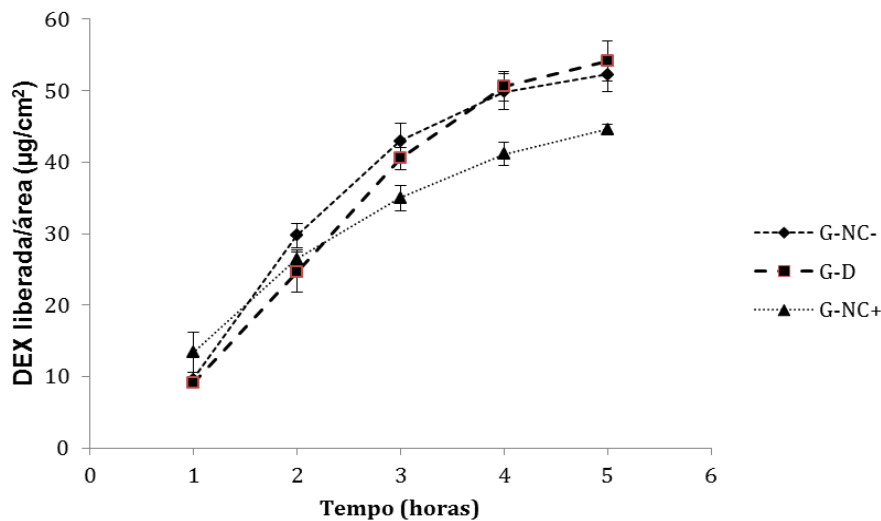


Figura 4.11. Perfil de liberação *in vitro* da DEX a partir das formulações semissólidas do tipo gel usando célula de difusão de Franz (n = 3).

De acordo com o perfil de liberação *in vitro* obtido (Figura 4.11), o GNCD promoveu a liberação de $52,29 \pm 2,35 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ e o GD de $54,16 \pm 2,76 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ após 5 horas, sem diferença estatisticamente significativa entre ambas formulações (ANOVA; $p > 0,05$). No entanto, a formulação GNCD+ apresentou a menor quantidade de DEX liberada após 5 horas ($44,57 \pm 0,69 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), sendo esta significativamente diferente das outras duas formulações (ANOVA, $p \leq 0,05$). O fluxo foi também calculado, a partir do coeficiente angular da porção linear da curva obtida após plotar a quantidade de DEX liberada versus a raiz quadrada do tempo. Os valores de fluxo para as duas formulações também não apresentaram diferença estatística entre si (GD: $42,6 \pm 1,3 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}^{-1/2}$ e GNCD-: $45,7 \pm 3,8 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}^{-1/2}$; ANOVA, teste de tukey; $p > 0,05$). Por outro lado, o fluxo calculado para a formulação GNCD+ ($29,6 \pm 1,8 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}^{-1/2}$) foi reduzido e significativamente diferente quando comparado às outras duas formulações (ANOVA, teste de tukey, $p \leq 0,05$) demonstrando a modulação da liberação.

Devido às características de biodegradabilidade, biocompatibilidade e propriedades mecânicas flexíveis, a PCL é um dos polímeros mais estudados para liberação controlada de fármacos e na área de engenharia de tecidos (DASH e KONKIMALLA, 2012). No entanto, no presente trabalho, não houve diferença entre a formulação de hidrogel contendo o fármaco livre e a formulação contendo o fármaco encapsulado em nanocápsulas de núcleo lipídico (LNC) preparadas com PCL. Uma

das hipóteses levantadas para esse resultado é a possibilidade da DEX estar mais associada à superfície da partícula ou até mesmo uma parte não associada.

Em 2013, Oliveira e colaboradores propuseram uma estratégia inovadora para determinar a distribuição do fármaco em LNC preparadas com PCL. Nesse trabalho os autores demonstraram a utilização do valor do Log D como o parâmetro físico-químico para essa abordagem. O log D é o logaritmo do coeficiente de distribuição octanol-água que representa a lipofilicidade de uma molécula. Suspensões aquosas de LNC carregadas de fármacos com diferentes log D, como por exemplo, aciclovir, diclofenaco de sódio, melatonina, indometacina e éster de indometacina, foram avaliadas quanto à capacidade de carregamento e eficiência de encapsulação. Dessa forma, foi estabelecido uma correlação entre seis grupos de possíveis distribuições de fármaco nas LNC e os valores de log D.

Partindo desse pressuposto, o log D da DEX foi calculado através do software ChemSketch. O valor encontrado para a DEX foi de 1,87. A partir deste valor e considerando a proposta de Oliveira e colaboradores (2013), a DEX pode ser classificada no grupo III, no qual o fármaco está em parte disperso no núcleo e na parede polimérica e outra parte dissolvido na água da suspensão aquosa. Isso poderia explicar porque o gel contendo a LNC carregada de DEX (GNCD-) neste trabalho não demonstrou um controle na liberação do fármaco, já que a DEX está provavelmente em grande parte associada na interface polímero/água e outra parte dissolvida na água.

Entretanto, a formulação semissólida contendo NC+ (GNCD+) demonstrou controlar a liberação do fármaco. Esse resultado pode ser atribuído à estrutura supramolecular diferente entre as NCD+ e NCD-. A presença de uma maior quantidade de TCM no núcleo oleoso nas NCD+ (2 vezes maior que nas NCD-) associado à carga de superfície positiva devido ao revestimento polimérico catiônico resultam em uma estrutura supramolecular diferente das NCD-. É importante salientar que o algoritmo do log D proposto por Oliveira e colaboradores (2013) não se aplica para as NCD+, que não apresentam composição e organização similar às NCD- ou LNC.

Entretanto, mesmo não controlando a liberação da DEX a partir da formulação GNCD-, não se pode descartar a hipótese de uma modulação na penetração e permeação cutânea deste fármaco associado às nanocápsulas em relação à

formulação com o fármaco livre. Ensaios para avaliar a retenção e a absorção percutânea são necessários para avaliar essa hipótese.

Em conclusão, neste capítulo foi relatado o desenvolvimento de nanocápsulas poliméricas carregadas com DEX, com propriedades diferenciadas de superfície (catiônica ou aniônica), que apresentaram características físico-químicas adequadas para um carreador de tamanho nanoscópico direcionado para aplicação tópica. Isso foi demonstrado após incorporação desses sistemas coloidais em hidrogéis já que estes apresentaram características físico-químicas adequadas para administração cutânea. Porém, é importante destacar que as suspensões de nanocápsulas contendo DEX aqui estudadas não apresentaram estabilidade física superior a 3 dias sendo que a sua incorporação nos hidrogéis foi realizada em até 24 horas após a sua preparação. Além disso, há risco de contaminação microbiológica devido à elevada quantidade de água presente em sua composição (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). Considerando os estudos de liberação *in vitro*, a associação da DEX às nanocápsulas de superfície catiônica preparadas com Eudragit[®] RS100 alterou o perfil de liberação deste fármaco a partir dos hidrogéis. No entanto, estudos de penetração e permeação cutânea configuram uma etapa necessária para avaliar o comportamento desses nanocarreadores nas diferentes camadas da pele e validar essas formulações como sistema para liberação controlada e entrega direcionada da DEX nas camadas viáveis da pele.

5. CAPÍTULO 2

Partículas submicrométricas preparadas por atomização vibracional: obtenção, caracterização, e estudos *in vitro* de liberação, penetração e permeação cutânea.

5.1 Introdução

A atomização vibracional é uma técnica de preparação de pós ultrafinos cujas partículas podem apresentar tamanho nas escalas micro- e nanométrica. Seu princípio se baseia na geração de uma frequência, através de um atuador piezoelétrico que, por sua vez, gera intensa vibração sobre uma membrana de aço inoxidável e com poros de tamanho definido (4, 5,5 ou 7 μm) permitindo a elaboração de um fino aerossol de gotículas a partir de uma solução aquosa ou orgânica. Sob constante fluxo de ar laminar, as gotículas geradas são introduzidas numa câmara de secagem com temperatura controlada, que promove a sua rápida secagem transformando-as em partículas sólidas. Por sua vez, o pó gerado é coletado, por repulsão eletrostática, em um cilindro coletor (HENG *et al.*, 2011; SCHMID, ARPAGAUS e FRIESS, 2011).

Essa técnica permite a obtenção de partículas sólidas de tamanho bastante reduzido – 0,3 a 2 μm (LI *et al.*, 2010; BECK-BROICHSITTER *et al.*, 2012) – em uma estreita faixa de tamanho, com altos rendimentos e a partir de pequenas quantidades de solução de partida (HENG *et al.*, 2011).

Nesse contexto, partículas de tamanho submicrométrico foram preparadas utilizando o equipamento Nano Spray Dryer B-90[®], a quarta geração de spray dryers do fabricante suíço Büchi. A dexametasona (DEX), um fármaco da classe dos glicocorticóides foi selecionada como molécula modelo devido seu extenso uso no tratamento de doenças dermatológicas e reações adversas associadas ao seu uso (BELTRANI, BARSANTI e BIELORY, 2005; HENGGE *et al.*, 2006; SCHÄCKE, DÖCKE e ASADULLAH, 2002). DEX associada a partículas poliméricas submicrométricas com aplicação para administração pulmonar foram desenvolvidas recentemente por nosso grupo de pesquisa (FONTANA *et al.*, 2013). Porém, até o presente momento não são encontrados na literatura informações a respeito do potencial para aplicação tópica de partículas submicrométricas empregando o Nano Spray Dryer[®]. Dessa maneira, a hipótese deste trabalho foi estudar a viabilidade de aplicação tópica de DEX associada a partículas poliméricas submicrométricas (poli (ϵ -caprolactona) ou não-poliméricas quando incorporadas na fase dispersa de emulsões óleo em água (o/a) preparadas através de processo a frio e com um sistema emulsionante polimérico almejando a administração cutânea. Essas formulações têm sido descritas na literatura como emulgéis, devido às

características de uma emulsão e de um gel na fase dispersante ou externa (ALEXANDER *et al.*, 2013). Além disso, outro aspecto questionado foi se essas partículas, quando presentes em formulações semissólidas, poderiam promover controle de liberação e qual seria sua influência na localização do fármaco nas camadas da pele.

Neste capítulo será apresentado o artigo submetido para publicação no *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* abordando a obtenção dessas partículas poliméricas submicrométricas contendo DEX e o desenvolvimento de formulações para uso tópico para sua incorporação, na forma de cremes. Para avaliar se a atomização vibracional influencia a liberação do fármaco a partir do veículo, formulações contendo partículas submicrométricas preparadas com ou sem o polímero foram comparadas com uma formulação contendo o fármaco livre. Considerando que micro e nanopartículas podem modular a quantidade e localização de fármacos no interior da pele, no artigo também serão apresentados os estudos comparativos de penetração e permeação cutânea *in vitro* da DEX para as três formulações de cremes: contendo o fármaco livre (C-D), com partículas submicrométricas não-poliméricas (C-SNP) e contendo partículas submicrométricas poliméricas (C-SP).

Este capítulo gerou o artigo intitulado ***Submicron polymeric particles prepared by vibrational spray-drying: semisolid formulation and skin penetration/permeation studies*** que foi submetido para publicação no ***European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics***. Um resumo dos principais resultados segue a seguir e substitui as páginas 85 – 122:

Micro- e nanopartículas compreendem sistemas de entrega de fármacos e têm sido estudados com o objetivo de superar os desafios relacionados à classe dos corticosteroides tópicos. A DEX foi selecionada como fármaco modelo por ser um dos corticosteroides tópicos mais utilizados no tratamento de doenças cutâneas e também devido seus efeitos adversos extensivamente documentados na literatura. A técnica de atomização vibracional permite a preparação, em apenas uma única etapa, de partículas na escala submicrométrica. No entanto, não há relatos na literatura descrevendo o potencial de partículas obtidas por essa técnica para aplicação na via tópica. Dessa maneira, pós de DEX associada a partículas submicrométricas poliméricas (PS) e não-poliméricas (PSN) foram preparados utilizando a técnica de atomização vibracional, empregando o equipamento Nano Spray Dryer B-90. Os pós obtidos apresentaram-se na forma de aglomerados de partículas esféricas de tamanho na escala submicrométrica, com teor próximo do teórico. A microscopia Raman confocal foi utilizada como técnica para investigar a distribuição da DEX, verificando-se uma distribuição homogênea do fármaco nas partículas preparadas. A viabilidade de incorporar as partículas submicrométricas em formulações tópicos foi também estudada. As partículas foram dispersas na fase oleosa de emulsões. As emulsões, aqui denominadas de cremes, foram caracterizadas quanto às características organolépticas, pH, distribuição granulométrica, tamanho médio de partícula, comportamento reológico e teor de fármaco. Todos os cremes apresentaram aspecto homogêneo, pH próximo do neutro, comportamento reológico não-newtoniano do tipo plástico, teor de fármaco próximo do teórico e distribuição granulométrica similar, sendo adequados para administração tópica. O creme contendo PS apresentou o melhor controle da liberação *in vitro* do fármaco em relação às demais formulações. No estudo de penetração cutânea *in vitro*, o creme contendo PS aumentou a quantidade de fármaco tanto no estrato córneo quanto nas camadas-alvo da pele (epiderme viável

e derme), mostrando-se uma estratégia promissora para entrega do fármaco na pele.

6. DISCUSSÃO GERAL

A classe dos corticóides tópicos (CT) é uma das mais amplamente empregadas na área dermatológica para o tratamento de doenças como psoríase e dermatite atópica. Como muitos desses fármacos foram descobertos na década de 60, há muita informação a respeito de sua eficácia assim como de seus efeitos adversos. A natureza físico-química do fármaco e do veículo influenciam diretamente a potência, que é a medida da eficácia dos CT na administração tópica (WIEDERSBERG, LEOPOLD e GUY, 2008). Dependendo da doença, área e extensão de aplicação, tempo de administração, dose e veículo, são indicados grupos de CT, de acordo com sua potência. A dexametasona (DEX) pertence ao grupo dos CT com muito baixa potência. Mesmo assim, o seu uso tópico, especialmente prolongado, pode causar uma série de efeitos adversos locais e até mesmo sistêmicos.

Nesse cenário, pode-se lançar mão dos sistemas de liberação micro e nanoparticulados de maneira a diminuir o risco de absorção percutânea além de aumentar a penetração dos CT nas camadas alvo da pele, como a epiderme. A pesquisa e a aplicação tecnológica de nanopartículas é uma das estratégias atuais para a administração, liberação e vetorização de fármacos para diferentes áreas do organismo, incluindo a via tópica (PAPAKOSTAS *et al.*, 2011) e a transdérmica (CEVC e VIERL, 2010).

Neste trabalho foram abordadas duas estratégias no sentido de superar os desafios dessa classe de fármacos. Primeiramente, suspensões de nanocápsulas poliméricas carregadas com DEX foram preparadas e incorporadas em hidrogéis (Capítulo 1). Num segundo momento, partículas de tamanho submicrométrico com o fármaco associado foram obtidas empregando a técnica de preparo e secagem por atomização vibracional (Capítulo 2). Formulações tópicas do tipo emulsão o/a, chamadas de cremes devido sua consistência, foram desenvolvidas para dispersão dessas partículas sólidas e administração cutânea.

Dessa forma, no primeiro capítulo, foram preparadas e caracterizadas suspensões aquosas de nanocápsulas poliméricas através do método de deposição interfacial do polímero pré-formado permitindo a obtenção de partículas com tamanho de 150 a 200 nm, com distribuição unimodal e estreita faixa de tamanho. Foram preparados dois tipos de nanocápsulas, de acordo com o tipo de polímero empregado, gerando nanopartículas de superfície catiônica (NC+) e superfície

aniônica (NC-). Géis hidrofílicos (hidrogéis) foram preparados para veicular as NC assim como o fármaco não encapsulado (livre), previamente disperso em polissorbato 80. Essas formulações semissólidas também foram caracterizadas e mostraram-se adequadas para uso tópico uma vez que apresentaram pH compatível com a pele (levemente ácido), teor de DEX próximo ao teórico e apresentaram população nanométrica na formulação semissólida. Além disso, para os hidrogéis foi observado comportamento reológico do tipo plástico, satisfatório para administração cutânea. Em seguida, os hidrogéis foram submetidos a estudo de liberação *in vitro*. A formulação GNCD- não modulou a liberação, apresentando resultado similar ao gel contendo a DEX livre (GD). Entretanto, foi possível observar controle da liberação para o gel contendo as NC de superfície catiônica (GNCD+). Pode-se sugerir que essa modulação do perfil de liberação foi devido à maior quantidade de TCM presente no núcleo das nanocápsulas NCD+ (em relação às NCD-) além da presença da carga de superfície catiônica proveniente do recobrimento polimérico metacrílico que podem ter encapsulado melhor a DEX. É importante ressaltar, que essas nanocápsulas não seguem o modelo de distribuição do logD proposto por Oliveira e colaboradores (2013), que aplica-se para nanocápsulas de núcleo lipídico, como é o caso das NC-.

No segundo capítulo desta dissertação, foi abordado outra estratégia de sistema de liberação de fármacos para avaliar uma possível melhora na performance do controle da liberação da DEX. Assim, foram investigadas partículas poliméricas submicrométricas preparadas pela técnica de atomização vibracional para as quais foram alcançados os resultados mais interessantes no controle de liberação. Nesse capítulo também foram apresentados os estudos *in vitro* de penetração e permeação cutânea conduzidos para essas formulações.

Com o uso do equipamento Nano Spray Dryer[®] (lançado em 2009 pela Büchi) foi possível aplicar a técnica de secagem vibracional para obtenção de partículas na escala submicrométrica utilizando como polímero a PCL. A PCL é dos materiais poliméricos com amplo uso na preparação de micro e nanopartículas, incluindo carreadores para uso tópico (POHLMANN *et al.*, 2013). Uma solução orgânica primária (acetona:água, 20:1, v/v) contendo o fármaco, polímero e tensoativo assim como os parâmetros de processo tais como temperatura de entrada (55 °C), membrana (4 µm) e fluxo de ar (110 L/min) foram empregados baseados no estudo

prévio de Fontana e colaboradores (2013). As partículas poliméricas apresentaram diâmetro médio inferior a 1 µm enquanto que aquelas preparadas sem o polímero exibiram diâmetro médio próximo a 520 nm. Em ambos os casos as partículas foram obtidas na forma de pós e apresentaram morfologia esférica com superfície rugosa, organizadas na forma de aglomerados. No caso das partículas não-poliméricas, estas apresentaram tamanho médio inferior ao obtido em outro trabalho do grupo (752 ± 310 nm) para partículas preparadas a partir de uma solução orgânica (acetona) contendo DEX e lauril sulfato de sódio (Durlí *et al.*, 2013). Essa diferença pode ser atribuída à solução orgânica de partida que continha uma proporção de sólidos maior (0,505% p/v) do que a utilizada no presente trabalho (0,12% p/v).

Para viabilizar a administração de partículas submicrométricas de DEX pela via tópica, foi necessário desenvolver um veículo no qual essas partículas pudessem ser incorporadas. A escolha do veículo é fundamental e pode influenciar a segurança, eficácia e aceitação da formulação final pelo paciente (DANIELS e KNIE, 2007). Devido ao caráter altamente hidrofóbico do polímero e também da fraca solubilidade em água do fármaco, uma emulsão do tipo o/a foi escolhida como formulação semissólida. Nesta formulação, a fase dispersa ou interna constituída de gotículas de óleo e um sistema emulsionante permitiu adequada dispersão das partículas. Além disso, o sistema emulsionante em questão, uma mistura de copolímero, óleo mineral e um tensoativo, foi capaz de formar emulsões cuja fase externa aquosa foi espessada por uma rede polimérica formadora de gel, com propriedades de liberação prolongada do fármaco. Essa combinação emulsão e gel tem sido descrita na literatura como “emulgel”, uma tecnologia de liberação de fármacos relativamente recente e em expansão. Dentre suas vantagens podem ser citadas sua fácil aplicação tópica, toque não oleoso melhora da estabilidade física das formulações e liberação controlada do fármaco. No caso de moléculas lipofílicas, estas devem ser previamente liberadas das gotículas e depois difundir pela matriz polimérica (ALEXANDER *et al.*, 2013).

Shanin e colaboradores (2011) desenvolveram emulgéis veiculando o antifúngico clotrimazol que foi dissolvido na fase oleosa contendo óleo de jojoba e Span 60, a qual foi posteriormente vertida na fase aquosa contendo Brij e polímeros dispersos do tipo carbômero e/ou hidroxipropilmetil celulose. O aumento da viscosidade da fase aquosa levou a uma diminuição da quantidade liberada do

fármaco. Diferentemente deste estudo e outros encontrados na literatura (ALEXANDER *et al.*, 2013; MOHAMED, 2004), a proposta de formulação neste trabalho se constituiu no emprego de um sistema emulsionante contendo óleo, tensoativo e polímero capaz de formar uma emulsão o/a ao mesmo tempo em que a fase externa é geleificada. Além disso, o processo empregado não necessita de aquecimento, o que constitui uma economia na fabricação, além de viabilizar a incorporação das partículas submicrométricas, sem riscos com relação à estabilidade físico-química da PCL e da DEX. Para facilitar o entendimento e devido à consistência e à aparência, as emulsões o/a preparadas neste trabalho foram chamadas de cremes.

A caracterização físico-química dos cremes demonstrou que essas formulações apresentaram pH próximo do neutro. Os teores de DEX foram próximos ao teórico (0,5 mg/g) e os perfis granulométricos foram unimodais para a maioria das formulações, com excessão do C-D. No entanto, não foi possível diferenciar o creme branco, assim como o creme com o fármaco não encapsulado dos cremes contendo as partículas submicrométricas em relação ao diâmetro médio de partícula. Esses resultados se devem à co-existência de populações de tamanho nanométrico tanto dos carreadores poliméricos ou não poliméricos, quanto das gotículas da fase interna da emulsão.

Outra característica avaliada de grande relevância é o estudo da reologia. Todas as formulações apresentaram comportamento não-newtoniano, no qual a viscosidade diminui em função da tensão de cisalhamento. As quatro formulações exibiram fluxo do tipo plástico, no qual é necessário superar uma força para que o sistema comece a fluir (KIM *et al.*, 2003). Essas características são desejadas em formulações de uso tópico porque facilitam a espalhabilidade, melhoram a estabilidade física e ainda podem desempenhar papel importante na liberação controlada de fármacos (ALVES, RAFFIN e FAGAN, 2011). A adição das partículas submicrométricas não provocou mudança na viscosidade plástica das formulações, assim como no tipo de comportamento reológico.

Sabendo que a liberação controlada é um dos objetivos mais desejados em sistemas de liberação como nanopartículas e micropartículas, o estudo conduzido em células de difusão de Franz com membrana sintética demonstrou que o creme contendo as partículas submicrométricas poliméricas promoveu o melhor controle da

liberação da DEX ao longo do tempo. A presença da matriz polimérica na qual a DEX está associada e distribuída nessas partículas foi decisiva para a melhora significativa do perfil de liberação do fármaco. A microscopia Raman confocal comprovou através da aquisição dos espectros que todos os componentes foram encontrados, tanto nas partículas submicrométricas poliméricas quanto não-poliméricas, com uma distribuição homogênea em toda extensão da amostra. Quando comparado os fluxos dos cremes com os hidrogéis, os primeiros apresentam uma faixa bastante inferior ($11 - 20 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}^{1/2}$) aos segundos ($29 - 45 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}^{1/2}$), demonstrando o melhor controle de liberação do fármaco.

Numa segunda etapa, o perfil de penetração e permeação cutânea *in vitro* foi também mensurado em um estudo cinético ao longo de cinco intervalos de tempo (2, 4, 8, 10 e 12 horas). O creme contendo as partículas poliméricas submicrométricas permitiu a constituição de um efeito reservatório no EC, no qual a quantidade de fármaco encontrado nas fitas foi aumentando significativamente com o tempo, enquanto que o efeito inverso se observou para o creme contendo o fármaco livre. Esse aumento gradativo da quantidade de fármaco no EC pode ser considerado um “efeito depot”, no qual a DEX se acumula permitindo a sua liberação lenta para as camadas viáveis adjacentes.

Nos estudos subsequentes de extração da DEX nas camadas viáveis (epiderme e derme), foi então constatado uma quantidade de fármaco significativamente superior para a formulação com as partículas poliméricas submicrométricas. Esse acúmulo da quantidade de DEX quantificada na epiderme e na derme vai de encontro com a hipótese levantada no início desse trabalho, de que partículas de tamanho reduzido podem se acumular nos sulcos e nos apêndices cutâneos e aumentar a concentração do fármaco na camada alvo. Apesar de não terem sido realizados estudos para avaliar a penetração das partículas por essa via, essa inferência pode ser realizada com base nas recentes publicações sobre nanopartículas nessa área (ALVAREZ-ROMAN *et al.*, 2004; LADEMANN *et al.*, 2013; PROW *et al.*, 2011; RABER *et al.*, 2014; TOLL, *et al.*, 2004). Em 2011, Patzelt e colaboradores avaliaram a penetração folicular *in vitro* utilizando pele de porco de partículas submicrométricas de PLGA com diferentes tamanhos (122 a 1.000 nm). Partículas foram detectadas em maior profundidade nos folículos conforme houve o aumento do tamanho de partícula entre 400 a 700 nm ($122 < 230 < 300 < 470 < 643$

nm). No entanto, para as partículas maiores (860 nm), a penetração foi menor. Essas diferenças podem ser devido à estrutura dos folículos pilosos. Dessa maneira, o mecanismo provável de acúmulo da DEX nas diferentes camadas cutâneas a partir do creme contendo partículas poliméricas submicrométricas aqui estudado é provavelmente a via apêndice. No caso da formulação com as partículas não-poliméricas submicrométricas, apesar do tamanho médio inferior (520 nm), não foi constatado melhora no acúmulo do fármaco na epiderme viável e na derme.

Além disso, não foi observada diferença na quantidade de DEX permeada para o meio receptor a partir do creme contendo partículas poliméricas submicrométricas quando comparado ao creme com o fármaco não encapsulado e ao creme com partículas não-poliméricas, demonstrando que não houve aumento do risco de absorção sistêmica para a DEX a partir da formulação desenvolvida.

Nesse contexto, pode-se sugerir que seria possível diminuir a dose de CT a ser administrada topicamente, permitindo prevenir possíveis eventos adversos e conseqüentemente aumentar o índice terapêutico.

Além disso, foi demonstrado que a escolha do carreador de tamanho submicrométrico, a seleção criteriosa dos constituintes do veículo e sua forma galênica são fundamentais para o sucesso da formulação final na liberação e distribuição do fármaco na pele. Pela primeira vez, foi demonstrado o potencial das partículas submicrométricas preparadas por atomização vibracional para aplicação como sistema de liberação controlada e entrega direcionada de fármaco para a via tópica.

7. CONCLUSÕES

- ✓ Suspensões de nanocápsulas poliméricas contendo DEX foram preparadas pela técnica de nanoprecipitação com características tecnológicas adequadas. Tanto as nanocápsulas preparadas com poli(ϵ -caprolactona) quanto com Eudragit[®] RS100 originaram partículas de tamanho médio em torno de 200 e 150 nm, potencial zeta negativo e positivo, respectivamente, com pH ácido (5,7 a 5,9) e teor de DEX próximo ao teórico (0,5 mg/mL);
- ✓ Os hidrogéis contendo DEX associada às nanocápsulas com superfície aniônica ou o fármaco livre não apresentaram diferença no perfil de liberação do fármaco. No entanto, o hidrogel contendo DEX associada às nanocápsulas de superfície catiônica promoveu liberação controlada do fármaco;
- ✓ Partículas submicrométricas não-poliméricas e poliméricas com DEX associada foram preparadas em processo de uma única etapa pela técnica de secagem por atomização vibracional apresentando tamanho médio de partícula na faixa submicrométrica (PS: 975 nm e PNP: 523), alta taxa de associação (90 a 100%) e teor de fármaco próximo ao teórico (PS: 467 mg/g e PNP: 835 mg/g de pó) mostrando-se um excelente método de preparação para carreadores de fármacos;
- ✓ As análises de microscopia Raman confocal demonstraram que ambas partículas submicrométricas apresentaram distribuição homogênea dos constituintes (fármaco, tensoativo, com ou sem polímero) em toda estrutura do carreador;
- ✓ Foi possível trabalhar com pequenos volumes de solução orgânica de partida (105 mL) e obter rendimento elevado para as partículas submicrométricas poliméricas (> 80%). No entanto, para as partículas atomizadas sem polímero o rendimento do pó coletado foi baixo (< 40%);
- ✓ A associação da DEX às partículas submicrométricas modificou o perfil de liberação *in vitro* do fármaco a partir do veículo semissólido, quando comparado à mesma formulação contendo o fármaco livre. Ainda, estes

resultados foram superiores na presença da poli(ϵ -caprolactona), levando ao melhor controle da liberação. Como essas formulações apresentaram o melhor controle de liberação do que aquelas contendo nanocápsulas poliméricas, foram selecionadas para estudar a penetração e permeação cutânea *in vitro*;

- ✓ Os estudos de penetração cutânea *in vitro* demonstraram que os cremes contendo as partículas submicrométricas poliméricas ocasionaram um efeito reservatório do fármaco no estrato córneo, além de maior quantidade do fármaco na epiderme viável e na derme em comparação com o creme com o fármaco livre e o creme com partículas submicrométricas não-poliméricas;
- ✓ A preparação de partículas submicrométricas por atomização vibracional se constitui uma nova estratégia para liberação controlada de corticóides tópicos do veículo para pele, melhorando a sua vetorização para as camadas alvo da pele;
- ✓ Analisando o conjunto de resultados desta dissertação, é possível sugerir que sistemas semissólidos (hidrogéis ou cremes) com características adequadas para administração tópica podem ser obtidos a partir da incorporação de partículas nanométricas ou submicrométricas, preparadas tanto pela técnica de nanoprecipitação, quanto de atomização vibracional.

8. REFERÊNCIAS

ALVAREZ-ROMÁN, R. et al. Skin penetration and distribution of polymeric Nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, v. 99, n. 1, p. 53-62, 2004.

ALVES, P. M.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Semisolid topical formulations containing nimesulide-loaded nanocapsules, nanospheres or nanoemulsion: development and rheological characterization. **Die Pharmazie**, v. 60, n. 12, p. 900-904, 2005.

ALVES, M. P. et al. Human skin penetration and distribution of nimesulide from hydrophilic gels containing nanocarriers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 341, n. 1, p. 215-220, 2007.

ALVES, M. P.; RAFFI, R. P.; FAGAN, S. B. Rheological behavior of semisolid formulations containing nanostructured systems. In: **Nanocosmetics and nanomedicines: new approaches for skin care**. Springer, 2011, p. 37-45.

ALEXANDER, A et al. Approaches for breaking the barriers of drug permeation through transdermal drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 164, n. 1, p. 26-40, 2012.

ALEXANDER, A. et al. Recent expansions in an emergent novel drug delivery technology: Emulgel. **Journal of Controlled Release**, v. 171, n. 2, p. 122-132, 2013.

ANDRADE, D. F.; FONTANA, M. C.; BECK, R. C. R. Evaluation of three synthetic membranes as limiting barrier for in vitro drug release studies from hydrogels containing polymeric nanocapsules. *In press*, **Current Nanoscience**, 2014.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Brasília, DF, 2003.

ARIAS, J.L. Liposomes in drug delivery: a patent review (2007-present). **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 23, n. 11, p. 1399-1414, 2013.

ARPAGAUS, C.. A novel laboratory-scale spray dryer to produce nanoparticles. **Drying Technology**, v. 30, n. 10, p. 1113-1121, 2012.

BABA, K.; NISHIDA, K. Steroid nanocrystals prepared using the nano spray dryer b-90. **Pharmaceutics**, v. 5, n. 1, p. 107-114, 2013.

BARNES, H. A. **A handbook of elementary rheology**. Aberystwyth,, England: University of Wales, Institute of Non-Newtonian Fluid Mechanics, 2000.

BECK, R.; GUTERRES, S.; POHLMANN, A. **Nanocosmetics and nanomedicines: new approaches for skin care**. Springer, 2011.

BECK, R. C. R. et al. Nanoparticles containing dexamethasone: physicochemical properties and anti-inflammatory activity. **Acta Farm. Bonaerense**, v. 22, n. 1, p. 11-5, 2003.

BECK, R. C.R. et al. Spray-Dried Polymeric Nanoparticles for Pharmaceuticals: A Review of Patents. **Recent Patents On Drug Delivery & Formulation**, v. 6, n. 3, p. 195-208, 2012.

BECK-BROICHSITTER, M. et al. Characterization of novel spray-dried polymeric particles for controlled pulmonary drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 158, n. 2, p. 329-335, 2012.

BELTRANI, V. S.; BARSANTI, F. A.; BIELORY, L. Effects of glucocorticosteroids on the skin and eye. **Immunology and Allergy Clinics of North America**, v. 25, n. 3, p. 557-580, 2005.

BOUWSTRA, J.A. ET AL. Role of ceramide 1 in the molecular organization of the stratum corneum lipids. **Journal of Lipid Research**, v. 39, n. 1, p. 186-196, 1998.

BOUWSTRA, J.A.; HONEYWELL-NGUYEN, P.L. Skin structure and mode of action of vesicles. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, p. S41-S55, 2002.

BRAZZINI, B.; PIMPINELLI, N. New and established topical corticosteroids in dermatology, **American Journal of Clinical Dermatology**, v. 3, n. 1, p. 47-58, 2002.

BUCHI Labortechnik AG. Nano Spray Dryer B-90 Commercial Brochure. Flawil; Switzerland: 2009

BÜRKI, K.; JEON, I.; ARPAGAU, C.; BETZ, G. New insights into respirable protein powder preparation using a nano spray dryer. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 408, n. 1, p. 248-256, 2011.

BURKHOLDER, B. Topical corticosteroids: an update. **Current Problems in Dermatology**, v. 12, n. 5, p. 222-225, 2000.

CAMPBELL, C.S.; CONTRERAS-ROJAS, L.R.; DELGADO-CHARRO, M.B.; GUY, R. H. Objective assessment of nanoparticle disposition in mammalian skin after topical exposure, **Journal of Controlled Release**, v. 162, n. 1, p. 201-207, 2012.

CEVC, G.; BLUME, G.; SCHÄTZLEIN, A. Transfersomes-mediated transepidermal delivery improves the regio-specificity and biological activity of corticosteroids in vivo. **Journal of Controlled Release**, v. 45, n. 3, p. 211-226, 1997.

CEVC, G.; VIÉRL, 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.

CONTRI, R. V. et al. Chitosan hydrogel containing capsaicinoids-loaded nanocapsules: An innovative formulation for topical delivery. **Soft Materials**, v. 8, n. 4, p. 370-385, 2010.

CONTRI, R. V. et al. Combined Effect of Polymeric Nanocapsules and Chitosan Hydrogel on the Increase of Capsaicinoids Adhesion to the Skin Surface. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 10, n. 5, p. 820-830, 2014.

COUVREUR, P. et al. Nanocapsule technology: a review. *Critical reviews in therapeutic drug carrier systems* 19.2 (2002): 99-134.

DANIELS, R.; KNIE, U. Galenics of dermal products—vehicles, properties and drug release. **Journal Der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft**, v. 5, n. 5, p. 367-383, 2007.

DASH, T.K.; KONKIMALLA, V.B. Poly-ε-caprolactone based formulations for drug delivery and tissue engineering: A review. **Journal of Controlled Release**, v. 158, n. 1, p. 15-33, 2012.

DESAI, P. R. et al. Topical delivery of anti-TNFα siRNA and capsaicin via novel lipid-polymer hybrid nanoparticles efficiently inhibits skin inflammation in vivo. **Journal of Controlled Release**, v. 170, n. 1, p. 51-63, 2013.

DILLEN, Kathleen et al. Evaluation of ciprofloxacin-loaded Eudragit® RS100 or RL100/PLGA nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 314, n. 1, p. 72-82, 2006.

DURLI, T. L. et al. Innovative approach to produce submicron drug particles by vibrational atomization spray drying: influence of the type of solvent and surfactant. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, n. 0, p. 1-10, 2013.

DRAGICEVIC-CURIC, N. et al. Temoporfin-loaded liposomal gels: Viscoelastic properties and in vitro skin penetration. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 373, n. 1, p. 77-84, 2009.

ELIAS, P. Integrated functions of the stratum corneum: implications for an optimal skin care regimen. **Skin Allergy News**, v. 6, 2005.

ELIAS, P.M.; WAKEFIELD, J.S. Skin barrier function In: **Nutrition for Healthy Skin**. Springer Berlin Heidelberg, 2011. p. 35-48.

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

FARAGE, M. A. et al. Intrinsic and extrinsic factors in skin ageing: a review. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 30, n. 2, p. 87-95, 2008.

FEDERMAN, DANIEL G.; FROELICH, CATHERINE W.; KIRSNER, ROBERT S. Topical psoriasis therapy. **American Family Physician**, v. 59, n. 4, p. 957-62, 964, 1999.

FERENCE, J.; LAST, A. R. Choosing topical corticosteroids. **American Family Physician**, v. 79, n. 2, 2009.

FESSI, H. et al. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 55, n. 1, p. R1-R4, 1989.

FIALHO, S. L.; BEHAR-COHEN, F.; SILVA-CUNHA, A. Dexamethasone-loaded poly (ϵ -caprolactone) intravitreal implants: A pilot study, **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 68, n. 3, p. 637-646, 2008.

FIEL, L. A. et al. Diverse deformation properties of polymeric nanocapsules and lipid-core nanocapsules, **Soft Matter**, v. 7, n. 16, p. 7240-7247, 2011.

FRIEDRICH, R. B. et al. Development and physicochemical characterization of dexamethasone-loaded polymeric nanocapsule suspensions, **Quimica Nova**, v. 31, n. 5, p. 1131-1136, 2008.

FRIEDRICH, R. B. et al. Drying Polymeric Drug-Loaded Nanocapsules: The Wet Granulation Process as a Promising Approach, **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 10, n. 1, p. 616-621, 2010.

FRIEDRICH, R. B. et al. Tablets Containing Drug-Loaded Polymeric Nanocapsules: An Innovative Platform, **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 10, n. 9, p. 5885-5888, 2010.

FONTANA, M. C. **Desenvolvimento de formulações farmacêuticas contendo raloxifeno empregando os métodos de deposição interfacial de polímero pré-formado ou secagem por atomização vibracional**. 2013. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, Porto Alegre, 2013.

FOUAD, S. A. et al. Microemulsion and poloxamer microemulsion-based gel for sustained transdermal delivery of diclofenac epolamine using in-skin drug depot: In vitro/in vivo evaluation, **International Journal of Pharmaceutics**, V. 453, n. 2, p.569-578, 2013.

FUCHS, E. Scratching the surface of skin development, **Nature**, v. 445, n. 7130, p. 834-842, 2007.

GENINA, E. A. et al. In vitro and in vivo study of dye diffusion into the human skin and hair follicles. **Journal of Biomedical Optics**, v. 7, n. 3, p. 471-477, 2002.

GUIDANCE Topical Dermatologic Corticosteroids: in vivo Bioequivalence, 1995. Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm070234.pdf> ≥. Acesso em 24 jan. 2014.

GUTERRES, S. S.; ALVES, M. P.; POHLMANN, A. R. Polymeric nanoparticles, nanospheres and nanocapsules, for cutaneous applications. **Drug Target Insights**, v. 2, p. 147, 2007.

HARDING C. R. The stratum corneum: structure and function in health and disease. **Dermatologic Therapy**, v. 17, n. s1, p. 6-15, 2004.

HASANOVIC, A. et al. Chitosan-tripolyphosphate nanoparticles as a possible skin drug delivery system for aciclovir with enhanced stability. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 61, n. 12, p. 1609-1616, 2009.

HENG, D. et al. The nano spray dryer B-90. **Expert opinion on drug delivery**, v. 8, n. 7, p. 965-972, 2011.

HENGGE, U. R. et al. Adverse effects of topical glucocorticosteroids, **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 54, n. 1, p. 1-15, 2006.

HUUSKONEN, Jarmo; SALO, Marja; TASKINEN, Jyrki. Neural network modeling for estimation of the aqueous solubility of structurally related drugs. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 86, n. 4, p. 450-454, 1997.

ISHII, H. et al. Evaluation of the Skin Blanching of Topically Applied Steroids Using a Chroma Meter in Animals. **Experimental animals/Japanese Association for Laboratory Animal Science**, v. 61, n. 2, p. 147, 2012.

JÄGER, E. et al. Sustained release from lipid-core nanocapsules by varying the core viscosity and the particle surface area. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 5, n. 1, p. 130-140, 2009.

JOSHI, M. Role of Eudragit in targeted drug delivery. **International Journal of Current Pharmaceutical Research**, v. 5, p. 58-62, 2013.

JUNGERSTED, J. M. et al. Lipids and skin barrier function—a clinical perspective. **Contact Dermatitis**, v. 58, n. 5, p. 255-262, 2008.

KUMARI, A.; YADAV, S. K.; YADAV, S. C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 75, n. 1, p. 1-18, 2010.

KIM, J.-Y. et al. Rheological properties and microstructures of Carbopol gel network system. **Colloid and Polymer Science**, v. 281, n. 7, p. 614-623, 2003.

KÜLKAMP, I. C. et al. Stabilization of lipoic acid by encapsulation in polymeric nanocapsules designed for cutaneous administration. **Química Nova**, v. 32, n. 8, p. 2078-2084, 2009.

LADEMANN, J. et al. Drug delivery with topically applied nanoparticles: science fiction or reality. **Skin pharmacology and physiology**, v. 26, n. 4-6, p. 227-233, 2013.

LEE, S. H. et al. Nano spray drying: a novel method for preparing protein nanoparticles for protein therapy. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 403, n. 1, p. 192-200, 2011.

LI, X. et al. Nanoparticles by spray drying using innovative new technology: The Büchi Nano Spray Dryer B-90. **Journal of Controlled Release**, v. 147, n. 2, p. 304-310, 2010.

LOPEZ, R. F. V.; COLLETT, J. H.; BENTLEY, M. V. L. B. Influence of cyclodextrin complexation on the in vitro permeation and skin metabolism of dexamethasone, **International Journal of Pharmaceutics**, v. 200, n. 1, p. 127-132, 2000.

MADISON, K. C. Barrier function of the skin: "la raison d'etre" of the epidermis. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 121, n. 2, p. 231-241, 2003.

MAHERANI, B. et al. Liposomes: a review of manufacturing techniques and targeting strategies. **Current Nanoscience**, v. 7, n. 3, p. 436-452, 2011.

MAK, W. C. et al. Triggering of drug release of particles in hair follicles. **Journal of Controlled Release**, v. 160, n. 3, p. 509-514, 2012.

MATINKHOO, S. et al. Spray-dried respirable powders containing bacteriophages for the treatment of pulmonary infections. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 100, n. 12, p. 5197-5205, 2011.

MEIDAN, V. M.; BONNER, M. C.; MICHNIAK, B. B. Transfollicular drug delivery—is it a reality?. **International journal of pharmaceutics**, v. 306, n. 1, p. 1-14, 2005.

MENGUAL, O. et al. Characterisation of instability of concentrated dispersions by a new optical analyser: the TURBISCAN MA 1000. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 152, n. 1, p. 111-123, 1999.

MENON, G. K. New insights into skin structure: scratching the surface. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, p. S3-S17, 2002.

MILAO, D. et al. Hydrophilic gel containing nanocapsules of diclofenac: development, stability study and physico-chemical characterization. **Pharmazie**, v. 58, n. 5, p. 325-329, 2003.

MOHAMED, M. I. Optimization of chlorphenesin emulgel formulation. **The AAPS journal**, v. 6, n. 3, p. 81-87, 2004.

MONTENEGRO, L. et al. Idebnone-loaded solid lipid nanoparticles for drug delivery to the skin: In vitro evaluation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 434, n. 1, p. 169-174, 2012.

MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 385, n. 1, p. 113-142, 2010.

MÜLLER, R. H.; MÄDER, K.; GOHLA, S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery—a review of the state of the art. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 50, n. 1, p. 161-177, 2000.

MURTHY, S. N. (Ed.). **Dermatokinetics of therapeutic agents**. CRC Press, 2011.

NEUBERT, R. H.H. Potentials of new nanocarriers for dermal and transdermal drug delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 77, n. 1, p. 1-2, 2011.

OECD, Guidance document for the conduct of skin absorption studies, OECD, Paris, 2004.

OLEJNIK, A. GOSCIANSKA, J.; NOWAK, I. Active compounds release from semisolid dosage forms. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 101, n. 11, p. 4032-4045, 2012.

OLIVEIRA, C. P. et al. An algorithm to determine the mechanism of drug distribution in lipid-core nanocapsule formulations. **Soft Matter**, v. 9, n. 4, p. 1141-1150, 2013.

OREN, A. et al. In human epidermis, β -defensin 2 is packaged in lamellar bodies. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 74, n. 2, p. 180-182, 2003.

OURIQUE, A. F. et al. Improved photostability and reduced skin permeation of tretinoin: development of a semisolid nanomedicine. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 79, n. 1, p. 95-101, 2011.

PAESE, K. et al. Semisolid formulation containing a nanoencapsulated sunscreen: effectiveness, in vitro photostability and immune response. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 5, n. 3, p. 240-246, 2009.

PAPAKOSTAS, D. Nanoparticles in dermatology. **Archives of Dermatological Research**, v. 303, n. 8, p. 533-550, 2011.

PARK, H. Y. et al. Cellular mechanisms regulating human melanogenesis, **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 66, n. 9, p. 1493-1506, 2009.

PARK, K. No penetration of nanoparticles through intact skin. **Journal of Controlled Release**, v. 162, n. 1, p. 258, 2012.

PATZELT, A. et al. Selective follicular targeting by modification of the particle sizes. **Journal of Controlled Release**, v. 150, n. 1, p. 45-48, 2011.

PINTO REIS, C. et al. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 2, n. 1, p. 8-21, 2006.

POHLMANN, A. R. et al. Poly (ϵ -caprolactone) microcapsules and nanocapsules in drug delivery. **Expert Opinion On Drug Delivery**, v. 10, n. 5, p. 623-638, 2013.

POLETTI, Fernanda S. et al. Polymeric Nanocapsules: Concepts and Applications. *In: Nanocosmetics and Nanomedicines*. Springer Berlin Heidelberg, 2011. p. 49-68.

POULIN, L. F. et al. The dermis contains langerin+ dendritic cells that develop and function independently of epidermal Langerhans cells. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 204, n. 13, p. 3119-3131, 2007.

PRINN, K. B.; COSTANTINO, H. R.; TRACY, M. Statistical modeling of protein spray drying at the lab scale. **AAPS PharmSciTech**, v. 3, n. 1, p. 32-39, 2002.

PROW, T. W. et al. Nanoparticles and microparticles for skin drug delivery, **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, n. 6, p. 470-491, 2011.

RABER, A. S. et al. Quantification of nanoparticle uptake into hair follicles in pig ear and human Forearm. **Journal of Controlled Release**, v. 179, p. 25-32, 2014.

SANTOS, S. S. et al. Clotrimazole-loaded Eudragit® RS100 nanocapsules: Preparation, characterization and in vitro evaluation of antifungal activity against Candida species. **Materials Science and Engineering: C**, v. 33, n. 3, p. 1389-1394, 2013.

SCHAFFAZICK, S. R., GUTERRES, S. S., FREITAS, L. D. L.; POHLMANN, A. R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003.

SCHAFROTH, N. et al. Nano and microparticle engineering of water insoluble drugs using a novel spray-drying process. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 90, p. 8-15, 2012.

SCHÄCKE, H.; DÖCKE, W.-D.; ASADULLAH, K. Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 96, n. 1, p. 23-43, 2002.

SCHMID, K.; ARPAGAUS, C.; FRIESS, W. Evaluation of a vibrating mesh spray dryer for preparation of submicron particles. **Respiratory Drug Delivery Europe**, p. 323-326, 2009.

SCHMID, K.; ARPAGAUS, C.; FRIESS, W. Evaluation of the Nano Spray Dryer B-90 for pharmaceutical applications. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 16, n. 4, p. 287-294, 2011.

SELZER, D. et al. Finite and infinite dosing: Difficulties in measurements, evaluations and predictions. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, n. 2, p. 278-294, 2013.

ŞENYİĞİT, T. et al. Lecithin/chitosan nanoparticles of clobetasol-17-propionate capable of accumulation in pig skin. **Journal of Controlled Release**, v. 142, n. 3, p. 368-373, 2010.

SENYIGIT, T.; OZER, O. Corticosteroids for Skin Delivery: Challenges and New Formulation Opportunities. 2012. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/download/get/type/pdfs/id/41177>>. Acesso em 20 fev. 2014.

SHAHIN, M. et al. Novel jojoba oil-based emulsion gel formulations for clotrimazole delivery. **AAPS PharmSciTech**, v. 12, n. 1, p. 239-247, 2011.

SIQUEIRA, N. M. et al. Innovative sunscreen formulation based on benzophenone-3-loaded chitosan-coated polymeric nanocapsules. **Skin pharmacology and physiology**, v. 24, n. 3, p. 166-174, 2011.

SMIT, P.; NEUMANN, H. A. M.; THIO, H. B. The skin-blanching assay. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 26, n. 10, p. 1197-1202, 2012.

STEIN, L. Clinical studies of a new vehicle formulation for topical corticosteroids in the treatment of psoriasis. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 53, n. 1, p. S39-S49, 2005.

SUN, Y. et al. Preparation of lithium carbonate hollow spheres by spray pyrolysis. **Crystal Research and Technology**, v. 46, n. 2, p. 173-177, 2011.

SURBER, C.; SMITH, E. W. The mystical effects of dermatological vehicles. **Dermatology**, v. 210, n. 2, p. 157-168, 2005.

TEICHMANN, A. et al. Differential stripping: determination of the amount of topically applied substances penetrated into the hair follicles. **Journal of General Internal Medicine**, v. 20, n. 5, p. 264-269, 2005.

TINKLE, S. S. et al. Skin as a route of exposure and sensitization in chronic beryllium disease. **Environmental Health Perspectives**, v. 111, n. 9, p. 1202, 2003.

TOLL, R. et al. Penetration profile of microspheres in follicular targeting of terminal hair follicles. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 123, n. 1, p. 168-176, 2004.

VEHRING, R. Pharmaceutical particle engineering via spray drying. **Pharmaceutical Research**, v. 25, n. 5, p. 999-1022, 2008.

VENTURINI, C. G. et al. Formulation of lipid core nanocapsules. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 375, n. 1, p. 200-208, 2011.

VOGT, A. et al. Follicular targeting--a promising tool in selective dermatotherapy. In: **Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings**. 2005.

WIEDERSBERG, S.; LEOPOLD, C. S.; GUY, R. H. Bioavailability and bioequivalence of topical glucocorticoids. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 68, n. 3, p. 453-466, 2008.

ZHANG, L. et al. Nanoparticles in medicine: therapeutic applications and developments. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 83, n. 5, p. 761-769, 2008.

9.1 ANEXO 1

**Validação de método analítico de doseamento da DEX
em formulações semissólidas**

Para avaliar se os métodos de extração e doseamento do fármaco estão adequados para essa finalidade, foi realizada a validação segundo os critérios preconizados pelo ICH (ICH, 2005) e pela resolução da ANVISA (BRASIL, 2003).

A DEX foi quantificada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) de acordo com método analítico previamente validado (FRIEDRICH *et al.*, 2010a). Para aumentar a sensibilidade do método, o comprimento de onda utilizado foi de 240 nm, em substituição ao de 258 nm (FRIEDRICH *et al.*, 2010b). Os parâmetros cromatográficos utilizados na validação estão descritos na Tabela 9.1.1. A determinação do teor de DEX nas formulações semissólidas, partículas submicrométricas e nanocápsulas poliméricas foi realizada em triplicata. Os resultados foram expressos em miligrama de DEX por grama de creme ou gel, miligrama de DEX por grama de pó ou miligrama de DEX por milímetro de suspensão de nanocápsulas.

Tabela 9.1.1. Parâmetros cromatográficos utilizados na metodologia analítica para doseamento da DEX em formulações semissólidas, partícula submicrométricas e nanocápsulas poliméricas

Parâmetros	Condições
Detecção	UV (λ 240 nm)
Fluxo	1,0 mL/min.
Coluna	Discovery [®] C18 column (150mm x 4.6 mm, 5 μ m, Supelco Analytical, Sigma-Aldrich)
Fase móvel	CH ₃ CN:H ₂ O (45:55 v/v)
Volume de Injeção	100 μ L
Tempo de retenção do pico da DEX	\approx 3,2 min.

Para validação do método analítico, foram avaliados os seguintes parâmetros: especificidade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação.

Linearidade

Sete níveis de concentração foram avaliados em dois dias diferentes, sendo duas curvas preparadas no mesmo dia e outra em dia consecutivo, construindo-se assim três curvas de calibração. Os níveis de concentração construídos foram: 0,25; 0,50; 0,75; 1,00; 1,50; 2,00 e 3,00 µg/mL. Pesou-se, exatamente, cerca de 0,0125 g de DEX em balão volumétrico de 25 mL contendo acetonitrila. Submeteu-se a banho ultrassom por 10 minutos e completou-se o volume com acetonitrila, obtendo-se uma concentração de 0,5 mg/mL. A partir dessa solução-mãe, alíquotas foram tomadas e diluídas com a fase móvel para obtenção dos sete níveis de concentração, conforme tabela 9.1.2. Após a preparação dos pontos das curvas, esses foram filtrados em filtro 0,45 µm (Millipore Millex-HV) para *vials* âmbar e então submetidos ao doseamento por CLAE.

Tabela 9.1.2. Preparação dos níveis de concentração das curvas de calibração para quantificação da DEX.

Concentração (µg/mL)	Volume de solução-mãe (µL)	Balão volumétrico (mL)
0,25	125	5
0,50	250	5
0,75	375	5
1,00	500	5
1,50	750	5
2,00	1000	5
3,00	1500	5

A Figura 9.1.1 apresenta a representação gráfica da curva analítica média para a quantificação da DEX obtida plotando-se a concentração da solução em relação à área do pico cromatográfico obtido.

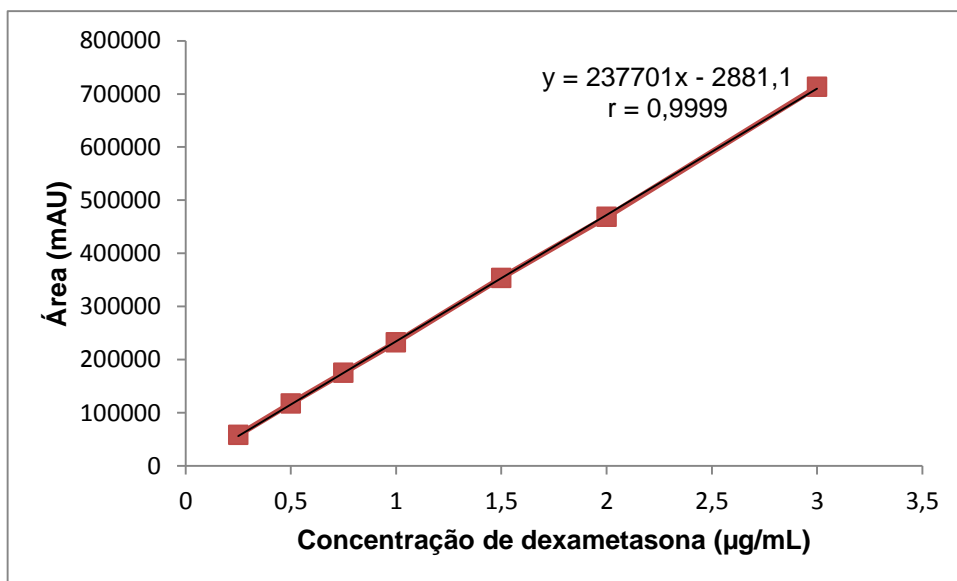


Figura 9.1.1 Curva analítica média para quantificação da DEX nas formulações semissólidas, partículas submicrométricas e nanocápsulas poliméricas

A curva analítica de dexametasona apresentou coeficiente angular igual a 237701, intersecção no eixo y igual a -2881,1 e coeficiente de correlação (r) de 0,9999, superior a 0,99, que é o valor mínimo preconizado pelos órgãos oficiais (ANVISA, 2003).

A avaliação estatística para a verificação da linearidade foi realizada por Análise de Variância (ANOVA) com intervalo de confiança de 95%. Conforme a Tabela 9.1.3 observou-se que houve regressão linear significativa e desvio da linearidade não significativo ($p > 0,05$) quando comparados os valores de $F_{\text{calculado}}$ e F_{tabelado} .

Tabela 9.1.3: ANOVA da linearidade do método analítico para quantificação da DEX nas formulações semissólidas, partículas submicrométricas e nanocápsulas

Fonte de variação	GL	SQ	Variância	F calculado	F tabelado
Entre	6	9,41461E+11	1,5691E+11	6548,5940*	2,85
Regressão linear	1	9,41357E+11	9,41357E+11	39287,1960*	4,6
Desvio de linearidade	5	1,05E+08	20932854,29	0,8736	2,96
Resíduo	14	335452670,5	23960905,03		
Total	20	9,41797E+11			

*Significativo para $p < 0,05$

Limites de detecção e de quantificação

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram determinados matematicamente através da relação entre o desvio padrão da curva analítica e sua inclinação, usando o fator multiplicador ($LD = 3,33 \times s/a$ e $LQ = 10 \times s/a$) conforme sugerido pelas normas ICH (2005) e ANVISA (2003). O valor “s” é a estimativa do desvio padrão dos coeficientes lineares e “a” é o coeficiente angular médio das 3 curvas analíticas.

Foram encontrados os seguintes valores para LD e LQ:

LD= 0,015 µg/mL

LQ= 0,046 µg/mL

Validação da extração da DEX a partir das formulações semissólidas

A extração da DEX das formulações semissólidas foi realizada pesando-se, aproximadamente, 1,0 g de formulação em balão volumétrico de 25 mL contendo acetonitrila. Submeteu-se a 2 minutos de agitação vórtex, seguido de 30 minutos de banho em ultrassom e mais 1 minuto de agitação em vórtex. Completou-se o volume com acetonitrila e em seguida, submeteu-se à centrifugação 2.300 X g por 15 minutos. Uma segunda diluição foi realizada, transferindo-se 750 µL da solução extratora anterior para um balão volumétrico de 25 mL. Completou-se o volume com a fase móvel. A amostra foi filtrada através de membrana de 0,45 µm (Millipore® Millex-HV) para *vials* âmbar e analisadas por CLAE.

Precisão

A precisão foi determinada quanto à repetibilidade (precisão intra-dia) e precisão intermediária (precisão inter-dia). Para isso, 6 soluções-amostra referentes ao nível de 1,50 µg/mL foram obtidas e injetadas para determinar a repetibilidade enquanto que 3 soluções-amostra também de 1,50 µg/mL em 3 dias diferentes foram obtidas e injetadas para determinar a precisão intermediária. Os resultados estão apresentados na Tabela 9.1.4.

Tabela 9.1.4. Avaliação dos coeficientes de variação (CV %) intra e inter-dia do método analítico para extração da DEX nas formulações semissólidas

Formulação	Precisão intra-dia (%)	Precisão inter-dia (%)
C-PS	2,33	2,86
GNCD+	1,28	1,31

A análise dos resultados do CV intra e inter-dia demonstrou que o método é preciso, pois apresentou valores inferiores a 5%, conforme preconizado pelos códigos oficiais (ANVISA, 2003).

Exatidão

A Tabela 9.1.5 apresenta o resultado médio da exatidão do método para doseamento da DEX nas formulações semissólidas. A exatidão foi calculada a partir dos resultados de nove soluções amostra para a concentração de 1,50 µg/mL.

Tabela 9.1.5. Avaliação da exatidão do método analítico para extração da DEX nas formulações semissólidas

Formulação	Exatidão média (%)
C-PS	103,35
GNCD+	104,05

Especificidade

Com o objetivo de avaliar se os componentes de cada formulação semissólida interferiam no pico da DEX, foi realizado o teste de especificidade. Para isso, o creme branco (sem adição de fármaco ou partículas submicrométricas – CB) e o gel branco (sem adição de fármaco ou nanocápsulas - GB) foi submetido ao processo de extração e analisado por CLAE. As formulações foram comparadas com aquelas contendo DEX associada a partículas poliméricas (C-PS e G-NCD-). Os componentes das formulações creme ou gel não interferiram na quantificação do fármaco, conforme cromatogramas apresentados na figura 9.1.2 e 9.1.3.

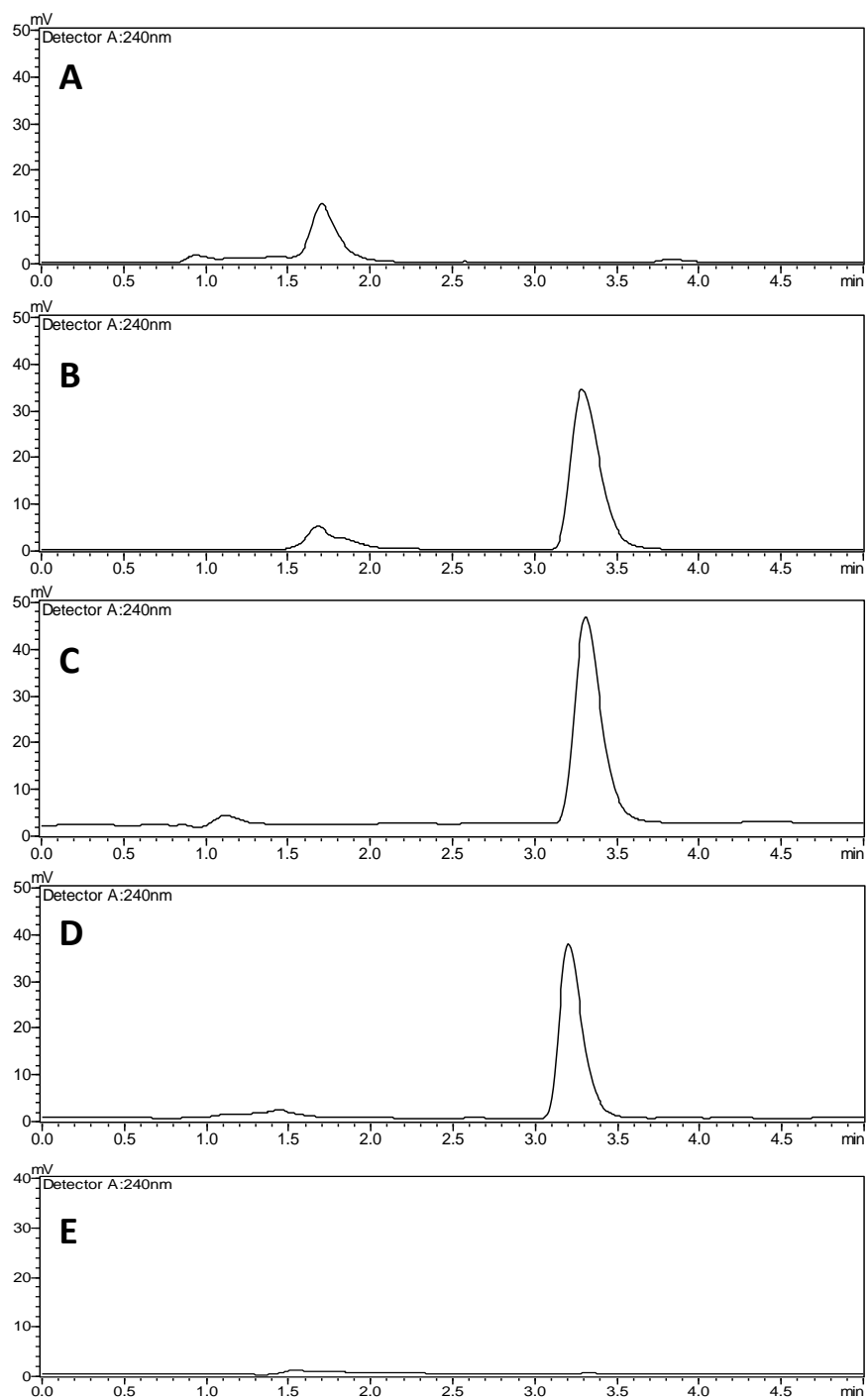


Figura 9.1.2. Cromatogramas de CLAE para o método analítico de quantificação da DEX nas formulações semissólidas do tipo creme (A: CB; B: CPS; C: partículas poliméricas submicrométricas; D: amostra da curva-padrão na concentração de 1,5 $\mu\text{g/mL}$ e E: fase móvel).

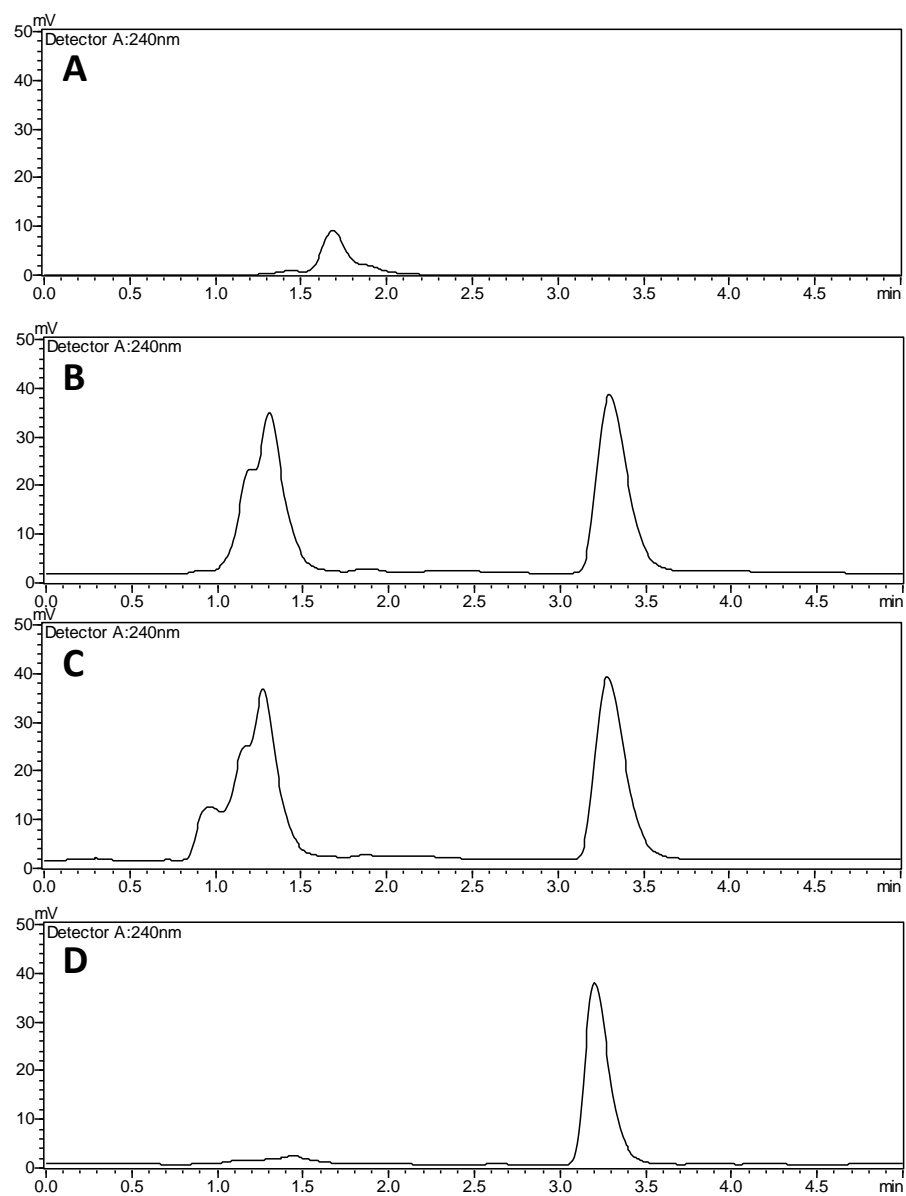


Figura 9.1.3. Cromatogramas de CLAE para o método analítico de quantificação da DEX nas formulações semissólidas do tipo gel (A: GB; B: GD; C: GNCD- e D: amostra da curva-padrão na concentração de 1,5 µg/mL).

9.2. ANEXO 2

Validação de método analítico de doseamento da DEX no compartimento receptor dos estudos de liberação e permeação *in vitro*

Escolha do meio receptor

Os tipos de meios receptores mais empregados em estudos de liberação e permeação cutânea são: água, tampão fosfato, tampão Hepes, solução salina, etc. Os meios fisiológicos são os mais recomendados, uma vez que é desejável que o meio receptor simule as condições fisiológicas da pele. No entanto, para fármacos com baixa solubilidade em água como a DEX, é necessário adicionar substâncias que promovam sua solubilização no meio receptor. Podem ser adicionados tensoativos (polissorbato 20 e 80), etanol, metanol, isopropanol, polietilenoglicol, dentre outros (OECD, 2004). Porém, quando se trata de membranas biológicas como a pele, os componentes do meio receptor não devem interagir com as camadas cutâneas adjacentes que estão em contato com o mesmo para que não ocorram alterações nas características de difusão cutânea (OLEJNIK, GOSCIANSKA e NOWAK, 2012).

Dessa maneira, foram testados diferentes tipos de meio receptor: tampão fosfato de sódio (PBS) pH 7,4 contendo polissorbato 80 nas concentrações 0,02%, 0,2% e 2,0% ou PBS pH 7,4 e etanol nas proporções 90:10 (v/v) e 70:30 (v/v). A concentração de saturação (C_s) foi calculada através da adição de um excesso de DEX em um tubo de ensaio contendo o meio, seguida de agitação em vórtex durante 2 minutos e repouso por 24 horas. Após este período, o conteúdo líquido do tubo foi submetido à centrifugação e o sobrenadante analisado por CLAE, conforme condições descritas na tabela 9.2.1.

A solução escolhida como meio receptor foi a de PBS pH 7,4 contendo 0,02% de polissorbato 80 pois não apresentou interferência no pico do fármaco e dentre os meios testados, é a combinação com menor possibilidade de dano à membrana biológica. Além disso, a solução proporcionou adequada solubilização para a DEX, que não excedeu 20% de sua concentração de saturação (C_s). Para fármacos com baixa solubilidade em água, a condição *sink* deve obedecer a uma faixa de 10 a 20% de sua C_s no meio receptor, sendo que em alguns casos esse valor pode atingir até 30% (SELZER et al., 2013; FIALHO et al., 2008).

Parâmetros de validação das análises por CLAE

A tabela 9.2.1 apresenta os parâmetros cromatográficos utilizados na validação do método analítico para quantificação da DEX no meio receptor nos estudos *in vitro* de liberação e permeação cutânea.

Tabela 9.2.1. Parâmetros cromatográficos utilizados na metodologia analítica para doseamento da DEX no meio receptor

Parâmetros	Condições
Detecção	UV ($\lambda = 240$ nm)
Fluxo	1,0 mL/min.
Coluna	Discovery [®] C18 (150mm x 4.6 mm, 5 μ m, Supelco Analytical, Sigma-Aldrich)
Fase móvel	CH ₃ CN:H ₂ O (45:55 v/v)
Volume de Injeção	50 μ L
Tempo de retenção do pico da DEX	$\approx 3,3$ min.

Para validação do método analítico, foram avaliados os seguintes parâmetros: especificidade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação.

Linearidade

Sete níveis de concentração foram avaliados em dois dias diferentes, sendo duas curvas preparadas no mesmo dia e outra em dia consecutivo, construindo-se assim três curvas analíticas. Os níveis de concentração construídos foram: 1,0; 2,0; 4,0; 8,0; 10,0; 15,0 e 20,0 μ g/mL. Pesou-se, exatamente, cerca de 0,0125 g de DEX em balão volumétrico de 25 mL contendo acetonitrila. Submeteu-se a banho ultrassom por 10 minutos e completou-se o volume com acetonitrila, obtendo-se uma solução de 0,5 mg/mL, denominada solução-mãe 1 (SM1). Uma alíquota de 1000 μ L da SM1 foi transferida para balão volumétrico de 25 mL e o volume foi completado com o meio de liberação (PBS pH 7,4:0,02% polissorbato 80), obtendo-se a solução-mãe 2 (SM2). Em seguida diferentes alíquotas da SM2 foram tomadas e diluídas

com o mesmo meio em balão volumétrico de 5,0 mL para obtenção dos sete níveis de concentração, conforme tabela 9.2.2. Após a preparação dos pontos das curvas, esses foram filtrados em filtro 0,45 µm (Millipore® Millex-HV) para *vials* âmbar e então submetidos ao doseamento por CLAE.

Tabela 9.2.2. Preparação dos níveis de concentração das curvas analíticas de DEX.

Concentração (µg/mL)	Volume de solução-mãe (µL)	Balão volumétrico (mL)
1,0	250	5
2,0	500	5
4,0	1000	5
8,0	2000	5
10,0	2500	5
15,0	3750	5
20,0	5000	5

Para a determinação do coeficiente de correlação, intersecção com o eixo y e do coeficiente angular, além da análise de variância (ANOVA), utilizou-se o Microsoft Excel 2010 para Windows.

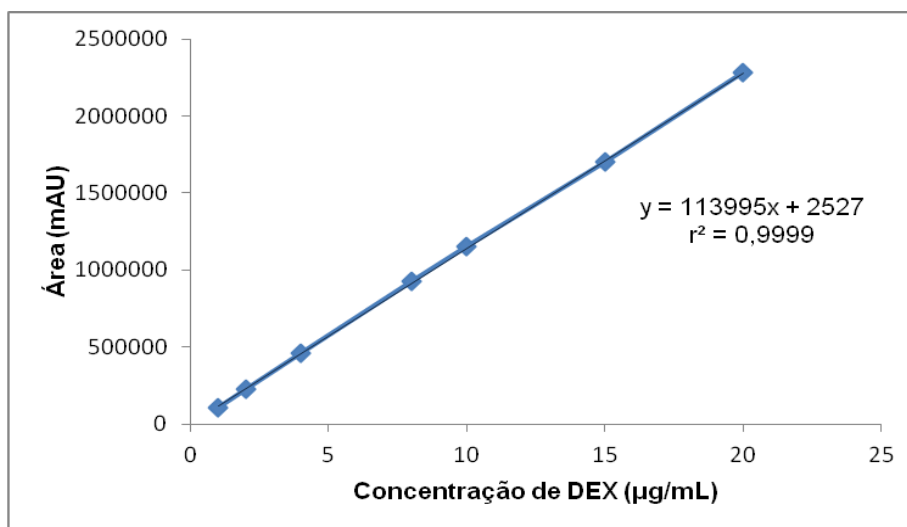


Figura 9.2.1 Curva analítica média para doseamento de DEX em meio receptor (PBS pH 7,4 contendo 0,02% de polissorbat 80)

A curva analítica média da DEX apresentou coeficiente angular igual a 113.995, intersecção no eixo y igual a 2527 e coeficiente de correlação (r) de 0,9999, superior a 0,99, que é o valor mínimo preconizado pelos órgãos oficiais (ANVISA, 2003).

A avaliação estatística para a verificação da linearidade foi realizada por ANOVA com intervalo de confiança de 95%.

Conforme a Tabela 9.2.3 observou-se que houve regressão linear significativa e desvio da linearidade não significativo ($p > 0,05$) quando comparados os valores de $F_{\text{calculado}}$ e F_{tabelado} .

Tabela 9.2.3: ANOVA da linearidade do método analítico para quantificação da DEX nas formulações semissólidas.

Fonte de variação	GL	SQ	Variância	$F_{\text{calculado}}$	F_{tabelado}
Entre	6	1,15295E+13	1,92158E+12	3097,5305*	2,85
Regressão linear	1	1,15284E+13	1,15284E+13	18583,4084*	4,6
Desvio de linearidade	5	1,10E+09	220174677,2	0,3549	2,96
Resíduo	14	9305376142	620358409,5		
Total	20	1,15388E+13			

*Significativo para $p < 0,05$

Limites de detecção e de quantificação

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram determinados matematicamente através da relação entre o desvio padrão da curva de calibração e sua inclinação, usando o fator multiplicador ($LD = 3,33 \times s/a$ e $LQ = 10 \times s/a$) conforme sugerido pelas normas ICH (2005) e ANVISA (2003). O valor “s” é a estimativa do desvio padrão dos coeficientes lineares e “a” é o coeficiente angular médio das 3 curvas analíticas.

Foram encontrados os seguintes valores para LD e LQ:

LD= 0,17 µg/mL

LQ= 0,51 µg/mL

Precisão

A precisão foi determinada quanto à repetibilidade (precisão intra-dia) e precisão intermediária (precisão inter-dia). Para isso, 6 soluções-amostra referentes ao nível de 10 µg/mL foram obtidas e injetadas para determinar a repetibilidade enquanto que 3 soluções-amostra também de 10 µg/mL em 3 dias diferentes foram obtidas e injetadas para determinar a precisão intermediária. Os resultados estão apresentados na Tabela 9.2.4.

Tabela 9.2.4. Avaliação dos coeficientes de variação (CV %) intra e inter-dia do método analítico para doseamento da DEX no meio de liberação

Solução amostra DEX	Precisão intra-dia (%)	Precisão inter-dia (%)
10 µg/mL	1,21	2,83

A análise dos resultados do CV intra e inter-dia demonstrou que o método é preciso, pois apresentou valores inferiores a 5%, conforme preconizado pelos códigos oficiais (ANVISA, 2003).

Especificidade

A especificidade foi determinada através da análise do cromatograma obtido para o meio receptor (PBS pH 7,4 contendo 0,02% de polissorbato 80) comparado com cromatogramas referente à concentração de 10 µg/mL da curva de calibração. Além disso, para verificar possível interferência da membrana de diálise e dos componentes das formulações creme e gel, um estudo de liberação *in vitro* foi simulado na célula de Franz para as formulações brancas CB e GB (após 16 horas e 8 horas, respectivamente). É possível verificar na Figura 9.2.2 que o cromatograma obtido não demonstra haver interferentes no tempo de retenção do fármaco.

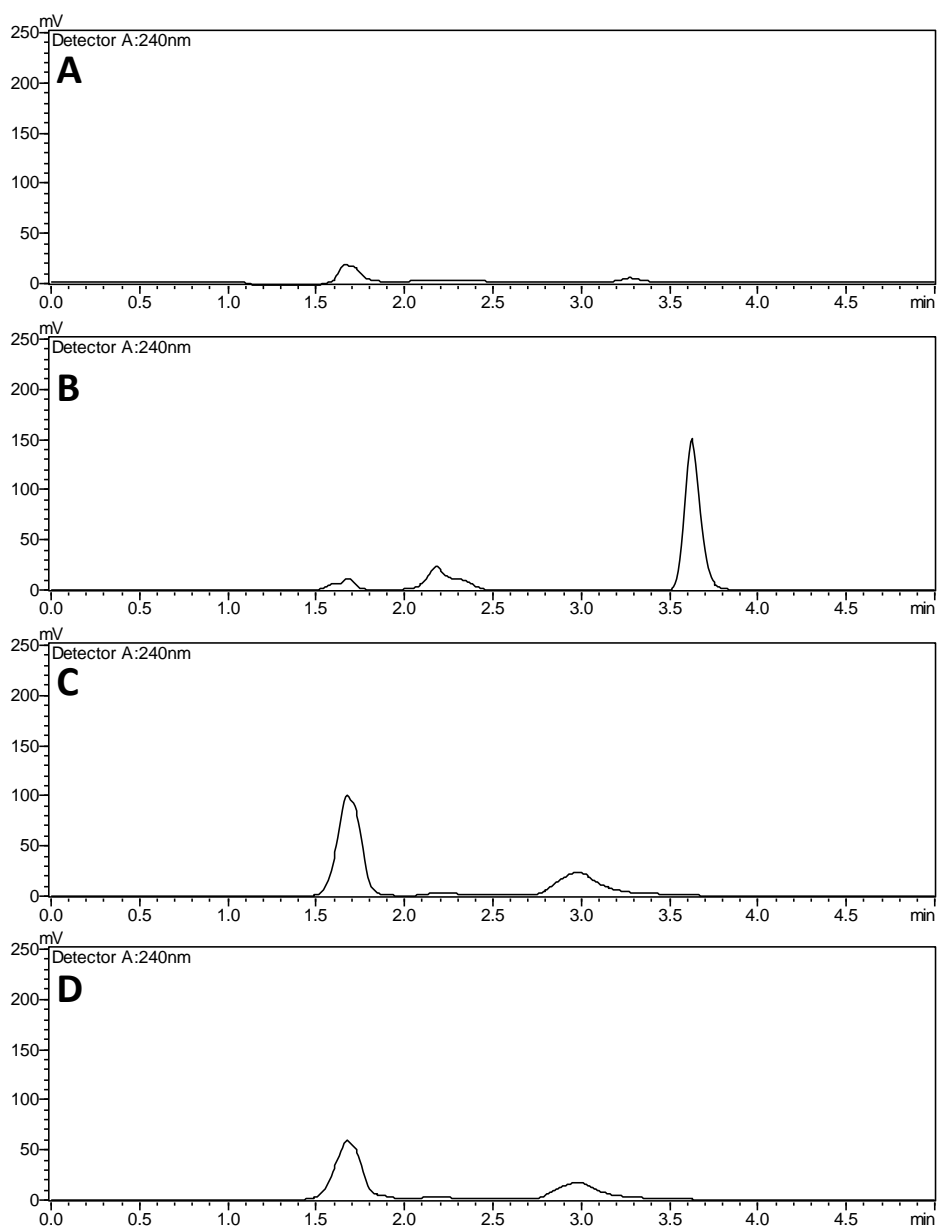


Figura 9.2.2. Cromatogramas de CLAE para o método analítico de quantificação da DEX no meio receptor (a: meio receptor; b: amostra da curva de calibração na concentração de 10,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$; C: creme branco após 16 h de liberação; D: gel branco após 8 horas de liberação).

9.3. ANEXO 3

Validação de método analítico de doseamento da DEX nos estudos de penetração cutânea *in vitro*

Parâmetros de validação das análises por CLAE

A Tabela 9.3.1 apresenta os parâmetros cromatográficos utilizados na validação do método analítico para quantificação da DEX no estrato córneo, epiderme viável e derme.

Tabela 9.3.1. Parâmetros cromatográficos utilizados na metodologia analítica para doseamento da DEX nas camadas da pele

Parâmetros	Condições
Detecção	UV ($\lambda = 240 \text{ nm}$)
Fluxo	1,0 mL/min.
Coluna	Discovery [®] C18 (150mm x 4.6 mm, 5 μm , Supelco Analytical, Sigma-Aldrich, Bellefonte, PA, EUA)
Fase móvel	CH ₃ CN:H ₂ O (45:55 v/v)
Volume de Injeção	50 μL
Tempo de retenção do pico da DEX	$\approx 3,0 \text{ min.}$

Para validação do método analítico de extração, foram avaliados os seguintes parâmetros: especificidade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação.

Linearidade

Dez níveis de concentração foram avaliados em dois dias diferentes, sendo duas curvas preparadas no mesmo dia e outra em dia consecutivo, construindo-se assim três curvas analíticas. Os níveis de concentração construídos foram: 0,02; 0,04; 0,10; 0,20; 0,50; 1,00; 2,00; 5,00; 10,00 e 20,00 $\mu\text{g/mL}$. Pesou-se, exatamente, cerca de 0,0125 g de DEX em balão volumétrico de 25 mL contendo acetonitrila. Submeteu-se a banho ultrassom por 10 minutos e completou-se o volume com acetonitrila, obtendo-se uma concentração de 0,5 mg/mL (SM1). A partir da SM1, uma alíquota de 1.000 μL foi tomada e diluída com fase móvel em balão volumétrico

de 25 mL, originando a SM2, com concentração de 20 µg/mL. Alíquotas de 25, 50, 125, 250, 500, 1.250, 2.500 e 5.000 µL foram tomadas da SM2 e diluídas com a fase móvel em balão volumétrico de 5 mL, originando as concentrações de 0,10; 0,20; 0,50; 1,00; 2,00; 5,00; 10,00 e 20,0 µg/mL. Para a preparação das concentrações 0,02 e 0,04 µg/mL, foram tomadas alíquotas de 500 e 1.000 µL da solução de concentração 0,2 µg/mL e diluídas com a fase móvel em balão volumétrico de 5 mL. Após a preparação das dez concentrações das curvas, as soluções foram filtradas em filtro 0,45 µm (Millipore® Millex-HV) para *vials* âmbar e então submetidos ao doseamento por CLAE.

A Figura 9.3.1 apresenta a representação gráfica da curva analítica média para a quantificação da DEX obtida plotando-se a concentração da solução em relação à área do pico cromatográfico obtido.

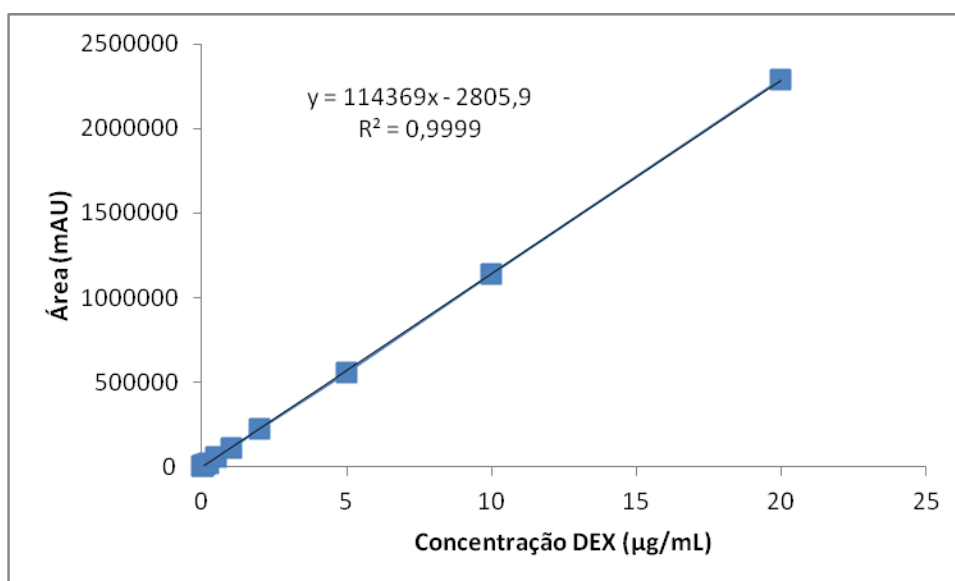


Figura 9.3.1 Curva analítica média para quantificação da DEX no meio acceptor (excesso de formulação) e nas camadas da pele (estrato córneo, epiderme viável e derme).

Tabela 9.3.2. ANOVA da linearidade do método analítico para quantificação da DEX no meio acceptor (excesso de formulação) e nas camadas da pele (estrato córneo, epiderme viável e derme).

Fonte de variação	GL	SQ	Variância	F calculado	F tabelado
Entre	9	1,4884E+13	1,65E+12	6392,3348*	2,39
Regressão linear	1	1,4884E+13	1,49E+13	57527,4351*	4,35
Desvio de linearidade	8	9,2570E+08	1,16E+08	0,4472	2,45
Resíduo	20	5174445574	2,59E+08		
Total	29	1,4889E+13			

*Significativo para $p < 0,05$

Limites de detecção e de quantificação

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram determinados matematicamente através da relação entre o desvio padrão da curva analítica e sua inclinação, usando o fator multiplicador ($LD = 3,33 \times s/a$ e $LQ = 10 \times s/a$) conforme sugerido pelas normas ICH (2005) e ANVISA (2003). O valor “s” é a estimativa do desvio padrão dos coeficientes lineares e “a” é o coeficiente angular médio das 3 curvas analíticas.

Foram encontrados os seguintes valores para LD e LQ:

LD= 0,04 µg/mL

LQ= 0,12 µg/mL

Validação de método de extração e doseamento de DEX nas fitas de *tape stripping*

Exatidão

A exatidão do método foi avaliada através da contaminação de 18 pedaços de fita adesiva (Scotch, 3M) com solução-amostra de DEX em concentrações conhecidas (0,10; 1,00 e 10,00 µg/mL). 8 mL de fase móvel foi adicionada nos tubos e submetidos à extração da seguinte maneira: agitação de 2 minutos em vórtex, banho de ultrassom durante 40 minutos e mais 1 minuto de vórtex. Uma alíquota foi tomada e filtrada com membrana 0,45µm (Millipore® Millex-HV) para vials âmbar e em seguida analisados por CLAE. A exatidão foi determinada através da diferença percentual entre a concentração teórica e a concentração experimental média para cada nível.

A Tabela 9.3.3 apresenta o percentual recuperado de DEX em relação ao adicionado e o desvio-padrão relativo entre a triplicata de cada concentração.

Tabela 9.3.3. Exatidão da extração de DEX nas fitas (n = 3)

Concentração (µg/mL)	Recuperação (%)	CV (%)
0,10	94,06	3,5
1,00	95,49	1,5
10,00	94,47	2,9

A recuperação da DEX nas fitas foi de aproximadamente 95%, com CV de até 3,5%, demonstrando que o método de extração nas fitas foi exato.

Validação de método de extração e doseamento da DEX nas amostras de pele da região abdominal de porcos fêmea

A extração da DEX a partir de pedaços de pele abdominal suína inteira foi realizada da seguinte maneira:

- 4 mL de fase móvel (CH₃CN:H₂O; 45:55 v/v) foi adicionada em tubo contendo pedaços de pele previamente picotados;
- Cada tubo foi submetido à agitação de 2 minutos em vórtex, seguido de banho de ultrassom durante 40 minutos e mais 1 minuto de vórtex;
- Os extratos foram submetidos à centrifugação de 3.700 r.p.m. durante 15 minutos;
- Uma alíquota do sobrenadante de cada tubo foi tomada e filtrada com membrana 0,45µm (Millipore® Millex-HV) para *vial* âmbar e em seguida analisada por CLAE.

Exatidão

A exatidão do método foi avaliada através da contaminação de pedaços inteiros da região abdominal da pele de porcos fêmea com solução-amostra de DEX em concentrações conhecidas (0,10; 1,00 e 10,00 µg/mL), correspondendo à baixa, média e alta concentração da curva de calibração. A extração foi realizada como descrito anteriormente. Os resultados estão apresentados na Tabela 9.3.4.

Tabela 9.3.4. Avaliação da exatidão (%) do método de extração de DEX recuperada na pele abdominal suína inteira (n = 3)

Concentração DEX (µg/mL)	Recuperação (%)	CV (%)
0,10	95,24	4,82
1,00	89,08	1,31
10,00	90,50	0,99

A recuperação da DEX a partir de pedaços de pele suína foi entre 90 e 95%, com CV variando de 1 a 5%, demonstrando que o método de extração foi exato.

Já a precisão do método foi avaliada através da determinação da repetibilidade (precisão intra-dia) e precisão intermediária (precisão inter-dia). Para

isso, pedaços de pele suína foram contaminados. Para a repetibilidade, foram analisadas 6 pedaços de pele contaminados com solução-amostra referente ao nível de 10 µg/mL enquanto que 3 pedaços de pele contaminados com a mesma concentração em 3 dias diferentes foram analisados para determinar a precisão intermediária. Os resultados estão apresentados na Tabela 9.3.5.

Tabela 9.3.5. Avaliação dos coeficientes de variação (CV %) intra e inter-dia do método de extração de DEX em pele de abdômen suíno

Solução amostra	Precisão intra-dia (%)	Precisão inter-dia (%)
DEX	n = 6	n = 9
1,00 µg/mL	1,58	2,54

Os valores de CV (%) indicam que a precisão do método está dentro das normas estabelecidas oficialmente, que preconizam limite máximo de 5 % (ICH, 2005; ANVISA, 2003).

Especificidade

A especificidade do método de extração da DEX nas diferentes camadas da pele (estrato córneo, epiderme e derme) é apresentada através dos cromatogramas na Figura 9.3.2. É possível verificar que os cromatogramas obtidos não demonstram interferentes no tempo de retenção da DEX ($\approx 3,0$ min). Na mesma figura, também foi demonstrado a especificidade de pedaços de algodão, usados para retirada do excesso de formulação na superfície cutânea.

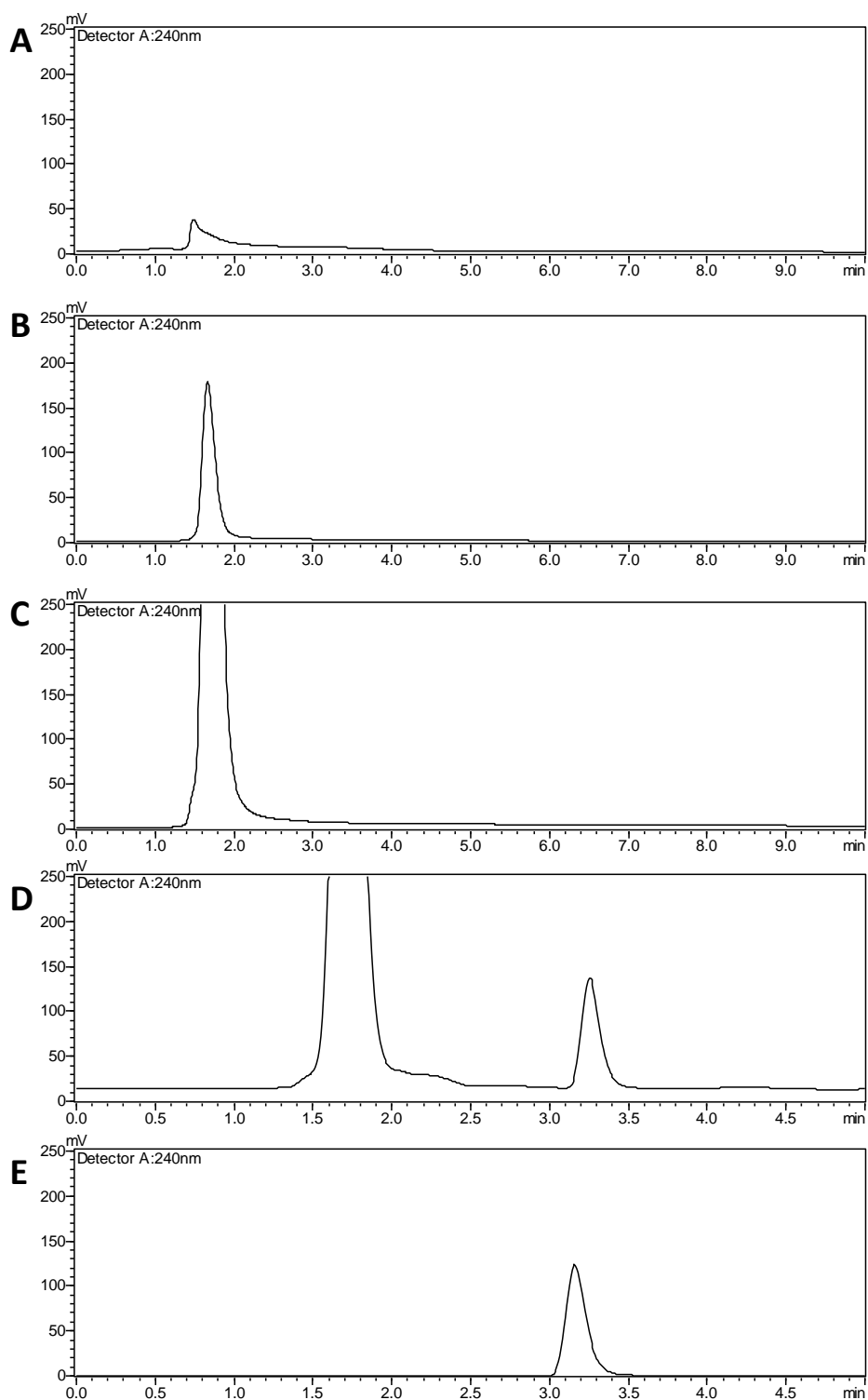


Figura 9.3.2. Cromatogramas de CLAE para o método analítico de extração e quantificação da DEX nas camadas da pele (A: *Tape stripping* do estrato córneo; B: epiderme viável; C: derme; D: amostra de pele contaminada com 10 µg/mL de solução de DEX; e E: amostra da curva de calibração na concentração de 10 µg/mL de DEX).