

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
CAMPUS URUGUAIANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

GAYA MENGUE FREITAS

**“DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, ESTUDO DA
LIBERAÇÃO *IN VITRO* E AVALIAÇÃO DA FOTOESTABILIDADE DE
NANOPARTÍCULAS CONTENDO DAPSONA E ÓLEO DE ARROZ BRUTO”**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Uruguaiana, RS, Brasil.

2015

GAYA MENGUE FREITAS

“DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, ESTUDO DA LIBERAÇÃO *IN VITRO* E AVALIAÇÃO DA FOTOESTABILIDADE DE NANOPARTÍCULAS CONTENDO DAPSONA E ÓLEO DE ARROZ BRUTO”

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação *Stricto sensu* em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Leticia Marques Colomé

Coorientador: Prof^o. Dr. Eduardo André Bender

Uruguiana

2015

GAYA MENGUE FREITAS

DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, ESTUDO DA LIBERAÇÃO *IN VITRO* E AVALIAÇÃO DA FOTOESTABILIDADE DE NANOPARTÍCULAS CONTENDO DAPSONA E ÓLEO DE ARROZ BRUTO

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação *Stricto sensu* em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Letícia Marques Colomé

Dissertação defendida e aprovada em 12 de agosto de 2015.

Banca examinadora

Prof^a. Dr^a. Letícia Marques Colomé
(Orientadora)
(UNIPAMPA)

Prof. Dr. Marcelo Donadel Malesuik
(UNIPAMPA)

Prof. Dr. Rodrigo José Freddo
(UNIPAMPA)

**Uruguaiana
2015**

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, André e Vilma, pela formação que me propiciaram, por todas as oportunidades que me concederam e pela constante preocupação.

A minha irmã Raíza pelo incentivo desde o início, sempre apoiando e dizendo que tudo daria certo.

A Prof^a. Leticia Colomé, pela oportunidade concedida e pela orientação.

Ao Prof. Fávero Reisdorfer e a Prof^a. Sandra Haas, pelo incentivo e auxílio, principalmente quando ingressei na Unipampa como aluna especial.

Aos colegas de Mestrado, especialmente Fábio Barbosa e Willian Almeida; Fábio, muito obrigada pelos ensinamentos no CLAE e por sempre me auxiliar em todas as dúvidas. Willian, obrigada por sempre estar disposto a me ajudar e pela compreensão em escutar minhas reclamações.

Aos colegas do laboratório 105, em especial a Thaís Brussulo, que me ajudou a ingressar de vez no “mundo da nano”, a Luana Michels pelas conversas e desabafos, a Lisiane Bajerski pela super ajuda com a validação, e ao Gabriel Viçozzi pela disposição em ajudar nos trabalhos “mais pesados”.

A Janaína Bastiani, minha eterna I.C., pelos finais de semana, feriados e madrugadas na Unipampa, sempre me ajudando e fazendo com que o trabalho fosse mais leve e divertido.

A Jéssica Brandão e a Graziela Scheuer, com certeza, a amizade de vocês é um presente que o Mestrado me trouxe.

Gurias, obrigada pela cumplicidade, pelos conselhos, pelas alegrias e tristezas compartilhadas e por me darem apoio todas as vezes que precisei (que não foram poucas). Vocês foram mais que importantes, foram essenciais ao longo dessa trajetória.

Enfim, agradeço a todos que de maneira direta ou indireta contribuíram para que eu conseguisse concluir essa etapa. Muito obrigada!

RESUMO

A dapsona é uma sulfona com atividade antibiótica utilizada para doenças crônicas de pele como a psoríase, contudo seu uso pela via oral apresenta elevada incidência de eventos adversos. Uma abordagem para reduzir os efeitos colaterais é a aplicação da dapsona diretamente na área afetada, o que pode ser feito com a utilização de nanocápsulas (NC), visando aumentar a permeabilidade do fármaco na pele. Dentre os componentes que podem ser utilizados como núcleo oleoso de NC, está o óleo de arroz (*Oryza sativa*), devido a suas propriedades hidratantes, umectantes, antioxidantes e de proteção à radiação UV. Desta maneira, este trabalho teve por objetivo desenvolver e caracterizar NC de dapsona com diferentes polímeros - poli- ϵ -caprolactona (NC-P) e Eudragit[®] RS100 (NC-E) - utilizando diferentes quantidades de óleo de arroz e fármaco. As NC apresentaram pH levemente ácido, diâmetro de partícula inferior a 334 nm, distribuição granulométrica estreita, potencial zeta negativo (-9,9 a -33,7 mV) e eficiência de encapsulação superior a 83%. O estudo da liberação *in vitro*, realizado em sacos de diálise, demonstrou que as NC foram eficientes em controlar a liberação da dapsona, sendo o modelo monoexponencial o mais adequado para descrever os perfis de liberação. A nanoencapsulação diminuiu a degradação fotolítica da dapsona frente à luz UVA, obtendo-se percentuais de fármaco residual de 80,6%; 91,9% e 1,4% para NC-P1, NC-E e fármaco livre, respectivamente. Além disso, hidrogéis preparados com NC-P1 (HG-NCP1) e NC-E (HG-NCE) apresentaram pH adequado para aplicação cutânea, teor próximos a 100% e comportamento não-newtoniano pseudoplástico (HG-NCE) e plástico (HG-NCP1). Na avaliação da oclusão *in vitro*, observou-se que o HG-NCP1 aumentou consideravelmente a oclusão quando comparado ao HG-NCE e ao hidrogel contendo fármaco livre. Assim, estas formulações apresentam-se como sistemas promissores para aplicação cutânea de dapsona, com potencial para constituir-se em um tratamento tópico eficaz para a psoríase.

Palavras-chave: psoríase, dapsona, óleo de arroz, nanocápsulas, liberação *in vitro*, fotoestabilidade

ABSTRACT

Dapsone is a sulfone with antibiotic activity used for chronic skin diseases such as psoriasis. The use of dapsone by oral route presents high incidence of adverse events. An approach to reduce side effects is the application of dapsone directly into the skin, which can be done by use of nanocapsules (NC), in order to increase the skin permeability of the drug. The rice (*Oryza sativa*) oil is a component that can be used as NC oil core due to its moisturizing, humectant, antioxidant and UV protection properties. Thus, this study aimed to develop and characterize dapsone-loaded NC using different polymers - poly- ϵ -caprolactone (NC-P) and Eudragit[®] RS100 (NC-E) - using different rice oil and drug concentration. The NC showed slightly acidic pH, particle diameter less than 334 nm, narrow particle size distribution, negative zeta potential (-9.9 to -33.7 mV) and encapsulation efficiency higher than 83%. The *in vitro* release study, carried out in dialysis bags, showed that both NC were effective in controlling the release of dapsone. The monoexponential equation was the most appropriate model to describe the release profiles. The nanoencapsulation decreases photolytic degradation of dapsone in UVA light, yielding drug remaining percentage of 80.6%, 91.9% and 1.4% for NC-P1, NC-E and free drug, respectively. In addition, hydrogels prepared with NC-P1 (HG-NCP1) and NC-E (HG-NCE) showed pH suitable for cutaneous application, content close to 100% and non-Newtonian pseudoplastic (HG-NCE) or plastic (HG-NCP1) behavior. *In vitro* occlusion evaluation showed that the HG-NCP1 significantly increased the occlusion factor when compared to HG-NCE and the free drug hydrogel. Thus, these formulations are promising systems for topical application of dapsone, with the potential to constitute in an effective topical treatment for psoriasis.

Keywords: psoriasis, dapsone, rice oil, nanocapsules, *in vitro* release, photostability

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Psoríase em placas. Placas vermelhas cobertas de escamas (FERRONY, 2012).	17
Figura 2. Fórmula estrutural da dapsona.	19
Figura 3. Representação de nanocápsulas (NC) e nanoesferas (NE): a) fármaco dissolvido no núcleo oleoso das NC; b) fármaco adsorvido na parede polimérica das NC; c) fármaco retido na matriz polimérica das NE; d) fármaco adsorvido ou disperso molecularmente na matriz polimérica das NE (SCHAFFAZICK et al., 2003).	20
Figura 4. Fórmula estrutural do PCL.	23
Figura 5. Fórmula estrutural do Eudragit®.	24
Figura 6. Cromatograma representativo para as formulações contendo nanocápsulas de dapsona na concentração de 15 µg/mL (Amostra) e cromatograma das suspensões sem fármaco (Branco).	39
Figura 7. Representação gráfica da curva padrão da dapsona obtida por CLAE.	40
Figura 8. Suspensão de NC-P1 (a), NC-P2 (b), NC-P3 (c) e NC-E (d)	44
Figura 9. Distribuição do tamanho de partícula de NC-P1 com base no volume de partícula.	46
Figura 10. Distribuição do tamanho de partícula de NC-P2 com base no volume de partícula.	46
Figura 11. Distribuição do tamanho de partícula de NC-P3 com base no volume de partícula.	46
Figura 12. Distribuição do tamanho de partícula de NC-E com base no volume de partícula.	47
Figura 13. Imagens obtidas por MFA das suspensões contendo (a) NC-P1 e (b) NC-E.	51
Figura 14. Perfil de liberação da dapsona a partir das formulações das NC-E e NC-P1 e perfil de dissolução da dapsona livre.	54
Figura 15. Conteúdo de dapsona residual após degradação fotolítica para o fármaco em solução de acetonitrila e para as nanocápsulas NC-P1 e NC-E.	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição das suspensões de nanocápsulas contendo dapsona.	28
Tabela 2. Composição das nanocápsulas utilizadas para validação do método analítico por CLAE	32
Tabela 3. ANOVA das áreas absolutas determinadas para a obtenção da curva padrão da dapsona através de CLAE.	41
Tabela 4. Valores de precisão interdia e intradia para a quantificação de dapsona em nanocápsulas poliméricas de óleo de arroz por CLAE.....	42
Tabela 5. Valores experimentais da exatidão do método para nanocápsulas de dapsona.	43
Tabela 6. Distribuição granulométrica por difração de laser das nanocápsulas.....	45
Tabela 7. Valores de pH das suspensões.	47
Tabela 8. Valores de potencial zeta das suspensões de nanocápsulas.	49
Tabela 9. Teor da dapsona contido nas nanocápsulas e taxa de encapsulação das suspensões.	52
Tabela 10. Parâmetros da modelagem matemática da dissolução/liberação de dapsona livre e associada a NC-P1 e NC-E utilizando as equações monoexponencial e biexponencial.	55
Tabela 11. Parâmetros de modelagem matemática da dissolução de dapsona livre e associada a NC-P1 e NC-E utilizando o modelo de Lei das Potências.....	56
Tabela 12. Coeficientes de regressão obtidos para os modelos matemáticos característicos de comportamentos não-Newtonianos.....	64
Tabela 13. Parâmetros do modelo de Herschel-Bulkley (HG-Br e HG-NCE) para formulações de hidrogéis.	65

LISTA DE ABREVIATURAS

NC: nanocápsulas;

NE: nanoesferas;

UV: ultravioleta;

PCL: Poli (ϵ -caprolactona);

NC-P1: Formulação de nanocápsula contendo 1 mg de dapsona formada por PCL e 0,15 g de óleo de arroz;

NC-P2: Formulação de nanocápsula contendo 1 mg de dapsona formada por PCL e 0,20 g de óleo de arroz;

NC-P3: Formulação de nanocápsula contendo 2 mg de dapsona formada por PCL e 0,20 g de óleo de arroz;

NC-E: Formulação de nanocápsula contendo 1 mg de dapsona formada por Eudragit RS[®] 100 e 0,15 g de óleo de arroz;

MFA: Microscopia de força atômica;

CLAE: Cromatografia a líquido de alta eficiência;

E.E: Eficiência de encapsulação;

E.D: Eficiência de dissolução;

MSC: Critério de melhor seleção;

HG-NCP1: Hidrogel contendo suspensão de NC-P1;

HG-NCE: Hidrogel contendo suspensão de NC-E;

ANOVA: Análise de variância;

DPR: Desvio padrão relativo.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	14
2.1 Objetivo Geral.....	14
2.2 Objetivos Específicos	14
3.1 Pele	16
3.2 Psoríase	17
3.3 Dapsona	19
3.4 Nanopartículas	20
3.5 Polímeros utilizados na formulação de nanopartículas para aplicação cutânea.....	22
3.6 Óleo de arroz.....	24
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
4.1 Materiais.....	27
4.2 Aparelhos e equipamentos.....	27
4.3 Métodos.....	28
4.3.1 Preparação das nanocápsulas contendo dapsona	28
4.3.2 Caracterização físico-química da suspensão de nanocápsulas poliméricas contendo dapsona	29
4.3.3 Validação de metodologia analítica por CLAE para a quantificação de suspensões de nanocápsulas contendo dapsona.....	31
4.3.4 Estudo da liberação <i>in vitro</i>	32
4.3.5 Avaliação da fotoestabilidade de dapsona contida nas nanocápsulas.....	35
4.3.7 Caracterização físico química dos hidrogéis contendo nanocápsulas de dapsona.....	35
4.3.8 Teste de oclusão <i>in vitro</i>	37
4.3.9 Análise estatística.....	38
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
5.1 Validação de metodologia analítica por CLAE para a quantificação de suspensões de nanocápsulas contendo dapsona	39
5.1.1 Especificidade	39
5.1.2 Linearidade	40
5.1.3 Repetibilidade e precisão intermediária.....	41
5.1.4 Exatidão	43

5.2 Caracterização das suspensões de nanocápsulas contendo dapsona e óleo de arroz bruto após a preparação	43
5.2.1 Determinação do diâmetro de partícula e polidispersão	44
5.2.2 Determinação de pH	47
5.2.3 Determinação do potencial zeta.....	48
5.2.4 Microscopia de força atômica	50
5.2.5 Doseamento da dapsona nas suspensões coloidais e determinação da taxa de encapsulação	51
5.3 Liberação <i>in vitro</i>	52
5.4 Avaliação da fotoestabilidade	56
5.5 Preparação e caracterização de base semissólida contendo nanocápsulas de dapsona	59
5.5.1 Microscopia de força atômica dos hidrogéis	62
5.6 Comportamento reológico das formulações semissólidas	62
5.7 Teste de oclusão <i>in vitro</i>	66
6 CONCLUSÃO.....	68
REFERÊNCIAS	70

1 INTRODUÇÃO

Doenças de pele causam grande impacto na vida das pessoas e, a psoríase está entre estas doenças. Estima-se que cerca de 3% da população mundial sofra com esta dermatose, uma inflamação crônica que pode ter influencia genética, ambiental e imunológica (DUARTE e CHEHIN, 2011).

A psoríase, do grego, erupção sarnenta, é uma doença hiperplásica devido a seu ciclo celular epidérmico ser muito mais rápido e, haver duas vezes mais células proliferativas do que na pele normal (MOREIRA e SOUZA, 2008).

A lesão característica da psoríase é uma mancha circular, com um bordo bem delimitado com fundo avermelhado e escamas espessas e esbranquiçadas (BARSOTTI et al., 2006). Existem diferentes tipos de psoríase como, psoríase crônica em placas, gutata, invertida, eritrodérmica, pustular, ungueal e artrite psoriásica, sendo que em alguns tipos o tratamento medicamentoso é estritamente necessário. Esse tratamento visa diminuir as lesões e o tempo das recidivas, melhorando, conseqüentemente, a qualidade de vida dos pacientes (RODRIGUES e TEIXIERA, 2009).

Dentre os possíveis tratamentos que podem ser utilizados nos diferentes tipos de psoríase, encontra-se a dapsona, uma sulfona com atividade anti-inflamatória e antimicrobiana (SBD, 2012). Este fármaco apresenta eficácia no tratamento pela via oral (FARHI et al., 2005), contudo, apresenta sérios efeitos adversos de magnitude e gravidade variada, tais como metemoglobinemia e anemia hemolítica, podendo também causar efeitos idiossincráticos, como agranulocitose, leucopenia, neuropatia periférica, erupções cutâneas, entre outros (SBD, 2012; FARHI et al., 2005).

Sabe-se que a utilização da dapsona pela via tópica pode minimizar ou evitar a ocorrência de efeitos adversos, uma vez que a aplicação cutânea reduz a exposição sistêmica ao fármaco. No entanto, a eficácia clínica de um fármaco administrado por via tópica é limitada, visto que a maioria dos fármacos apresenta características físico-químicas inadequadas para ultrapassar as barreiras da pele, especialmente o estrato córneo (KORTING et al., 2007; SIQUEIRA et al., 2011).

Na atualidade, o interesse pela pesquisa com o objetivo de desenvolver e explorar as potencialidades terapêuticas de sistemas carreadores para administração de fármacos é crescente. Estes sistemas, chamados nanopartículas, englobam as nanocápsulas e as nanoesferas. Estas, quando formuladas para

aplicação tópica, têm o objetivo de aumentar a permeação cutânea de substâncias ativas e diminuir os efeitos colaterais (SCHAFFAZICK et al., 2003).

As nanocápsulas são compostas por um núcleo oleoso circundado por uma matriz polimérica, enquanto as nanoesferas são constituídas somente por uma matriz polimérica, sem a presença de óleo (SCHAFFAZICK et al., 2003).

Existem incontáveis matérias-primas que podem ser utilizadas na formulação de nanocápsulas, sendo o óleo de arroz (*Oryza sativa*) uma delas. Este óleo possui frações insaponificáveis, como tocoferóis e gama-orizanol, o que pode ser útil para formulações tópicas (JULIANO et al., 2005). A indústria tem utilizado o óleo de arroz em diferentes formulações, tais como protetores solares, produtos antienvhecimento e para tratamento de algumas doenças da pele (BERNARDI et al., 2011).

Tendo em vista o exposto, o presente trabalho objetiva a formulação de nanocápsulas de óleo de arroz bruto contendo dapsona para o tratamento da psoríase. Com isso, busca-se obter uma formulação de características adequadas para o tratamento tópico desta doença.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver e caracterizar nanocápsulas poliméricas de óleo de arroz bruto, utilizando como substância ativa a dapsona visando a liberação controlada da substância ativa na pele.

2.2 Objetivos Específicos

- Preparar diferentes suspensões de nanocápsulas poliméricas, contendo dapsona, utilizando óleo de arroz bruto como núcleo oleoso das nanopartículas;
- Caracterizar as formulações em termos de parâmetros físico-químicos como tamanho de partícula, distribuição de tamanho, potencial zeta, pH, teor de fármaco, eficiência de encapsulação e morfologia;
- Realizar estudo de liberação *in vitro* da dapsona a partir das nanocápsulas poliméricas e compará-lo à dissolução do fármaco livre;
- Avaliar a fotoestabilidade das formulações de nanocápsulas visando verificar a possível proteção conferida ao fármaco pelo óleo de arroz e pelos polímeros;
- Preparar e caracterizar formulações de hidrogéis, contendo nanocápsulas de dapsona a fim de obter uma forma adequada para aplicação cutânea;
- Avaliar as características reológicas dos hidrogéis contendo nanocápsulas, comparando-as às do hidrogel controle;

- Investigar *in vitro* a capacidade dos hidrogéis em evitar a perda de água transepidermica visando sua utilização para aumentar a hidratação cutânea.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Pele

A pele é o maior órgão do corpo humano e é considerada um dos órgãos mais complexos do organismo. Desempenha diferentes funções, tais como termorregulação, resposta aos estímulos imunobiológicos e proteção frente a atritos e a radiação ultravioleta. Representa uma via interessante para administração de fármacos, pois apresenta diversas vantagens, como redução dos efeitos adversos sistêmicos causados pelos fármacos administrados via oral ou parenteral e, a possibilidade de vetorização do fármaco somente para áreas afetadas pela doença (PAESE et al., 2009; OURIQUE et al., 2011).

A pele é composta de epiderme, derme e hipoderme. A epiderme é a camada mais superficial, possuindo em torno de 100 – 150 µm de espessura, sendo formada por várias camadas de células - o estrato germinativo (camada basal), estrato espinhoso (camada espinhosa), estrato granuloso (camada granular) e estrato córneo (NEMEN e LEMOS-SENNA, 2011).

Dentre as camadas celulares da epiderme, o estrato córneo é a camada mais externa, sendo considerada a principal barreira contra microrganismos patogênicos e para a permeação de fármacos e componentes através da pele (SILVA et al., 2010).

A camada córnea é constituída por uma matriz lipídica e por queratinócitos (corneócitos), sendo estes últimos responsáveis por conferir elasticidade e resistência física e química ao tecido, enquanto os lipídios funcionam como uma das principais barreiras à perda de água e entrada de substâncias na camada córnea. Devido a estes dois constituintes do estrato córneo, a permeabilidade na epiderme é dificultada (AULTON, 2005; ZAMPIERI, 2009). Desta maneira, para que um fármaco aplicado topicamente possa exercer um efeito terapêutico local ou sistêmico, é necessário que seja capaz de atravessar esta barreira (NEMEN e LEMOS-SENNA, 2011; KORTING et al., 2007).

A derme é a camada que se localiza entre a epiderme e o tecido subcutâneo, no qual se encontram os folículos pilosos, as glândulas sebáceas e sudoríparas (AULTON, 2005; PAESE et al., 2009).

Em relação à hipoderme, esta é uma camada que une a derme aos órgãos profundos, possuindo função protetora e isolante (AULTON, 2005).

3.2 Psoríase

A psoríase é uma doença inflamatória crônica que atinge cerca de 2 a 3% da população, possuindo predileção para acometimento da pele e articulações. Não é contagiosa e atinge ambos os sexos e todas as idades, sendo mais frequente na raça branca (ARRUDA et al., 2010; BARSOTTI et al., 2006).

Esta patologia caracteriza-se pela ocorrência de lesões róseas ou avermelhadas, bem demarcadas e com bordas nítidas, recobertas de escamas secas e esbranquiçadas (Figura 1), podendo localizar-se nos cotovelos, joelhos, pés, mãos e couro cabeludo. Contudo, em alguns casos, estas lesões podem se espalhar por todo o corpo e atingir a circulação, ocasionando artrite psoriásica (BARSOTTI et al., 2006; RODRIGUES e TEIXIERA, 2009).



Figura 1. Psoríase em placas. Placas vermelhas cobertas de escamas (FERRONY, 2012).

Além dos aspectos físicos do portador, nesta doença é importante verificar também os aspectos psicossociais, pois doenças de pele podem ocasionar restrições aos pacientes, levando a quadros de ansiedade e depressão, o que pode influenciar e/ou dificultar a terapia medicamentosa da doença (MOREIRA e SOUZA, 2008; SILVA e SILVA, 2007).

As causas da psoríase ainda não estão totalmente elucidadas. Uma das possíveis causas para o início da atividade inflamatória das placas de psoríase é a produção de citocinas induzida pela interação entre linfócitos T CD4⁺, T CD8⁻, queratinócitos e células dendríticas. Isso ocorre quando linfócitos T CD4⁺ interagem

com células apresentadoras de antígenos presentes na pele, havendo ativação dos linfócitos T CD8⁺ na epiderme (DUARTE e CHEIHIN, 2011; MOREIRA e SOUZA, 2008).

Supõe-se ainda que diferentes fatores estejam relacionados ao aparecimento da atividade inflamatória que caracteriza a psoríase, tais como hereditariedade, estresse e choque emocional (BARSOTTI et al., 2006). Especula-se também que a doença esteja associada ao alcoolismo, infecções virais, diabetes, hipertensão, obesidade e outros inúmeros fatores (FERNANDES et al., 2000).

Conforme Rodrigues e Teixeira (2009), a psoríase é dividida em diferentes formas clínicas de acordo com a característica e o grau da lesão apresentada, sendo classificadas em: psoríase em placa ou vulgar; psoríase gutata; psoríase palmoplantar; psoríase inversa; psoríase eritrodérmica; psoríase pustular; psoríase ungueal e psoríase artropática.

Até o momento não existe cura definitiva para esta patologia, todavia existem diversas alternativas de tratamento que objetivam o controle da doença e diminuição das recidivas e do impacto que esta causa na vida do paciente. A escolha do tratamento depende de inúmeros fatores, tais como idade do paciente, características e grau das lesões, duração da doença, entre outros (KRUEGUER e ELLIS, 2005).

Como tratamento inicial, deve ser priorizada a aplicação de agentes terapêuticos tópicos que afetam a multiplicação de mediadores inflamatórios envolvidos na patogênese da inflamação na pele, podendo ser utilizados corticosteróides, análogos da vitamina D e imunomoduladores, tais como tacrolimus e pimecrolimus. Como adjuvantes, podem ser utilizados ceratolíticos e hidratantes, já que na psoríase ocorre ressecamento da pele (SBD, 2012).

Ainda que o tratamento tópico seja eficiente para muitos pacientes, em alguns casos o tratamento sistêmico é imprescindível. Este consiste na utilização de fármacos como acitretina, ciclosporina, metotrexato, infliximabe, dapsona e alguns imunobiológicos (ARRUDA et al., 2004).

3.3 Dapsona

A dapsona (4-4' diaminofenilsulfona) foi descoberta em 1908 e pertence à classe das sulfonas. É o fármaco de escolha no tratamento da hanseníase devido sua atividade antibiótica, sendo também utilizado para outras doenças crônicas de pele, como a psoríase (FARHI et al., 2005). Atualmente, a dapsona é comercializada sob a forma de comprimidos na dose de 50 e 100 mg (ARRAIS, 2012). Sua fórmula estrutural está representada na Figura 2.

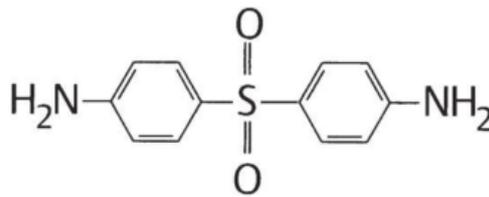


Figura 2. Fórmula estrutural da dapsona.

A dapsona apresenta-se como um pó branco, cristalino e inodoro, fotossensível, pouco solúvel em água, facilmente solúvel em acetona e levemente solúvel em etanol e metanol (ARRAIS, 2012; WOZEL, 2010). A biodisponibilidade deste fármaco fica em torno de 85% e sua meia-vida de absorção é de uma hora. A molécula de dapsona é lipossolúvel e apresenta uma excelente distribuição tecidual e intracelular. Sua excreção é predominantemente renal (90%) e, em 10% dos casos é biliar (FARHI et al., 2005; BRAGHETTO, 2007).

A utilização de dapsona pela via oral é limitada devido a sua elevada incidência de efeitos adversos, pois quando metabolizada origina hidroxilamina, responsável por efeitos como metemoglobinemia e anemia hemolítica, podendo também causar efeitos idiossincráticos, como agranulocitose, leucopenia, neuropatia periférica, erupções cutâneas, entre outros (ARRAIS, 2012; SANTOS, et al. 2012). Devido à elevada incidência de efeitos adversos, o desenvolvimento de uma formulação tópica deste fármaco se torna interessante (WOZEL, 2010). Entretanto, a maioria dos fármacos, incluindo a dapsona, apresenta características físico-químicas inadequadas para ultrapassar o estrato córneo. Apesar do avanço nas pesquisas com novas formulações farmacêuticas, apenas uma formulação tópica em gel na concentração de 5 % de dapsona está atualmente disponível no mercado, mas

ainda não é comercializada no Brasil. É produzida pela empresa Allergan sob o nome comercial de Aczone[®] e indicada para acne vulgar.

Dentro desse contexto, o crescente interesse pela pesquisa de sistemas carreadores inovadores com o objetivo de melhorar o perfil terapêutico dos fármacos administrados pela via tópica é evidente, sendo um destes sistemas as nanopartículas poliméricas.

3.4 Nanopartículas

Nanopartículas são sistemas coloidais preparados a partir de polímeros que podem ser biodegradáveis ou não. Estas estruturas possuem tamanho entre 10 e 1000 nm (SCHAFFAZICK et al., 2003).

O termo nanopartículas engloba as nanocápsulas e as nanoesferas (Figura 3) (REIS et al., 2006; SCHAFFAZICK et al., 2003).

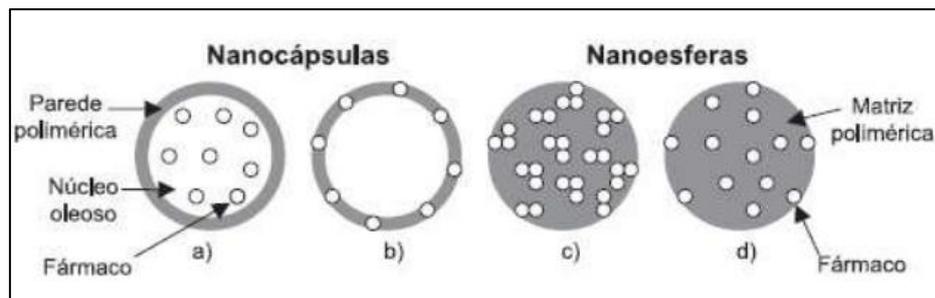


Figura 3. Representação de nanocápsulas (NC) e nanoesferas (NE): a) fármaco dissolvido no núcleo oleoso das NC; b) fármaco adsorvido na parede polimérica das NC; c) fármaco retido na matriz polimérica das NE; d) fármaco adsorvido ou disperso molecularmente na matriz polimérica das NE (SCHAFFAZICK et al., 2003).

Designam-se nanoesferas aqueles sistemas nos quais o fármaco se encontra retido ou adsorvido em uma matriz polimérica, sem a presença de núcleo. Por outro lado, nas nanocápsulas é possível identificar um núcleo oleoso envolto por uma matriz polimérica, podendo o fármaco estar dissolvido no núcleo ou adsorvido a parede da matriz (REIS et al., 2006; SCHAFFAZICK et al., 2003).

As nanocápsulas destacam-se em relação as nanoesferas devido ao fato de possuírem elevado poder de encapsulamento de substâncias e capacidade para aumentar o índice terapêutico, conseqüentemente, reduzem a toxicidade do fármaco

(BETONI, 2009; GUTERRES et al., 2007). Outra importante vantagem das nanocápsulas é a proteção que conferem a fármacos e moléculas fotossensíveis. Esta proteção é conferida pela parede polimérica, uma vez que a cristalinidade do polímero reflete e espalha a luz UV e também devido a presença do núcleo oleoso, visto que muitos óleos apresentam propriedades antioxidantes (OURIQUE et al. 2008; SANTOS et al., 2014).

Sistemas nanométricos apresentam resultados altamente satisfatórios para aplicação homogênea de substâncias tópicas, uma vez que possuem uma grande área superficial. Estes sistemas facilitam a veiculação e permitem uma aplicação adequada, devido seu pequeno tamanho de partícula (GUTERRES et al., 2007). Quando administrados pela via tópica, as nanopartículas formam um filme sobre a epiderme e diminuem a perda de água transepidérmica, devido à propriedade oclusiva que apresentam. Desta maneira, aumentam o grau de hidratação e a elasticidade da pele (FERRONY, 2012).

Considerando isto, a utilização de sistemas nanoestruturados de uso dermatológico tem sido o propósito de inúmeras pesquisas e estudos, que tem contribuído para introdução destes sistemas no mercado farmacêutico (ANGELI, 2007). O uso tópico destes sistemas visa aumentar a permeabilidade do fármaco na pele, contornar características físico-químicas indesejadas de diversas substâncias, aumentar a fotoestabilidade de moléculas, entre outros propósitos (GUTERRES et al.; 2007; SANTOS et al., 2014).

Com o intuito de avaliar a penetração cutânea de nanocápsulas contendo benzofenona, Paese (2008), realizou um estudo utilizando a técnica de *tape-stripping* em modelo de pele de porco para a retirada do estrato córneo e quantificação do fármaco nesta camada da pele. Os resultados demonstraram que o ativo nanoencapsulado penetrou na camada córnea e ficou retido superficialmente em maior quantidade do que o ativo na forma livre, veiculado em gel. Já no estudo de Betoni (2009) demonstrou-se que a formulação de um hidrogel para uso tópico contendo nanocápsulas de isotretinoína evitou a captação sistêmica do fármaco, impedindo, portanto, possíveis efeitos adversos. Além disso, a nanoencapsulação aumentou a penetração do fármaco no estrato córneo e prolongou a liberação de isotretinoína nas camadas superficiais da pele.

Objetivando avaliar a fotoestabilidade do propionato de clobetasol, Fontana e colaboradores (2009), submeteram formulações contendo o fármaco encapsulado e

livre à radiação ultravioleta por 24 horas. Ao final do experimento os autores concluíram que as nanoformulações foram capazes de aumentar a fotoestabilidade do fármaco em quase duas vezes, em comparação a sua forma livre.

Destaca-se ainda, diante do exposto, que nanocápsulas poliméricas contendo dapsona podem constituir-se em uma alternativa farmacotécnica para administração cutânea do fármaco, evitando a absorção sistêmica e os efeitos adversos comumente apresentados no uso oral. Além disso, nanocápsulas poliméricas podem garantir melhora da estabilidade da dapsona, considerando a fotoinstabilidade intrínseca da substância.

Cabe ressaltar que na literatura não foram relatados, até o momento, estudos a cerca do desenvolvimento de nanocápsulas poliméricas incluindo a dapsona, com vistas a empregar as características vantajosas destes sistemas para contornar possíveis desvantagens da utilização deste fármaco.

3.5 Polímeros utilizados na formulação de nanopartículas para aplicação cutânea

Sistemas poliméricos de liberação de fármacos são amplamente utilizados e permitem uma liberação lenta e gradual do ingrediente ativo, fazendo com que as concentrações plasmáticas do fármaco sejam mantidas em níveis terapêuticos por um período de tempo prolongado, ocasionando redução da frequência de administração e, aumento da adesão ao tratamento. Além disso, estes sistemas possuem a função de possibilitar o direcionamento a alvos específicos do organismo a ser tratado (ALMEIDA et al., 2010; ANTONOW, 2012; DE AZEVEDO, 2005).

Outra vantagem dos materiais poliméricos é a proteção conferida a fármacos e substâncias sensíveis a degradação química por luz UV, já que são semi-cristalinos e aumentam a reflexão da luz, com isso, evitam a incidência de radiação na partícula, ocasionando aumento em sua estabilidade fotolítica (ALMEIDA et al., 2010; JIMÉNEZ, et al., 2004; PERUGINI et al., 2002).

Os polímeros podem ser de origem natural ou sintética e, em geral, os de origem sintética oferecem maiores vantagens, pois podem ser adaptados através de modificações de suas propriedades durante o processo de síntese. Assim como os outros excipientes, os polímeros são selecionados de acordo com a formulação, mecanismo de liberação pretendido, modo de degradação do fármaco e

propriedades físicas, sendo a seleção adequada deste material um passo importante para se obter partículas apropriadas para a aplicação pretendida (ANTONOW, 2012; DE AZEVEDO, 2005; MILADI et al., 2014; OLIVEIRA e LIMA, 2006).

Os materiais poliméricos utilizados na preparação de sistemas carreadores devem possuir cinética de degradação adequada - não se acumulando de forma definitiva nos tecidos - biocompatibilidade, inocuidade, estabilidade e facilidade de processamento (LARA, 2008).

No que diz respeito aos polímeros utilizados na formulação de nanopartículas para aplicação cutânea, poliésteres como o poli(ϵ -caprolactona) (PCL), o poli(ácido láctico) (PLA) e o poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA), têm sido utilizados no preparo de nanocarreadores, pois são materiais bem definidos e com bom desempenho para preparação de carreadores de fármacos (ANTONOW, 2012; MEZZALIRA, 2005; MILADI et al., 2014).

O PCL que (Figura 4) possui peso molecular que pode variar de 10.000 a 80.000 g/mol, é um polímero bastante utilizado, já que possui biocompatibilidade e é biodegradável. É um material adequado para a preparação de sistemas de entrega de fármacos, pois apresenta elevada permeabilidade e não possui toxicidade (DOMINGUES et al., 2008; MILADI et al., 2014). Devido a sua lenta degradação, é utilizado para a distribuição de fármacos a longo prazo (SINHA et al., 2004).

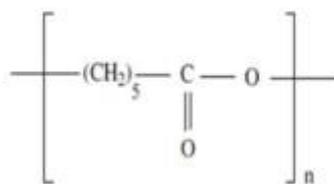


Figura 4. Fórmula estrutural do PCL.

Quando este material é utilizado como polímero formador de nanopartículas, fármacos lipofílicos geralmente ficam distribuídos uniformemente na matriz. Já os fármacos hidrofílicos tendem a mover-se no sentido da interface e permanecer na superfície da formulação (MILADI et al., 2014).

Entre outros polímeros disponíveis para a formulação de nanopartículas, estão os metacrilatos, conhecidos pelo nome comercial Eudragit[®] (Figura 5). Este polímero é um material de encapsulação comum, utilizado frequentemente pela indústria farmacêutica, com um perfil de segurança estabelecido (PEREIRA et al., 2010).

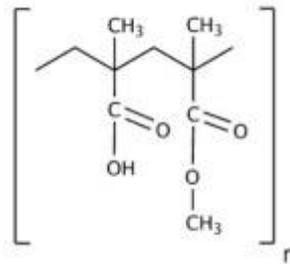


Figura 5. Fórmula estrutural do Eudragit[®].

Os metacrilatos apresentam-se em diferentes tipos e características de solubilidade, sendo que dentre os principais destacam-se os Eudragit[®] dos tipos E, L, S, RL e RS (KIBBE, 2000).

Os Eudragit[®] E, L e S possuem grupos ácidos ou alcalinos e apresentam solubilidade dependente do pH do meio. O Eudragit[®] RL possui alta permeabilidade em água, enquanto o tipo RS possui baixa permeabilidade, sendo insolúvel para valores de pH fisiológico (DAS e SURESH, 2011; DOMINGUES et al., 2008), possui carga positiva. Este polímero apresenta um baixo teor de grupos de amônio quaternário que conferem ao mesmo a capacidade de intumescer, o que pode permitir um tempo mais longo de residência de nanopartículas sobre a camada córnea, sendo uma excelente vantagem quando as formulações são destinadas a aplicação tópica (DAS e SURESH, 2011; OLIVEIRA e LIMA, 2006).

3.6 Óleo de arroz

O grão de arroz é composto por casca, endosperma, farelo e germe, sendo o farelo utilizado como ração animal e para obtenção do óleo de arroz. No farelo de arroz está contida a maior parte de óleo, variando entre 12 a 18% (CALHEIROS, 2007; PAUCAR-MENACHO et al., 2007).

O óleo do farelo bruto de arroz contém diversos sistemas enzimáticos, frações saponificáveis e insaponificáveis. Dentre os componentes saponificáveis, os quais

correspondem a 90-96% do total, estão os triacilgliceróis, diacilgliceróis, monoacilgliceróis, ácidos graxos livres e ceras. Além destes, cerca de 3 a 5% dos componentes correspondem à fração insaponificável, que são os esteróis, tocoferóis, tocotrienóis e álcoois triterpênicos (PAUCAR-MENACHO et al., 2007).

Além dos compostos saponificáveis e insaponificáveis, um componente que confere grande benefício ao óleo de arroz é o gama-orizanol, garantindo sua estabilidade por ser um potente antioxidante. A quantidade de gama-orizanol presente no óleo de arroz bruto varia de 1,5 a 2,9%. Dentre outras atividades, o gama-orizanol possui capacidade de conferir proteção contra raios ultravioleta, o que o torna um componente multifuncional para formulação de produtos cosméticos e dermatológicos tópicos para o tratamento de doenças de pele (JULIANO et al., 2005; PAUCAR-MENACHO et al., 2007).

O poder antioxidante e a capacidade de proteção solar do óleo de arroz são de extrema importância do ponto de vista farmacotécnico, já que muitas moléculas e fármacos são fotossensíveis, como é o caso da dapsona (ARRAIS, 2012). Assim, espera-se que formulações farmacêuticas, incluindo as nanoparticuladas, contendo um óleo com elevado poder antioxidante, possam garantir aumento da fotoestabilidade do fármaco veiculado.

Recentemente o óleo de arroz refinado foi utilizado na preparação de nanoemulsões de uso tópico devido às suas propriedades hidratantes e umectantes. Bernardi e colaboradores (2011) avaliaram o grau de hidratação da pele em indivíduos normais e portadores de psoríase e dermatite atópica após a aplicação de uma nanoemulsão de óleo de arroz. Os resultados deste estudo foram satisfatórios, já que a hidratação nos voluntários com pele normal foi aumentada nos tempos 30 e 60 minutos, decrescendo com o decorrer do período de teste, enquanto os indivíduos com psoríase ou dermatite atópica tiveram um aumento da hidratação cutânea no tempo 30 minutos, o qual foi mantido até os 90 minutos, sendo que estes não apresentaram queda acentuada na hidratação no decorrer do estudo. Segundo os autores, as emulsões formaram uma camada oleosa sobre pele, impedindo a perda transepidérmica de água, o que é desejável em condições de pele seca como ocorre na psoríase. Embora os resultados promissores encontrados neste estudo, sabe-se que durante o refino do óleo de arroz perde-se aproximadamente 90% do conteúdo de gama-orizanol, diminuindo a ação antioxidante conferida por este composto (PAUCAR-MENACHO et al., 2007). Na literatura não há relatos de

trabalhos que utilizem óleo de arroz bruto, o que torna o desenvolvimento de formulações farmacêuticas inovadoras contendo o óleo em seu estado bruto ainda mais promissor.

Assim, o óleo de arroz bruto caracteriza-se como um componente multifuncional para a formulação de produtos cosméticos e dermatológicos tópicos, incluindo aqueles destinados ao tratamento da psoríase, uma vez que as propriedades hidratantes, umectantes e antioxidantes deste óleo podem atuar como coadjuvantes do tratamento farmacológico desta doença.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

- Dapsona (Pureza de 99,7%) – Fragon;
- Poli (ϵ -caprolactona) Mw = 80.000 – Sigma;
- Copolímero do ácido metacrílico (Eudragit[®] RS100) – Evonik Röhm;
- Monoestearato de sorbitano (Span[®] 60) – Sigma;
- Polissorbatos 80 (Tween[®] 80) – Delaware;
- Polissorbatos 20 (Tween[®] 20) – Cromato Produtos;
- Lecitina de soja (Lipoid[®] S45) – Lipoid;
- Acetona P.A – Química Moderna;
- Ácido acético glacial P.A – Vetec;
- Óleo de arroz bruto – Camil Alimentos;
- Hidroxietilcelulose (Natrosol[®]) – Pharma Nostra;
- Água ultrapura (MilliQ[®]) - Millipore[®];
- Acetonitrila grau cromatográfico – Tedia Brasil;
- Membrana de acetato de celulose (0,45 μ m) – Millipore[®];
- Membrana de acetato de celulose para tubos de diálise (12.000-14.000 Da) - Sigma Aldrich[®];
- Papel filtro 14 μ m – J. Prolab.

4.2 Aparelhos e equipamentos

- Balança analítica - Shimadzu AY 220;
- Banho termostático – Labsynth IKA[®] EH4;
- Banho de ultrassom Unique USC - 1400 A;
- Centrífuga – Eppendorf[®] 5415 R;
- Evaporador rotatório R-210/215 - Buchi;
- Viscosímetro rotacional LVDV-II+Pro - Brookfield[®];
- Analisador de potencial Zeta - Zeta Plus[®] (Brookhaven Instruments);
- Granulômetro laser Mastersizer[®] 2000 - Malvern Instruments;

- Sistema de cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE) - Prominence (Shimadzu[®]);
- Peagâmetro - Hanna[®];
- Estufa – Nova Ética;

4.3 Métodos

4.3.1 Preparação das nanocápsulas contendo dapsona

As nanocápsulas foram preparadas conforme o método descrito por Fessi e colaboradores (1988), denominado deposição interfacial do polímero pré-formado, empregando-se a composição geral descrita na Tabela 1.

Tabela 1. Composição das suspensões de nanocápsulas contendo dapsona.

Composição	NC-P1	NC-P2	NC-P3	NC-E
Span [®] 60	0,047g	0,047g	0,047g	0,047g
Lipoid [®] S45	0,03g	0,03g	0,03g	0,03g
Óleo de arroz	0,15g	0,20g	0,20g	0,15g
PCL 80.000g/mol	0,1g	0,1g	0,1g	-
Eudragit [®] RS100	-	-	-	0,1g
Dapsona	0,01g	0,01g	0,02g	0,01g
Acetona	32 mL	32 mL	32 mL	32 mL
Tween [®] 80	0,077g	0,077g	0,077g	0,077g
Água	50 mL	50 mL	50 mL	50 mL
Volume Final	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL

Os componentes da fase orgânica foram mantidos sob agitação magnética em banho-maria à temperatura de 40°C até completa dissolução de todos os componentes. A fase orgânica homogênea foi injetada, com o auxílio de um funil, na fase aquosa contendo o tensoativo de elevado EHL (polissorbato 80 – Tween[®] 80), também mantida sob agitação magnética à mesma temperatura.

Após, a suspensão formada foi mantida sob agitação magnética e aquecimento moderados durante 10 minutos e então concentrada a um volume final de 10 mL em evaporador rotatório (R 210/215 – Buchi[®]) para eliminação do solvente

orgânico e ajuste da concentração final de dapsona. Foram preparadas, para fins comparativos, suspensões de nanocápsulas sem dapsona (nanocápsulas brancas).

Após o preparo, as formulações foram submetidas à caracterização físico-química a fim de escolher as melhores nanopartículas para dar sequência aos estudos, os quais incluíram o estudo da dissolução *in vitro*, a avaliação da fotoestabilidade e a incorporação em formulações semissólidas para investigação da perda de água transepidérmica *in vitro*, entre outros ensaios.

4.3.2 Caracterização físico-química da suspensão de nanocápsulas poliméricas contendo dapsona

As suspensões de nanocápsulas foram caracterizadas quanto ao diâmetro de partícula, pH, potencial zeta, morfologia, teor de fármaco e eficiência de encapsulação.

4.3.2.1 Determinação do diâmetro da partícula e polidispersão

O tamanho de partícula foi avaliado pela técnica de difratometria de laser utilizando o equipamento Mastersizer[®] 2000 (Malvern Instruments). Os dados de difração de laser obtidos foram avaliados utilizando o valor $d_{4,3}$, que representa o diâmetro médio baseado no volume da partícula, e ainda os valores de 10% ($d_{10\%}$), 50% ($d_{50\%}$) e 90% ($d_{90\%}$) da distribuição, que indicam a percentagem de partículas possuindo diâmetro igual ou inferior ao valor determinado. O valor do Span (Equação 1), que é um indicativo da polidispersão do sistema, também foi utilizado para a caracterização das formulações.

$$SPAN = \frac{(D_{0.9} - D_{0.1})}{D_{0.5}} \quad (\text{Equação 1})$$

4.3.2.2 Determinação de pH

A determinação de pH foi realizada em potenciômetro (Hanna[®]) calibrado com solução tampão pH 4,0 e 7,0, diretamente nas suspensões coloidais, após preparação. Os resultados representaram a média de três determinações.

4.3.2.3 Potencial Zeta

O potencial zeta das suspensões de nanocápsulas foi obtido através de eletroforese em equipamento Zeta Plus[®] (Brookhaven Instruments). Essa determinação foi realizada após diluição de 200 vezes (v/v) das suspensões de nanocápsulas em água. Os resultados foram obtidos através da média de três determinações.

4.3.2.4 Microscopia de força atômica

As características morfológicas das nanocápsulas, como forma e superfície, foram avaliadas por microscopia de força atômica (MFA) (Microscópio Agilent 5500 MFA) no Campus Bagé da Universidade Federal do Pampa, em parceria com o Grupo de Nanoestruturas, Magnetismo e Materiais Magnéticos. Imagens de MFA foram obtidas à temperatura ambiente, no modo não contato utilizando alta resolução (constante de força = 48 N/m; ressonância = 154 kHz). As imagens foram capturadas utilizando o software PicoView[®] 1.14.4 e analisadas utilizando o software PicoImage[®] 5.1. Esta análise foi realizada nas suspensões NC-P1 e NC-E.

4.3.2.5 Doseamento da dapsona nas suspensões coloidais

O conteúdo de dapsona foi determinado em todas as formulações. Para isso, as formulações coloidais foram tratadas com acetonitrila ocasionando a dissolução parcial dos polímeros e a liberação e dissolução do ativo contido no interior das nanoestruturas. O doseamento da dapsona foi realizado através de cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE), utilizando técnica adaptada por Santos e colaboradores (2012). As análises foram realizadas utilizando as condições cromatográficas descritas no item 4.3.3.

4.3.2.6 Avaliação da taxa de encapsulação de dapsona nas nanopartículas

A eficiência de encapsulação da dapsona nas nanocápsulas foi determinada pelo método de ultrafiltração-centrifugação. A porcentagem de dapsona encapsulada foi calculada pela diferença entre a concentração total na formulação (medida após a desestruturação das partículas em acetonitrila) e a concentração livre de dapsona

presente na fase aquosa (determinada no ultrafiltrado da suspensão de nanocápsulas) dividida pela concentração total multiplicada por 100. A quantificação da dapsona total e presente na fase aquosa externa foi realizada por metodologia previamente validada por CLAE. Esta avaliação foi realizada em todos os tipos de suspensões de nanocápsulas.

$$E = \frac{CT-CL}{CT} \times 100 \quad (\text{Equação 2})$$

Onde: CT é a concentração total de fármaco na amostra e CL é a concentração de fármaco livre.

4.3.3 Validação de metodologia analítica por CLAE para a quantificação de suspensões de nanocápsulas contendo dapsona

De acordo com a Resolução – RE nº 899 de 29 de maio de 2003, que determina o Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos, o processo de validação é essencial para definir se uma metodologia desenvolvida está completamente adequada aos objetivos a que se destina, a fim de se obter resultados confiáveis que possam ser satisfatoriamente interpretados.

A validação de metodologia analítica por CLAE para a quantificação de dapsona nas suspensões de nanocápsulas foi realizada de acordo a RE 899 de 29 de maio de 2003 (ANVISA, 2003) e por técnica adaptada por Santos e colaboradores (2012). Os parâmetros avaliados no desenvolvimento deste trabalho foram: especificidade, linearidade, precisão intermediária, repetibilidade, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação.

As análises foram realizadas em cromatógrafo Prominence Shimadzu utilizando detector ultravioleta em 253 nm, coluna RP-18 (250 x 4 mm, 5 µm) e fase móvel acetonitrila:solução aquosa de ácido acético glacial 1,5% (v/v) (75:25, v/v) - a um fluxo de 0,7 mL por minuto e volume de injeção de 20 µL.

Uma formulação de nanocápsulas contendo dapsona e outros componentes foi preparada para o desenvolvimento e validação do método analítico. A referida formulação está descrita na Tabela 2.

Tabela 2. Composição das nanocápsulas utilizadas para validação do método analítico por CLAE

Composição	Quantidade
Span [®] 60	0,077 g
PCL 80.000 g/mol	0,1 g
Dapsona	0,01 g
Acetona	32 mL
Tween [®] 80	0,077 g
Água	50 mL
Volume Final	10 mL

Além da formulação aqui descrita, todas as formulações nanoparticuladas desenvolvidas no âmbito deste trabalho foram avaliadas e validadas por CLAE quanto ao quesito especificidade.

4.3.4 Estudo da liberação *in vitro*

4.3.4.1 Experimentos prévios ao estudo da liberação *in vitro*

Para que o processo difusivo seja garantido ao longo de todo o estudo de liberação, este deve ser conduzido em condição *sink* (ANTONOW, 2012). Sendo assim, a solubilidade da dapsona no meio de dissolução, o qual é composto de polissorbatos 20 a 2%, foi previamente avaliada. Para tanto, uma amostra foi preparada adicionando-se uma quantidade em excesso de dapsona a um volume definido de líquido receptor (1,5 mL). Essa mistura foi submetida a vórtex durante 1 minuto e mantida em repouso por 12 horas. Após esse período, a suspensão foi centrifugada a 12.000 rpm por 5 minutos. Uma alíquota do sobrenadante foi retirada, filtrada e a concentração de dapsona foi determinada por CLAE, representando a concentração de saturação do fármaco no referido meio de dissolução. Essa informação permitiu a determinação da condição *sink* a ser utilizada, a qual foi correspondente a 10% da concentração de saturação experimentalmente determinada.

Além disso, uma curva analítica foi construída para avaliar a concentração da dapsona no meio durante o ensaio de liberação. Para isso, pesou-se o equivalente a

25 mg de dapsona, em balão volumétrico de 25 mL, tendo seu volume completado com solução aquosa de propilenoglicol 50% (v/v). A partir da solução mãe (1000 µg/mL), a curva analítica foi construída nas concentrações de 5, 10, 15, 20 e 25 µg/mL, utilizando-se polissorbato 20 a 2% (p/v) como solvente, sendo em seguida analisadas por CLAE.

4.3.4.2 Avaliação da dissolução/liberação *in vitro*

Para avaliação da dissolução/liberação *in vitro* foram utilizadas membranas de acetato de celulose (12.000-14.000 Da) (Sigma Aldrich®) como sacos de diálise. Os sacos foram hidratados com água por 12 horas antes do início da diálise. No momento do experimento, os sacos foram preenchidos com 5 mL da suspensão de nanocápsulas contendo dapsona e o mesmo volume da dapsona na forma livre (solução aquosa de propilenoglicol 50% v/v). As membranas de diálise foram incubadas em 150 mL de meio de liberação constituído de uma solução aquosa de polissorbato 20 a 2% (p/v) a 32°C, com agitação contínua.

Alíquotas de 1 mL do meio de liberação foram coletadas nos intervalos de tempo de 0,5; 1; 2; 3; 4; 6; 8; 10 e 12 horas. O meio de liberação foi repostado a cada coleta. As amostras foram filtradas em filtros com 0,45 µm de porosidade (Millipore®) e a quantidade de dapsona liberada foi avaliada por metodologia previamente validada por CLAE. O experimento foi realizado em triplicata para cada formulação avaliada e para o fármaco livre.

4.3.4.3 Avaliação estatística e modelagem matemática dos perfis de liberação

Os perfis de liberação foram construídos plotando-se a quantidade de dapsona liberada (em % da quantidade total) em função do tempo. Posteriormente, estes perfis foram avaliados pela metodologia de eficiência de dissolução (ED) (Equação 3), uma avaliação modelo independente definida pela área sob a curva de dissolução expressa como percentagem da área do retângulo que descreve 100% da dissolução em um determinado período (SAHOO et al., 2010).

$$ED = \frac{\int_0^t y \cdot dt}{y_{100} \cdot t} \times 100 \quad (\text{Equação 3})$$

Onde: y é a percentagem de fármaco no tempo t .

Adicionalmente foram utilizados métodos modelo-dependentes – monoexponencial (Equação 4), biexponencial (Equação 5) e Lei das Potências (Equação 6) (SAHOO et al., 2010). Na aplicação de métodos modelo-dependentes, a adequabilidade dos modelos aos dados experimentais foi avaliada com auxílio do programa Micro Math Scientist[®], comparando-se os modelos entre si com base em parâmetros como o critério de seleção de modelo (MSC), o coeficiente de correlação, o ajuste gráfico e a coerência dos valores encontrados para as constantes de velocidade de cada modelo.

$$\%D = 100(1 - e^{-kt}) \quad (\text{Equação 4})$$

$$\%D = 100[1 - (Ae^{-\alpha t} + Be^{-\beta t})] \quad (\text{Equação 5})$$

$$ft = a \cdot t^n \quad (\text{Equação 6})$$

Onde: $\%D$ é o percentual de fármaco dissolvido no tempo t ; α , β e κ são constantes cinéticas observadas; A e B são as concentrações iniciais de fármaco; a é a constante que incorpora características estruturais e geométricas da forma farmacêutica; n é o expoente de liberação; ft representa a liberação fracional do fármaco.

Após a determinação do modelo que melhor descreve os dados experimentais de dissolução, a Equação 7 foi utilizada para o cálculo de tempo de meia-vida de liberação para cada formulação e o fármaco livre.

$$t_{1/2} = \frac{0,693}{k} \quad (\text{Equação 7})$$

Onde k é a constante cinética determinada na modelagem dos dados.

4.3.5 Avaliação da fotoestabilidade de dapsona contida nas nanocápsulas

Devido a dapsona ser um fármaco fotossensível (ARRAIS, 2012) e considerando a proteção que pode ser conferida aos fármacos através da nanoencapsulação, este trabalho realizou a avaliação da fotoestabilidade de dapsona contida em nanocápsulas. As nanocápsulas e o fármaco livre (em solução de acetonitrila) foram inseridos em cubetas de quartzo e irradiados em câmara de fotoestabilidade utilizando luz UVA (30 W) por 6 horas, em uma distância fixa de 30 cm da fonte de luz. Transcorrido este tempo, foi retirada uma alíquota de 150 µL das amostras (fármaco livre ou suspensão de nanocápsulas) a qual foi transferida para um balão volumétrico de 10 mL e dissolvida em acetonitrila para obter a concentração teórica de 15 µg/mL. A fim de verificar a influencia da temperatura na degradação, manteve-se um termômetro dentro da câmara. A concentração de dapsona residual nas amostras após o período de irradiação foi quantificada por CLAE. O experimento foi conduzido em duplicata.

4.3.6 Preparação da formulação semissólida contendo nanocápsulas de dapsona

Com a finalidade de preparar uma forma semissólida adequada à aplicação tópica, as suspensões de nanocápsulas de dapsona foram incorporadas em um hidrogel. Devido ao seu caráter não iônico (KIBE, 2000), a hidroxietilcelulose (Natrosol[®]) foi escolhida para a preparação dos hidrogéis. Os hidrogéis foram preparados pelo método convencional, substituindo-se a água pelas suspensões de nanocápsulas contendo dapsona. Assim, o Natrosol[®] (2% p/v) foi disperso lentamente em 10 mL das formulações de nanocápsulas NC-P1 e NC-E sob agitação moderada, originando desse modo as formulações semissólidas denominadas HG-NCP1 e HG-NCE. Foram preparados também hidrogéis sem nanocápsulas (hidrogel controle) e contendo dapsona livre.

4.3.7 Caracterização físico química dos hidrogéis contendo nanocápsulas de dapsona

Os hidrogéis foram caracterizados quanto ao diâmetro de partícula, pH, microscopia de força atômica, teor de fármaco e reologia.

4.3.7.1 Determinação da distribuição do tamanho das partículas após a incorporação nas bases semissólidas

O diâmetro médio e a polidispersão das nanocápsulas contidas nos veículos semissólidos foi realizada através de difratometria de laser como previamente descrito para as suspensões de nanocápsulas. Para isto, as amostras de gel contendo as nanocápsulas de dapsona foram colocadas diretamente no equipamento para verificação de diâmetro de partícula.

4.3.7.2 Determinação do pH das formulações, contendo dapsona na forma nanoencapsulada

Para a determinação do pH das formulações semissólidas, foi utilizado um potenciômetro calibrado com solução tampão pH 4,0 e 7,0. As leituras foram realizadas em triplicata diretamente nas formulações semissólidas.

4.3.7.3 Microscopia de força atômica nos hidrogéis

As análises de MFA nos hidrogéis foram realizadas conforme descrito no item 4.3.2.4 e foram realizadas no hidrogel branco (sem dapsona livre ou nanoencapsulada), hidrogel contendo NC-P1 (HG-NCP1) e hidrogel contendo NC-E (HG-NCE).

4.3.7.4 Doseamento da dapsona nos hidrogéis

Previamente ao doseamento, a dapsona foi extraída do hidrogel. Para isto, cerca de 2g de hidrogel foram colocadas em um béquer com 35 mL de água ultrapura e mantido sob agitação magnética em banho maria à 37°C por 1 hora. Transcorrido este tempo, transferiu-se esta mistura para balão volumétrico de 50 mL, tendo seu volume completado com acetonitrila, mantendo-se em agitação e aquecimento por mais 1 hora e 30 minutos. Após transcorrido o tempo de extração, a amostra foi resfriada a temperatura ambiente e filtrada através de papel filtro. Outra diluição foi realizada, onde 5 mL da solução extratora filtrada foi transferida para balão volumétrico de 10 mL, e o volume completado com acetonitrila. Em

seguida, a amostra foi filtrada através de membrana (0,45 μm , Millipore[®]), e analisada por metodologia validada por CLAE.

4.3.7.5 Avaliação das características reológicas das formulações semissólidas contendo dapsona nanoencapsulada

As características reológicas das formulações semissólidas – HG-NCP1, HG-NCE e hidrogel controle (sem dapsona livre ou nanoencapsulada) – foram avaliadas com auxílio de viscosímetro rotacional Brookfield[®], modelo LVDV-II+ Pro provido de *spindle* SC4-15. Para as determinações, as amostras foram acondicionadas em dispositivo Brookfield[®] para avaliação de pequenas quantidades de amostras, acoplado a banho termostatzado circulante a 25 +/- 1°C.

As velocidades de rotação foram selecionadas respeitando-se os limites nos valores de torque (superiores a 10% e inferiores a 100%). A leitura das viscosidades, tensões de cisalhamento e velocidade de cisalhamento foram efetuadas um minuto após o ajuste de cada velocidade de rotação do *spindle*. A partir desses valores, obtidos no software do equipamento (Rheocalc[®]), construíram-se os reogramas.

Os comportamentos reológicos foram determinados avaliando-se os quatro modelos matemáticos propostos para fluidos não-newtonianos: Bingham, Casson, Herschel-Bulkley e Ostwald e o modelo com maior coeficiente de correlação foi considerado o de escolha para descrever o comportamento das formulações semissólidas.

4.3.8 Teste de oclusão *in vitro*

Para verificar a perda de água transepidermica realizou-se o teste de oclusão *in vitro* (WISSING e MULLER, 2002, modificado), no qual frascos de 30 mL foram preenchidos com 20 mL de água e selados com papel filtro de acetato de celulose. Formulações semissólidas contendo NC-P1, NC-E, fármaco livre e o hidrogel branco - sem conter nanocápsulas ou o fármaco livre- foram espalhadas no filtro (40 mg) e armazenadas a 32°C durante um período de até 48 horas. O fator de oclusão F foi calculado de acordo com a Equação 8, após 3, 6, 24 e 48 horas de estocagem. Cada experimento foi realizado em triplicata.

$$F = \frac{A - B}{A} * 100$$

(Equação 8)

Onde A é a perda de água do hidrogel branco (referência) e B é a perda de água com o hidrogel contendo nanocápsulas ou o fármaco livre.

4.3.9 Análise estatística

Os resultados obtidos nos diferentes experimentos foram avaliados através do Teste de Least Significant Difference (LSD), considerando-se um nível de significância de 0,05. Os testes foram realizados utilizando o programa Statgraphics Plus[®] (Statpoint Technologies[®]).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Validação de metodologia analítica por CLAE para a quantificação de suspensões de nanocápsulas contendo dapsona

5.1.1 Especificidade

De acordo com a Resolução 899 de 2003, especificidade é a capacidade do método de medir exatamente um composto em presença de outros componentes.

A especificidade do método foi avaliada através de análises comparativas entre as suspensões de nanocápsulas brancas (sem dapsona) e as suspensões contendo o fármaco. Este parâmetro foi avaliado para todos os diferentes tipos de formulações.

Os cromatogramas das formulações brancas e das suspensões contendo dapsona encontram-se na figura abaixo:

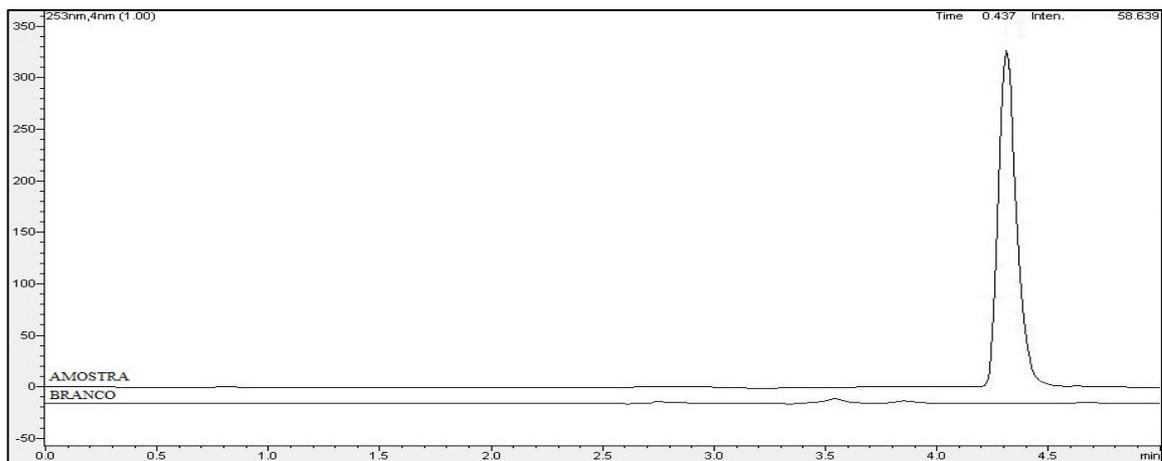


Figura 6. Cromatograma representativo para as formulações contendo nanocápsulas de dapsona na concentração de 15 µg/mL (Amostra) e cromatograma das suspensões sem fármaco (Branco).

O cromatograma acima (Figura 6) refere-se à suspensão de nanocápsulas utilizada para a validação de método, conforme descrito na Tabela 2. As demais formulações apresentadas na Tabela 1 foram analisadas em termos de especificidade e apresentaram cromatogramas semelhantes ao da Figura 6, não sendo detectado pico cromatográfico no mesmo tempo de retenção característico do fármaco (4,3 minutos).

Analisando os resultados obtidos, foi possível verificar que não houve interferentes para a avaliação do fármaco nas formulações de nanocápsulas. O método analítico apresentou-se específico para este tipo de análise, estando de acordo com as especificações oficiais.

5.1.2 Linearidade

É a capacidade do método de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um determinado intervalo (ANVISA, 2003).

Para o estudo da linearidade, curvas de concentração em função da área foram obtidas utilizando soluções padrão de dapsona em acetonitrila nas concentrações de 5, 10, 15, 20 e 25 µg/mL. Para cada solução, 3 replicatas foram obtidas, construindo-se 3 curvas diferentes.

A equação da reta foi obtida através de regressão linear utilizando a curva média de concentração de dapsona e suas respectivas áreas, obtendo-se um coeficiente de correlação de 0,9999, mostrando desta forma a linearidade do método conforme demonstrado na Figura 7.

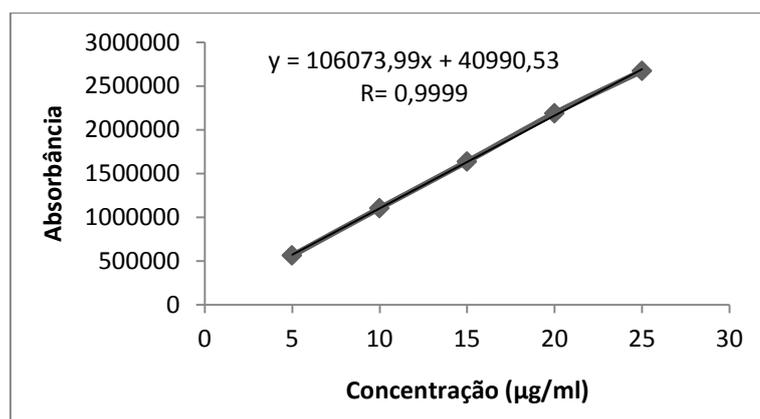


Figura 7. Representação gráfica da curva padrão da dapsona obtida por CLAE.

A análise de variância (ANOVA) (Tabela 3) demonstrou regressão linear significativa e desvio da linearidade não-significativo ($p > 0,05$) como pode ser constatado pelos valores obtidos para o $F_{\text{calculado}}$ em comparação com os valores de F_{tabelado} .

Tabela 3. ANOVA das áreas absolutas determinadas para a obtenção da curva padrão da dapsona através de CLAE.

Fontes de variação	GL	Soma dos quadrados	Variância	F (calc.)	F (tab.)
Entre	4	8442461087950,66	2110615271987,7	3511,9	3,5
Regressão linear	1	8438767985513,33	8438767985513,3	14041,7	4,9
Desvio de linearidade	3	3693102437,33	1231034145,8	2,05	3,71
Dentro (resíduo)	10	6009787716,67	600978771,7		
Total	14	8448470875667,34	603462205404,8		

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram calculados através da divisão do desvio padrão dos coeficientes lineares das curvas de calibração do ensaio de linearidade pela média dos coeficientes angulares destas respectivas curvas, multiplicados por 3,3 e 10, respectivamente.

Os valores obtidos para limite de detecção e de quantificação foram de 0,41 µg/mL e 1,24 µg/mL, respectivamente, o que indica a sensibilidade do método para quantificação de dapsona em nanocápsulas.

5.1.3 Repetibilidade e precisão intermediária

Este parâmetro foi avaliado através da análise de 6 soluções da amostra (suspensão de nanocápsulas de óleo de arroz contendo dapsona) na concentração de 15 µg/mL em um único dia (repetibilidade) e por meio da análise das soluções em 3 dias diferentes (precisão intermediária). Através do desvio padrão relativo (DPR) intradia, avaliou-se a repetibilidade ou precisão intradia, enquanto a precisão intermediária ou interdias foi determinada a partir dos valores de DPR obtidos da análise nos diferentes dias.

Os valores de recuperação obtidos para os ensaios de repetibilidade e precisão intermediária para a quantificação de dapsona por CLAE, bem como os valores de DPR, estão descritos na Tabela 4.

Tabela 4. Valores de precisão interdia e intradia para a quantificação de dapsona em nanocápsulas poliméricas de óleo de arroz por CLAE.

	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Teor (%)	Média - Precisão Intradia (%)	DPR (%)
Dia 1	11,33	75,30	76,46	2,12
	11,35	75,46		
	11,29	75,02		
	11,76	78,18		
	11,86	78,81		
	11,43	75,97		
Dia 2	11,85	78,74	78,13	1,00
	11,79	78,39		
	11,62	77,25		
Dia 3	12,03	79,95	78,57	1,54
	11,74	78,02		
	11,69	77,73		
			Precisão Interdia (%)	DPR (%)
			77,72	1,43

Conforme podemos observar na Tabela 4 na avaliação da repetibilidade os valores obtidos para o teor de fármaco ficaram entre 75,02 e 78,81% e o DPR foi de 2,12.

Nos ensaios realizados intra-dia os valores ficaram entre 75,02 e 78,81% com DPR de 2,12 no primeiro dia de análise. Já no 2º dia de realização de ensaio, os valores de recuperação ficaram entre 77,25 e 78,74% com DPR de 1,00 e, no 3º dia os valores ficaram entre 77,73 e 79,95% com DPR de 1,54. Deste modo, o parâmetro precisão foi confirmado pela aproximação dos diferentes resultados obtidos para uma mesma amostra. O método mostrou-se preciso e com repetibilidade adequada, já que os valores de DPR determinados foram todos menores que 5%, valor máximo aceitável preconizado pela ANVISA (2003).

5.1.4 Exatidão

A exatidão caracteriza-se como a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro (ANVISA, 2003). Para determinação deste parâmetro foi preparada uma solução padrão de dapsona em três diferentes concentrações (baixa, intermediária e alta). Alíquotas de 50 μL , 150 μL e 250 μL da solução padrão (1000 $\mu\text{g/mL}$) foram transferidas para balão volumétrico de 10 mL contendo 100 μL de suspensão de nanocápsula branca (sem conter fármaco), tendo seu volume completado com acetonitrila. As concentrações finais obtidas foram de 5 $\mu\text{g/mL}$, 15 $\mu\text{g/mL}$ e 25 $\mu\text{g/mL}$, realizadas em triplicata.

Na Tabela 5 estão descritos os valores das porcentagens de recuperação, os quais foram satisfatórios, uma vez que se mantiveram entre 98,29 e 106,90%. Sendo assim, o método pode ser considerado como exato para quantificação de dapsona em nanocápsulas poliméricas de óleo de arroz.

Tabela 5. Valores experimentais da exatidão do método para nanocápsulas de dapsona.

Concentração teórica ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração recuperada ($\mu\text{g/mL}$)	Recuperação (%)
5	5,25	98,29 \pm 2,00
15	15,75	104,87 \pm 0,90
25	26,25	106,90 \pm 0,86

Por meio destes resultados, pode-se concluir que o método validado se mostrou adequado para a quantificação de dapsona em suspensões de nanocápsulas.

5.2 Caracterização das suspensões de nanocápsulas contendo dapsona e óleo de arroz bruto após a preparação

Com o objetivo de desenvolver uma formulação de nanocápsulas adequada para aplicação tópica de dapsona, garantir uma liberação controlada do fármaco, elucidar o seu mecanismo de liberação e avaliar a fotoestabilidade do fármaco nanoencapsulado, formulações contendo diferentes polímeros e concentrações variadas de óleo e fármaco foram desenvolvidas através do método de deposição

interfacial do polímero pré-formado (FESSI et al., 1988), método que possui como vantagem a formação instantânea, simples, eficiente e reprodutível de nanocápsulas (JIMÉNEZ, et al., 2004).

Após a preparação, as formulações contendo nanocápsulas de dapsona apresentaram aspecto macroscopicamente homogêneo, com coloração branco azulada e aspecto leitoso (Figura 8) característico de sistemas coloidais obtidos por nanoprecipitação (SANTOS et al., 2014).

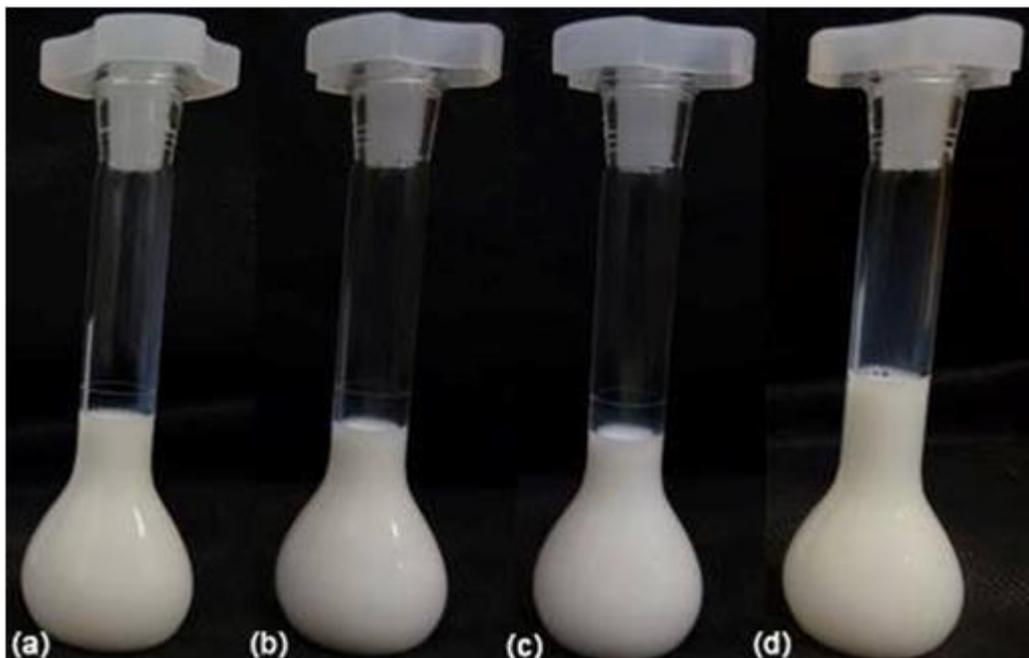


Figura 8. Suspensão de NC-P1 (a), NC-P2 (b), NC-P3 (c) e NC-E (d)

5.2.1 Determinação do diâmetro de partícula e polidispersão

Alguns fatores são de extrema importância na determinação do diâmetro da partícula e polidispersão, tais como a natureza e a quantidade de óleo empregado na preparação, viscosidade, hidrofobicidade e tensão interfacial dos materiais empregados (SCHAFFAZICK et al., 2003).

Após o preparo, as suspensões denominadas NC-P1, NC-P2 e NC-E apresentaram diâmetros médios nanométricos semelhantes (Tabela 6), (Figuras 9, 10 e 12). Estes resultados são condizentes com a literatura que relata que, de um modo geral, as nanopartículas apresentam tamanho entre 100 a 300 nm (SCHAFFAZICK et al., 2003). Entre as suspensões de nanocápsulas de dapsona em que o polímero utilizado foi o PCL, houve uma diferença ($p < 0,05$) em relação ao

diâmetro médio (d(4,3)) das nanocápsulas, já que a NC-P3 (Figura 11), desenvolvida com maior quantidade de óleo (0,2 g) e fármaco (0,02 g), apresentou diâmetro maior em relação às demais, o que indica que o aumento da concentração de fármaco, juntamente com um aumento na concentração de óleo, altera este fator.

Quanto à homogeneidade do sistema, considera-se que valores de indicativos de polidispersão (Span) menores que 2 sugerem que a distribuição de tamanho das partículas encontra-se em uma faixa estreita de diâmetros, enquanto valores altos indicam heterogeneidade no diâmetro das suspensões (SCHAFFAZICK et al., 2003; SOUZA et al., 2012). As nanopartículas de dapsona preparadas utilizando menor de fármaco (0,01 g) (NC-P1, NC-P2 e NC-E) apresentaram valores de Span inferiores a 2, indicando uma distribuição granulométrica estreita do sistema. Os valores de Span obtidos para NC-P1 e NC-P2 foram semelhantes ($p>0,05$), enquanto os valores obtidos para as outras formulações apresentaram-se diferentes ($p<0,05$).

Tabela 6. Distribuição granulométrica por difração de laser das nanocápsulas

Amostra	d(0,1) (nm)	d(0,5) (nm)	d(0,9) (nm)	d(4,3) (nm)	Span (nm)
NC-P1 Br	68±0,002	137±0,006	297±0,024	167±0,010 ^(a)	1,667± 0,11 ^(a)
NC-P1 Dap	67±0,002	137±0,006	301±0,022	168±0,010 ^(a)	1,69±0,070 ^(a)
NC-P2 Br	72±0,003	146±0,005	335±0,028	181±0,010 ^{(a)(b)}	1,81±0,120 ^{(a)(b)}
NC-P2 Dap	70±0,001	147±0,010	339±0,040	183±0,020 ^(a)	1,8±0,140 ^(a)
NC-P3 Dap	72±0,005	157±0,020	438±0,090	334±0,110 ^(b)	2,285±0,280 ^(b)
NC-E Br	147±0,004	205±0,010	320±0,039	223±0,017 ^(c)	0,843±0,125 ^(c)
NC-E Dap	146±0,001	203±0,002	312±0,006	220±0,003 ^(c)	0,823±0,057 ^(c)

Br: nanocápsulas brancas, sem a presença do fármaco; Dap: nanocápsulas contendo dapsona. Letras diferentes, nas colunas, indicam diferença significativa ($p<0,05$) por ANOVA, pós teste de LSD.

Conforme pode ser observado na tabela 6, a presença do fármaco não influenciou ($p>0,05$) o diâmetro médio com base no volume da partícula ($d(4,3)$) e o valor do span das partículas para as diferentes formulações, uma vez que as formulações de nanocápsulas contendo fármaco (Dap) apresentaram diâmetros que não diferiram ($p>0,05$) de suas respectivas formulações controle (Br).

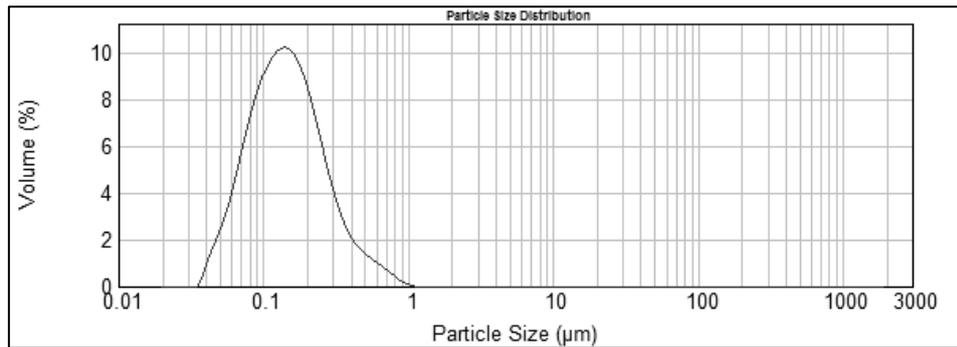


Figura 9. Distribuição do tamanho de partícula de NC-P1 com base no volume de partícula.

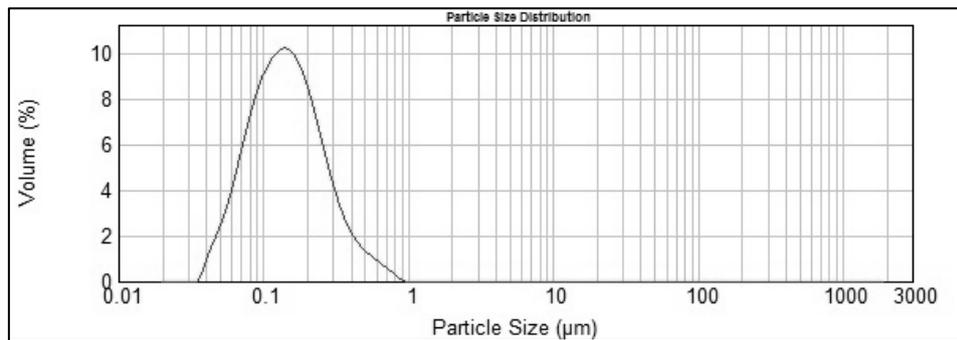


Figura 10. Distribuição do tamanho de partícula de NC-P2 com base no volume de partícula.

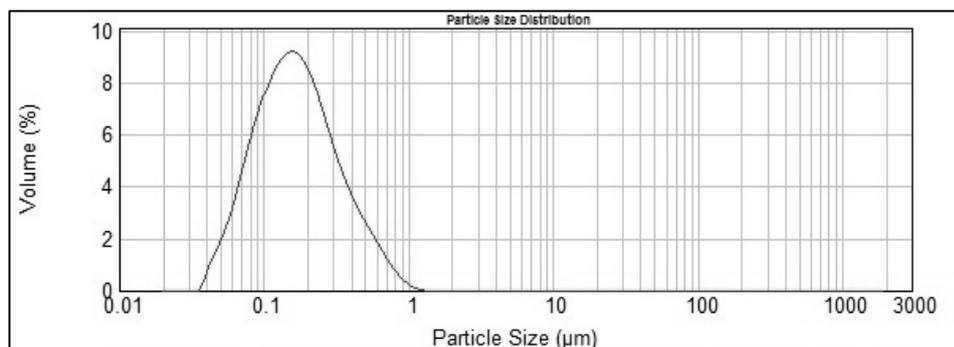


Figura 11. Distribuição do tamanho de partícula de NC-P3 com base no volume de partícula.

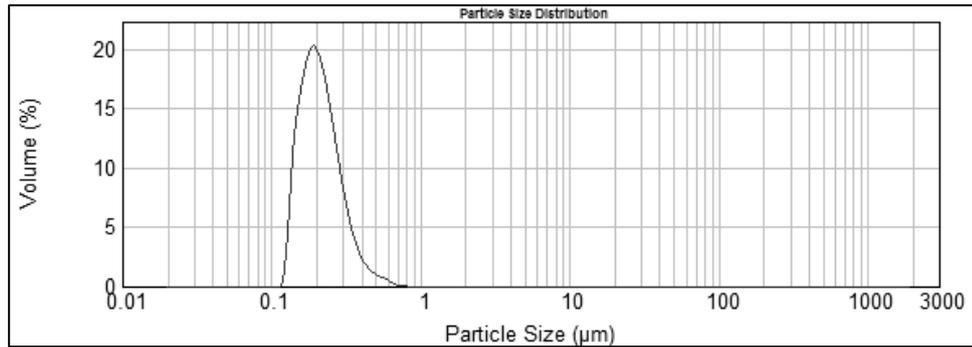


Figura 12. Distribuição do tamanho de partícula de NC-E com base no volume de partícula.

5.2.2 Determinação de pH

A medida do pH é um importante parâmetro na estabilidade de sistemas coloidais, pois alterações nos seus valores podem estar relacionadas a degradação do polímero ou de algum outro constituinte da formulação, ou até mesmo com a difusão do fármaco das nanocápsulas para o meio aquoso (SCHAFFAZICK et al., 2003). Foram verificados valores ácidos para todas as suspensões. A Tabela 7 apresenta os valores de pH das suspensões de dapsona e suas respectivas formulações controle (brancas).

Tabela 7. Valores de pH das suspensões.

Amostra	pH
NC-P1 Br	5,5 ± 0,30
NC-P1 Dap	6,4 ± 0,26
NC-P2 Br	5,6 ± 0,30
NC-P2 Dap	6,1 ± 0,10
NC-P3 Dap	6,2 ± 0,22
NC-E Br	3,8 ± 0,12
NC-E Dap	4,5 ± 0,05

Os valores de pH para as formulações contendo PCL como polímero (NC-P1, NC-P2 e NC-P3) estão de acordo com o relatado na literatura para formulações contendo poliésteres, preparadas pelo método de nanoprecipitação. Alves e colaboradores (2007) preparam suspensões de nanocápsulas de poli(ϵ -caprolactona) e obtiveram valores de pH entre 5,1 e 5,3. Valores de pH levemente ácidos foram encontrados por Paese e colaboradores (2009), no qual suspensões de nanocápsulas contendo benzofenona e PCL como polímero apresentaram pH 6,5. Ourique e colaboradores (2008) também relatam valores de pH ácidos para formulações contendo tretinoína utilizando o mesmo polímero, ficando os valores entre 5,6 e 6,9.

Valores mais ácidos obtidos para formulações contendo Eudragit[®] RS 100 como material polimérico estão de acordo com o esperado, já que este polímero apresenta grupamentos hidroxila - OH⁻, tornando a suspensão mais ácida (ANTONOW, 2012).

Valores de pH mais altos ($p < 0,05$) foram observados para as suspensões de nanocápsulas contendo dapsona, quando comparados com as formulações brancas. Os maiores valores podem ser justificados pela natureza levemente básica do fármaco, já que sua estrutura química apresenta duas aminas (NH₂⁺) (WOZEL, 2010).

Como foi possível observar, os valores de pH de todas as suspensões preparadas neste estudo estão dentro da faixa adequada para aplicação tópica, entre 4,5 e 6,5, sendo os valores ácidos apropriados para formulações que posteriormente serão incorporadas em veículos semissólidos destinados à aplicação cutânea (ALVES et al., 2007; SIQUEIRA et al., 2011).

5.2.3 Determinação do potencial zeta

O potencial zeta é determinado através de técnicas de eletroforese e reflete o potencial de superfície das partículas. O valor deste potencial é influenciável pelos constituintes das formulações, especialmente os polímeros, fosfolipídios (lecitinas) e poloxamers (SCHAFFAZICK et al., 2003).

Conforme apresentado na Tabela 8, as suspensões preparadas com PCL apresentaram valores de potencial zeta negativos, decorrentes da presença de grupamentos éster do polímero. Além deste material, outro constituinte da

formulação que contribui para este valor negativo é a lecitina de soja (Lipoid[®] S45), pois as lecitinas conferem potencial negativo a interface das partículas (DOMINGUES et al., 2008; SCHAFFAZICK et al., 2003). Para as partículas preparadas com PCL, os valores de potenciais foram relativamente altos, o que é satisfatório, já que grandes forças repulsivas tendem a evitar a agregação de nanopartículas adjacentes, contribuindo para a estabilidade físico-química da suspensão coloidal (SCHAFFAZICK et al., 2003).

Em relação as formulações preparadas com Eudragit[®] RS 100, esperava-se que estas apresentassem um potencial positivo, já que este polímero é catiônico, o que, de acordo com a literatura, confere uma carga positiva a superfície das nanopartículas (DOMINGUES et al., 2008). Porém, conforme citado acima, as suspensões possuem em sua constituição a lecitina de soja, o que ocasiona um potencial negativo – ainda que mais próximo a zero - mesmo em suspensões em que o polímero utilizado apresenta carga positiva.

Tabela 8. Valores de potencial zeta das suspensões de nanocápsulas.

Amostra	Potencial Zeta (mV)
NC-P1 Br	- 32,58 ± 0,82
NC-P1 Dap	- 31,01 ± 3,33
NC-P2 Br	- 33,71 ± 0,92
NC-P2 Dap	- 29,67 ± 2,99
NC-P3 Dap	- 30,87 ± 2,64
NC-E Br	- 9,91 ± 0,97
NC-E Dap	- 10,62 ± 0,27

Br: nanocápsulas brancas, sem a presença do fármaco; Dap: nanocápsulas contendo dapsona

Para determinar a influência do fármaco na carga de superfície das suspensões de nanocápsulas, o potencial zeta das suspensões isentas de dapsona (nanocápsulas brancas) foi avaliado. As suspensões brancas apresentaram valores

de potencial zeta semelhantes ($p > 0,05$) àqueles obtidos para formulações contendo o fármaco. Esta não interferência do fármaco no potencial zeta, pode ser devido à incorporação da dapsona no núcleo oleoso, distante da superfície da partícula, hipótese que é corroborada pela elevada eficiência de encapsulação do fármaco nas nanocápsulas, parâmetro que será discutido posteriormente no item 5.2.5.

5.2.4 Microscopia de força atômica

A microscopia de força atômica (MFA) é uma técnica que permite caracterizar a morfologia da superfície das nanopartículas, fornecendo informações em três dimensões com alta resolução (SCHAFFAZICK et al., 2003).

Em relação a outras técnicas de caracterização morfológica, a MFA oferece algumas vantagens, tais como, resolução molecular e mínimo preparo de amostras, já que não é necessário vácuo durante a operação e a amostra não necessita ser condutiva. Por meio desta técnica é possível verificar o tamanho de partícula, as propriedades estruturais, possíveis deformações e diferentes constituintes dos sistemas nanoestruturados (NEVES et al., 1998).

A morfologia das suspensões de nanocápsulas foi verificada nas formulações NC-P1 e NC-E.

As suspensões NC-P1 apresentaram forma quase esférica (Figura 13) (TEERANACHAIDEEKUL et al., 2007), sendo que a irregularidade no formato pode ter sido agravada pelo modo de preparo da amostra. Já as suspensões contendo NC-E exibiram formato esférico mais regular, no entanto, apresentaram-se aglomeradas e achatadas umas às outras, fato que pode ser atribuído a uma possível agregação das nanocápsulas na superfície da mica ou ainda ao achatamento das nanocápsulas quando depositadas sobre este suporte (LARA, 2008; LEITE, 2006). A aglomeração da NC-E também pode ser atribuída ao valor de potencial zeta mais baixo, característico desta formulação, o que pode estar relacionado com uma maior propensão à aglomeração das partículas.

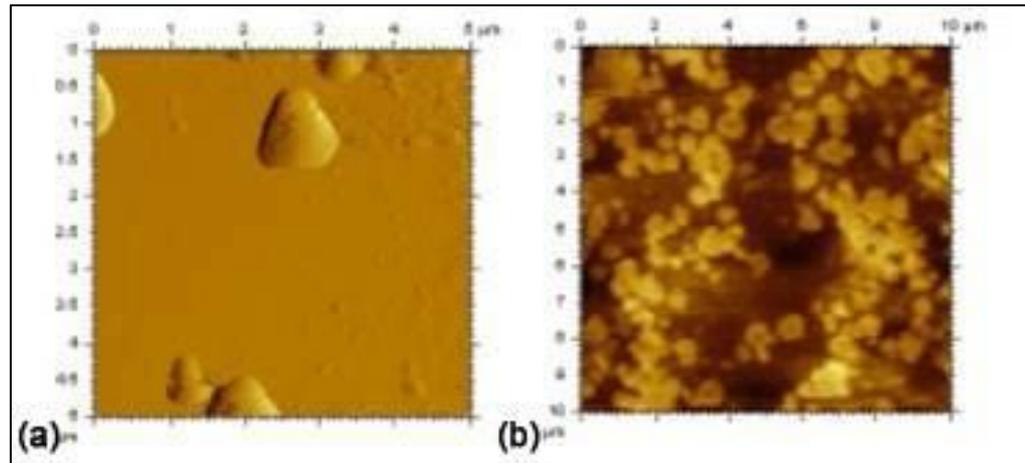


Figura 13. Imagens obtidas por MFA das suspensões contendo (a) NC-P1 e (b) NC-E.

5.2.5 Doseamento da dapsona nas suspensões coloidais e determinação da taxa de encapsulação

As formulações NC-P1, NC-P2, NC-P3 e NC-E foram avaliadas quanto ao conteúdo de fármaco, apresentando concentrações experimentais próximas à concentração teórica (Tabela 9), sendo que as nanocápsulas NC-P1, NC-P2 e NC-E apresentaram concentrações semelhantes entre si ($p > 0,05$). Já a formulação NC-P3 apresentou menor concentração de dapsona, o que, possivelmente, foi ocasionado devido a maior quantidade de óleo de arroz (0,2 g) e de fármaco (0,02 g) contido nesta formulação, podendo ter ocorrido algum tipo de interação entre os componentes da formulação, dificultando a extração do fármaco a partir das nanocápsulas.

As taxas de encapsulação da dapsona indicam elevado poder de encapsulamento pelas nanocápsulas, já que todos os valores foram superiores a 83%. Em trabalhos relatados na literatura, a capacidade de encapsulação de compostos lipofílicos em nanocápsulas foi inferior a obtida para dapsona. Pode-se citar como exemplo os valores obtidos para melatonina, que variaram entre 33 e 56% para diferentes formulações contendo este fármaco (SCHAFFAZICK et al., 2006) e para benzocaína, no qual o valor da taxa de encapsulação foi de 73% (DE MELO et al., 2010).

Tabela 9. Teor da dapsona contido nas nanocápsulas e taxa de encapsulação das suspensões.

Amostra	Teor (mg/mL)	E.E (%)
NC-P1	1,00 ± 0,02	83,17
NC-P2	0,95 ± 0,03	88,18
NC-P3	0,84 ± 0,02	84,63
NC-E	1,01 ± 0,02	88,02

Considerando os resultados acima expostos, tais como diâmetro médio, valores de Span e teor de fármaco na formulação, a formulação de nanocápsulas preparadas com PCL e contendo 0,15 g de óleo de arroz e 0,01 g de dapsona (NC-P1) e a formulação preparada com Eudragit® RS 100, 0,15 g de óleo de arroz e 0,01g de dapsona (NC-E) foram selecionadas para a continuidade dos estudos.

5.3 Liberação *in vitro*

Os sistemas coloidais, tais como as nanocápsulas, otimizam a velocidade de cedência e o regime de dosagem das substâncias, pois controlam a liberação de fármacos em sítios de ação específicos (SCHAFFAZICK et al., 2003).

Diferentes fatores podem alterar a liberação de fármacos a partir de sistemas carreadores, como degradação da matriz da partícula, cristalinidade do fármaco, afinidade entre o fármaco e a matriz coloidal, natureza do núcleo oleoso das nanocápsulas, condições do ensaio de liberação, método de preparação das nanopartículas, entre outros (ANTONOW, 2012; SANTOS et al., 2012; SCHAFFAZICK et al., 2003).

Fontana e colaboradores (2009), verificaram que o propionato de clobetasol, associado a nanopartículas apresenta um perfil de liberação bifásico, com uma rápida liberação inicial, seguida por uma liberação bastante lenta, apresentando uma perfil de liberação biexponencial, o que sugere que uma pequena parte do fármaco ficou adsorvida na superfície da partícula e, a maior parte, retida dentro das nanocápsulas.

O perfil de liberação de nanocápsulas de óleo de coco contendo clotrimazol foi estudado por Santos e colaboradores (2014). Neste estudo, observou-se que as

nanocápsulas preparadas com Eudragit[®] RS 100, foram capazes de controlar a liberação do fármaco de uma maneira mais eficaz que o fármaco dissolvido em solução metanólica. Em 8 horas de estudo, menos de 40% do fármaco foi liberado dos nanocarreadores, enquanto a solução metanólica teve uma liberação de quase 100% de fármaco durante o mesmo período. Além disso, notou-se que, diferentemente do estudo de Fontana e colaboradores (2009), não houve nenhuma liberação brusca de fármaco, sendo o modelo matemático monoexponencial o que mais se adequou para descrever o comportamento de liberação, sugerindo que a totalidade do clotrimazol está confinado no núcleo oleoso das nanoestruturas.

A liberação *in vitro* de nanocápsulas de capsaicina e dihidrocapsaicina utilizando o método de sacos de diálise demonstrou a influência das nanocápsulas no controle da liberação do ativo. Foi realizado um estudo comparativo entre as nanocápsulas contendo os ativos em relação a três controles - solução hidroalcoólica, solução micelar e nanoemulsão. Ambos capsaicinóides foram liberados mais lentamente em relação aos controles, mostrando a influência tanto da parede polimérica como do núcleo oleoso no controle da liberação. Mais uma vez a equação de primeira ordem monoexponencial foi a que melhor se aquedou aos dados de liberação (CONTRI et al., 2011).

Um estudo de liberação de nanopartículas lipídicas sólidas contendo dapsona foi realizado por Santos e colaboradores (2012). Os ensaios demonstraram que a difusão da dapsona, a partir das teosferas, ocorreu de maneira sustentada, liberando aproximadamente 52% de fármaco em um período de 12 horas, enquanto o fármaco livre dissolveu mais de 100% no mesmo período.

Neste trabalho, a liberação *in vitro* de nanocápsulas contendo dapsona foi realizada utilizando o método de sacos de diálise. O ensaio de liberação demonstrou que as formulações NC-P1 e NC-E controlaram a liberação da dapsona comparativamente à dapsona livre em uma solução aquosa de propilenoglicol 50:50 (v/v). A taxa de liberação da dapsona a partir das suspensão de NC-P1 foi de $79 \pm 5,1\%$ em 12 horas (Figura 14) e a taxa de liberação para NC-E foi de $71,3 \pm 7,2\%$. Diferentemente, o fármaco livre apresentou uma taxa de dissolução de $103,1 \pm 9,3\%$ no mesmo período.

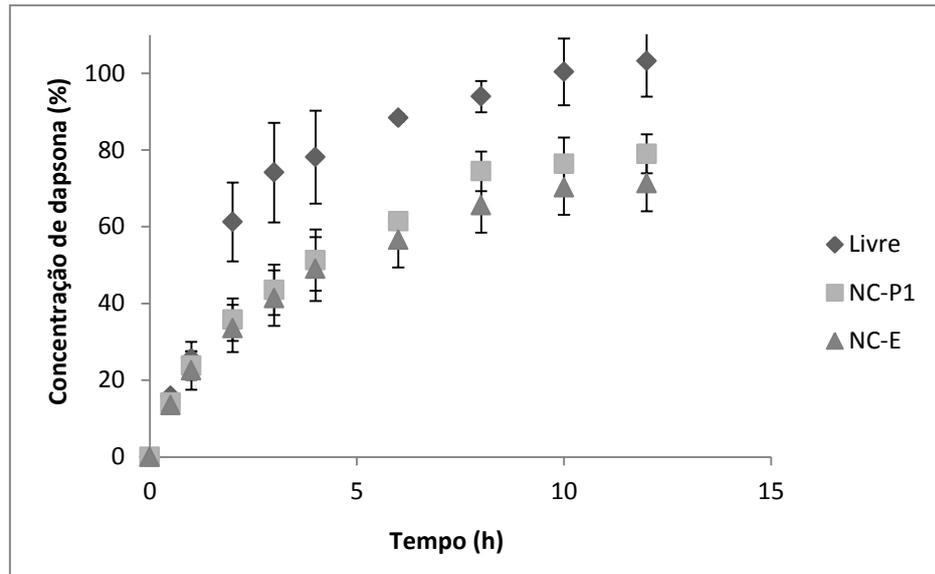


Figura 14. Perfil de liberação da dapsona a partir das formulações das NC-E e NC-P1 e perfil de dissolução da dapsona livre.

A partir dos perfis de dissolução/liberação do fármaco livre e nanoencapsulado, foi realizado um estudo comparativo baseado na modelagem matemática destes perfis. A descrição matemática das curvas cinéticas foi realizada pelo ajuste dos pontos experimentais aos modelos monoexponencial e biexponencial. Objetivando elucidar os mecanismos de liberação da dapsona a partir das nanocápsulas, o modelo Lei das Potências também foi utilizado.

Assim, através da análise dos valores obtidos para o critério de seleção do modelo (MSC) e coeficiente de correlação, além do ajuste gráfico, o modelo experimental mais adequado para descrever a dissolução da dapsona livre em solução, bem como a liberação da dapsona contida nas suspensões NC-P1 e NC-E, seria o modelo biexponencial. Entretanto, este modelo não descreveu corretamente os perfis em termos de constantes de velocidade de dissolução/liberação (α e β), pois estes parâmetros apresentaram valores negativos em algumas replicatas. Diante disso, o modelo monoexponencial foi o escolhido para descrever a dissolução/liberação do fármaco livre e contido em ambas as suspensões de nanocápsulas (Tabela 10), corroborando com estudos anteriores descritos na literatura (CONTRI et al., 2011; DOMINGUES et al., 2008; SANTOS et al., 2014; SCHAFFAZICK et al., 2006).

Neste estudo, não foi observada liberação brusca de fármaco a partir das nanocápsulas, uma vez que somente uma constante de velocidade está relacionada ao processo, sugerindo que o fármaco encontra-se, em maior parte, dissolvido no núcleo oleoso das partículas, o que corrobora com os resultados de eficiência de encapsulação (83,2% para a NC-P1 e 88% para NC-E). A dapsona livre apresentou uma velocidade de dissolução ($k = 0,414 \text{ min}^{-1}$) superior ($p < 0,05$) às velocidades de liberação da dapsona a partir das diferentes nanocápsulas ($k = 0,173 \text{ min}^{-1}$ e $k = 0,147 \text{ min}^{-1}$, para NC-P1 e NC-E, respectivamente), as quais foram semelhantes entre si ($p > 0,05$).

Além disso, os tempos de meia-vida relacionados com a liberação do fármaco a partir das nanocápsulas foi em média 2,5 vezes maior (Tabela 10) do que aquele obtido para a dapsona livre.

Tabela 10. Parâmetros da modelagem matemática da dissolução/liberação de dapsona livre e associada a NC-P1 e NC-E utilizando as equações monoexponencial e biexponencial.

Modelo	Dapsona livre	NC-P1	NC-E
Monoexponencial			
k (min^{-1})	0,414 ± 0,090	0,173 ± 0,030	0,147 ± 0,034
$t_{1/2}$ (h)	1,736 ± 0,434	4,086 ± 0,753	4,918 ± 1,291
r	0,984 ± 0,007	0,993 ± 0,001	0,991 ± 0,004
MSC	2,993 ± 0,486	2,543 ± 0,318	1,943 ± 0,263
Biexponencial			
A	0,126 ± 0,206	0,486 ± 0,381	0,398 ± 0,335
B	0,983 ± 0,165	0,511 ± 0,442	0,554 ± 0,399
Alfa	0,231 ± 0,477	0,925 ± 0,691	- 0,012 ± 0,156
Beta	0,480 ± 0,214	0,076 ± 0,096	0,416 ± 0,268
$t_{1/2\alpha}$ (h)	-	-	-
$t_{1/2\beta}$ (h)	-	-	-
R	0,989 ± 0,007	0,995 ± 0,001	0,998 ± 0,001
MSC	3,092 ± 0,712	3,773 ± 0,309	4,976 ± 0,908

Os expoentes de liberação (n) obtidos para NC-P1 e NC-E (Tabela 11) apresentam valores entre 0,43 e 0,85, o que, de acordo com a literatura, indica que a liberação do fármaco segue um modelo não-Fickiano, sendo governada por processos de difusão e inchamento do polímero simultaneamente, ou seja, transporte anômalo (DOMINGUES et al., 2008; SCHAFFAZICK et al., 2006; SIEPMANN e PEPPAS, 2001). Resultado semelhante foi encontrado por Santos e colaboradores (2014) para a liberação de clotrimazol a partir de nanocápsulas preparadas com óleo de coco no qual o valor do expoente de liberação ficou próximo de 0,6.

Tabela 11. Parâmetros de modelagem matemática da dissolução de dapsona livre e associada a NC-P1 e NC-E utilizando o modelo de Lei das Potências.

Lei das potências	NC-P1	NC-E
N	0,494 ± 0,031	0,461 ± 0,042
MSC	2,960 ± 0,398	3,524 ± 0,473
r	0,983 ± 0,007	0,990 ± 0,004

A avaliação pela metodologia de eficiência de dissolução (ED) também foi realizada revelando valores de $61 \pm 4,7\%$ para NC-P1 e $55,7 \pm 6,7\%$ para NC-E, enquanto que a dapsona livre apresentou valor superior ($p < 0,05$) ($83,2 \pm 5,7\%$). Quando comparadas entre si, os valores de ED obtidos para as nanocápsulas apresentaram-se semelhantes ($p > 0,05$). Estes resultados demonstram que as nanocápsulas contendo dapsona apresentam-se como interessantes e promissoras estratégias para liberação prolongada de dapsona, uma vez que os sistemas nanoparticulados preparados acarretaram uma redução do valor da eficiência de dissolução do fármaco.

5.4 Avaliação da fotoestabilidade

Uma infinidade de fármacos apresenta sensibilidade à luz. Desta maneira, é de suma importância que alternativas para aumentar a fotoestabilidade sejam pesquisadas, visto que é inevitável que ocorra exposição de fármacos a luz UV e visível, especialmente quando são aplicados topicamente (PAESE et al., 2009).

Sistemas nanoparticulados, tais como as nanocápsulas, tem sido propostos como estratégia para diminuir a fotodegradação de fármacos fotossensíveis, já que materiais utilizados na elaboração destes sistemas, como os polímeros biodegradáveis, lipídios e o óleo utilizado como núcleo, podem auxiliar na proteção de moléculas ativas (DETONI et al., 2012).

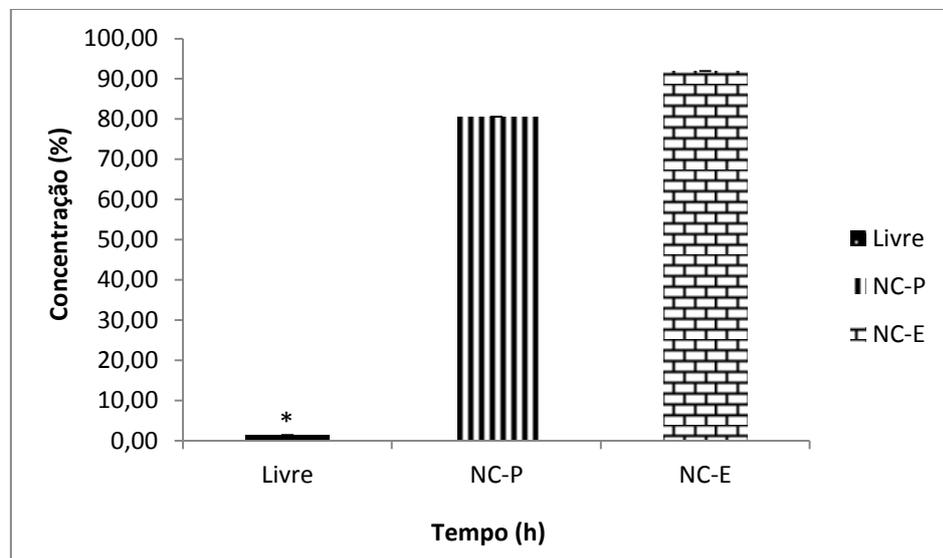
Uma diversidade de óleos podem ser utilizados como núcleo de nanocápsulas, sendo o óleo de arroz bruto bastante promissor no que diz respeito ao aumento da estabilidade de fármacos sensíveis à luz, devido, principalmente, a presença de gama-orizanol, composto com elevado poder antioxidante (JULIANO et al., 2005).

Com a finalidade de aumentar a estabilidade de fármacos frente à luz UV, diversos estudos vêm sendo realizados.

Detoni e colaboradores (2012), demonstraram o perfil de degradação do resveratrol, sendo possível observar diminuição de 90,4% na concentração de resveratrol em solução etanólica no período de 4 horas, enquanto a fotoreação foi significativamente mais lenta quando o resveratrol foi associado à lipossomas (29,3%), nanocápsulas (67,2%), nanoesferas (77,8%) e carreadores lipídicos nanoestruturados (70%).

Para avaliar a fotoestabilidade da tretinoína, observar se diferentes óleos podem influenciar na fotoestabilidade e verificar a influência da camada polimérica, Ourique e colaboradores (2008) desenvolveram nanocápsulas e nanoemulsões empregando diferentes componentes oleosos (triglicerídeos de ácido cáprico/caprílico e óleo de girassol). A fotodegradação foi estudada utilizando lâmpada artificial UV com exposição das amostras à radiação durante 1 hora. Após este período, a tretinoína em solução metanólica apresentou um tempo de meia-vida de 40 minutos, enquanto que a tretinoína nanoencapsulada, nas diferentes nanocápsulas, apresentou tempo de meia-vida de 88,6 minutos (triglicerídeos de ácido cáprico/caprílico) e 95,18 minutos (óleo de girassol). As nanoemulsões também garantiram melhora na fotoestabilidade, mas de forma menos pronunciada, apresentando um tempo de meia-vida de 81,63 minutos (triglicerídeos de ácido cáprico/caprílico) e 69,35 minutos (óleo de girassol), o que demonstra a importância da presença da parede polimérica para prevenir a fotodegradação.

Neste estudo foi avaliada a influência de diferentes materiais poliméricos (PCL e Eudragit® RS 100) na proteção conferida ao fármaco submetido à degradação induzida pela radiação UV. A concentração de dapsona remanescente na amostra irradiada a partir da concentração inicial foi avaliada quantitativamente através de CLAE. Foi possível observar que após 6 horas de irradiação, a concentração de dapsona livre remanescente era de $1,4 \pm 0,3\%$, enquanto a concentração de fármaco remanescente nas nanocápsulas foi superior ($p < 0,05$), sendo de $80,6 \pm 1,5\%$ e $91,9 \pm 3,1\%$ para NC-P1 e NC-E, respectivamente (Figura 15).



*significativo para $p < 0,05$.

Figura 15. Conteúdo de dapsona residual após degradação fotolítica para o fármaco em solução de acetonitrila e para as nanocápsulas NC-P1 e NC-E.

Os dados obtidos com a degradação fotolítica confirmam resultados de estudos anteriores, demonstrando que a presença de materiais poliméricos nas formulações exerce ação protetora do ingrediente ativo. Esta proteção pode ser devido às propriedades do PCL e do Eudragit® RS 100 que possuem características cristalinas, o que facilita a reflexão da luz e a dispersão da radiação UV (JIMÉNEZ et al., 2003; PERUGUNI et al., 2002). Outro fator que pode ter contribuído para o aumento da estabilidade fotolítica, é a presença do óleo de arroz bruto como núcleo oleoso das nanocápsulas, pois, como já relatado, este óleo possui compostos antioxidantes, apresentando atividade de proteção solar (JULIANO et al., 2005).

5.5 Preparação e caracterização de base semissólida contendo nanocápsulas de dapsona

A hidroxietilcelulose (Natrosol[®]) geralmente é utilizada em diferentes formulações farmacêuticas como agente suspensor, de consistência, estabilizante e como formador de gel não iônico (KIBE, 2000). Devido à característica não iônica deste gel, ele foi escolhido como veículo para as nanocápsulas.

Após a preparação, tanto o hidrogel controle, sem dapsona livre ou nanoencapsulada, assim como o hidrogel contendo dapsona livre, apresentaram-se transparentes e incolores. Por sua vez, os hidrogéis contendo as formulações NC-P1 e NC-E (HGNC-P1 e HGNC-E), apresentaram-se com coloração branca, além de brilhosos e homogêneos.

O diâmetro médio da nanocápsula formulada com o polímero PCL contida nos hidrogel (HG-NCP1), foi similar à distribuição de tamanho da suspensão de nanocápsula antes da incorporação nas bases semissólidas, conforme demonstrado nas Figuras 17, 18 e 19. O pico micrométrico verificado na distribuição granulométrica é relativo à presença do gel de Natrosol[®], o que foi confirmado pela obtenção de um pico semelhante na análise do hidrogel controle (sem dapsona livre ou nanoencapsulada) (Figura 16).

Conforme é possível observar na Figura 21, que apresenta a distribuição de tamanho de partícula por volume, quando o polímero Eudragit[®] RS 100 foi utilizado, verificamos uma pequena quantidade de partículas nanométricas. Contudo, quando analisamos a distribuição por número, claramente notamos a presença das nanopartículas, sendo a distribuição bastante semelhante a da suspensão de nanocápsula antes da incorporação nos veículos semissólidos (Figuras 20 e 22).

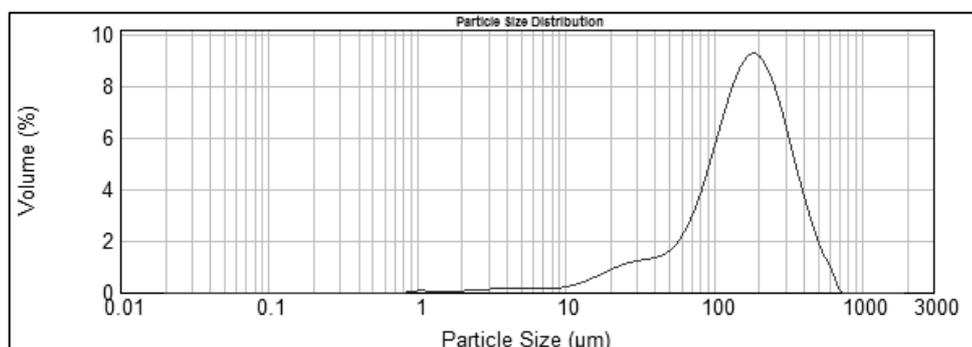


Figura 16. Distribuição do tamanho de partícula por volume do hidrogel controle

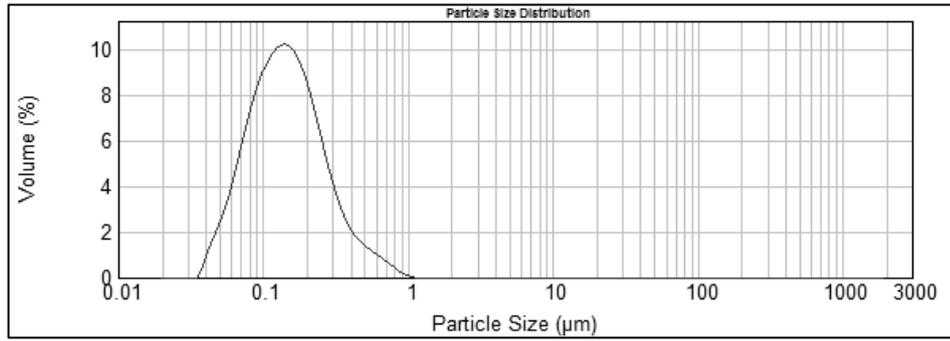


Figura 17. Distribuição do tamanho de partícula por volume de NC-P1.

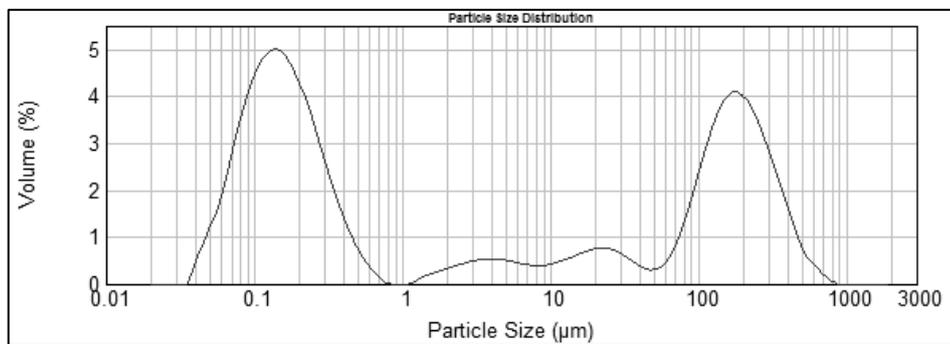


Figura18. Distribuição do tamanho de partícula por volume de HG-NCP1.

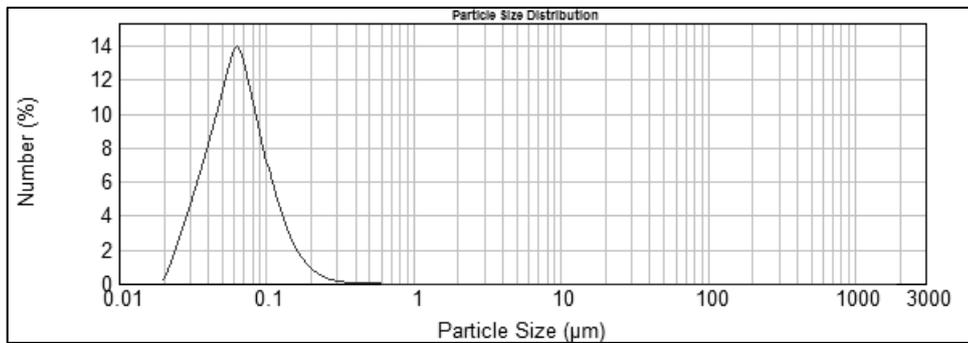


Figura19. Distribuição do tamanho de partícula por número do HG-NCP1.

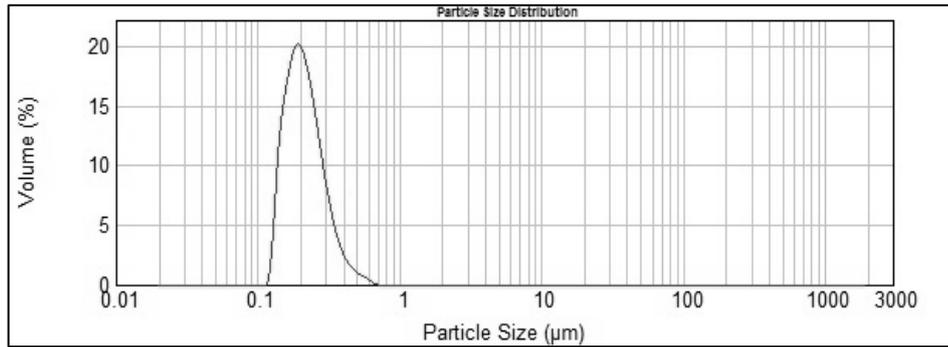


Figura 20. Distribuição do tamanho de partícula por volume da NC-E.

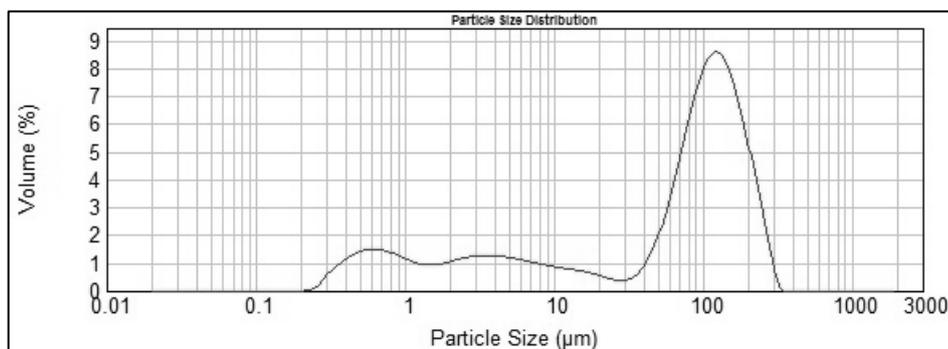


Figura 21. Distribuição do tamanho de partícula por volume do HG-NCE.

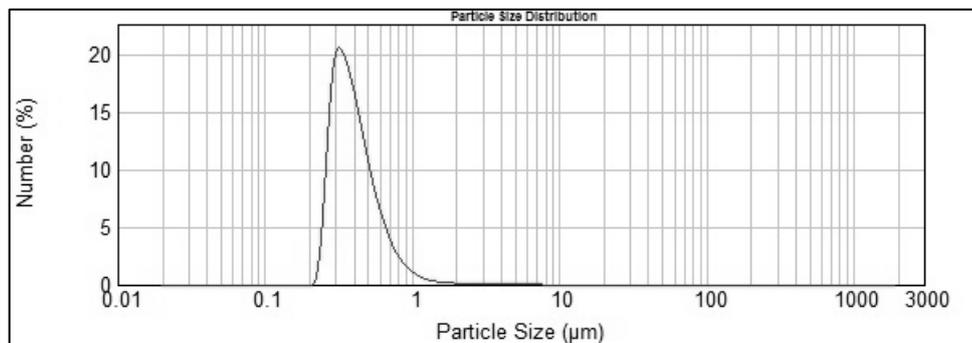


Figura 22. Distribuição do tamanho de partícula por número do HG-NCE.

Em relação à análise de pH dos hidrogéis, os valores obtidos foram condizentes com o método de preparação e as matérias-primas constituintes das suspensões, sendo o pH do HG-NCP1 6,18 e do HG-NCE 5,58. Estes valores são considerados adequados para a administração cutânea (ALVES et al., 2007). Quanto ao doseamento dos hidrogéis, o teor total de dapsona foi de 99,73% e 80,34% para HG-NCP1 e HG-NCE, respectivamente.

5.5.1 Microscopia de força atômica dos hidrogéis

A morfologia das nanocápsulas contidas nos hidrogéis foi analisada nas amostras HG-NCP1 e HG-NCE. Conforme é possível observar na Figura 23 (a), quando incorporadas no hidrogel, as suspensões de NC-P1 apresentaram formato esférico e regular, porém com tamanhos heterogêneos, o que pode ser ocasionado pela seleção aleatória da amostra para análise, tomando-se partículas pertencentes a faixas diferentes da distribuição granulométrica.

Em relação ao HG-NCE (Figura 23 (b)), conforme citado na morfologia das suspensões contendo nanocápsulas, o formato achatado, pode ser atribuído à agregação das nanocápsulas na superfície da mica ou ainda ao achatamento das nanocápsulas quando depositadas na superfície da mesma. Contudo, é possível observar nitidamente a presença das nanocápsulas nos hidrogéis, diferentemente do resultado apresentado na Figura 23 (c), que corresponde a imagem de MFA do hidrogel branco, onde as partículas estão ausentes.

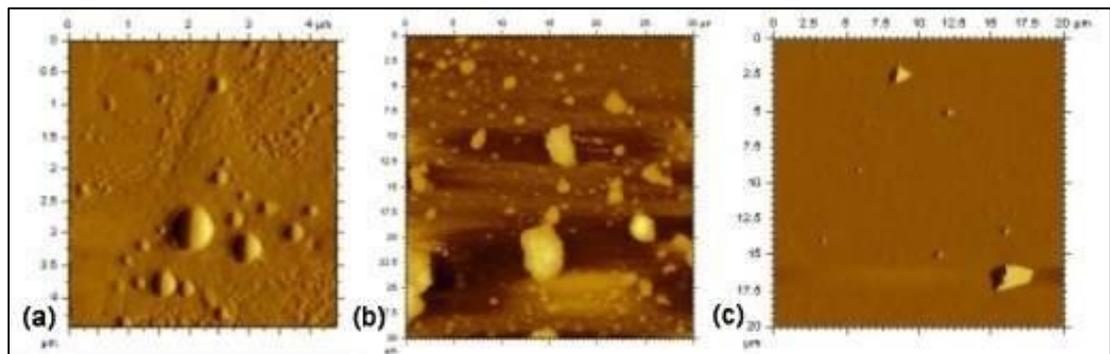


Figura 23. Imagens obtidas por MFA dos hidrogéis contendo (a) NC-P1, (b) NC-E e (c) Hidrogel branco (HG-Br)

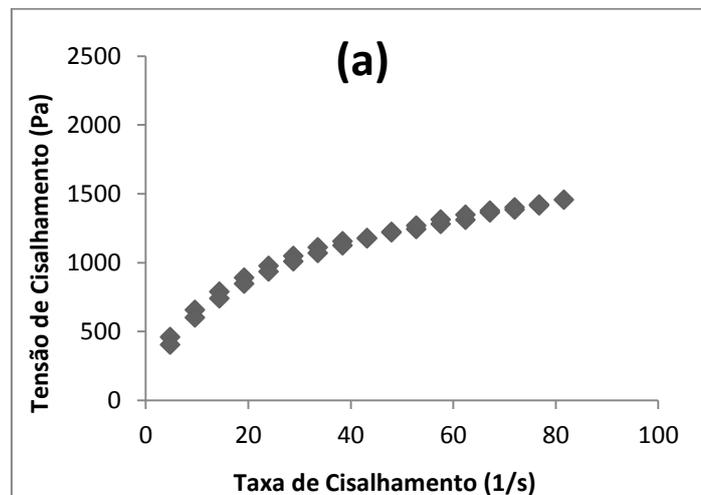
5.6 Comportamento reológico das formulações semissólidas

Conhecer as características reológicas de formulações semissólidas é de fundamental importância no desenvolvimento e caracterização físico-química de produtos farmacêuticos, pois o comportamento reológico de um sistema é utilizado para avaliar a estabilidade e controle de qualidade de produtos semissólidos (ALVES, 2006; PAESE et al., 2009).

Na reologia, os sistemas semissólidos podem ser classificados como Newtonianos ou não-Newtonianos. A maioria dos produtos cosméticos e farmacêuticos apresenta fluxo não-Newtoniano. Neste modelo, as curvas de tensão de cisalhamento *versus* taxa de cisalhamento podem ser descritas pelas equações de Bingham (linear, comportamento plástico perfeito), Casson (linear com raízes quadradas, plástico), Ostwald (modelo exponencial, pseudoplástico) e Herschel-Bulkley (modelo exponencial, pseudoplástico com valor de cedência) (CAMARGO, 2009; CORRÊA et al., 2005). O comportamento reológico é determinado pelo maior coeficiente de regressão obtido da equação linear para o modelo matemático.

Neste trabalho, foram realizadas as análises reológicas do hidrogel branco (sem nanocápsulas ou o fármaco livre – HG-Br) e dos hidrogéis contendo nanocápsulas de dapsona (HG-NCP1 e HG-NCE). As análises foram realizadas em viscosímetro rotacional LVDV –II+Pro Brookfield®. Os reogramas das formulações semissólidas avaliadas apresentaram caráter não-Newtoniano, ou seja, não se verifica uma relação direta entre a tensão de cisalhamento e a taxa de cisalhamento aplicada (Figura 24).

Os valores obtidos para taxas de cisalhamento e tensões de cisalhamento foram plotados e tratados de acordo com a equação de Herscheld-Bulkley (HG-Br e HG-NCE) e equação de Cassson (HG-NCP1), considerando os modelos matemáticos mais adequados para descrever cada um dos reogramas obtidos (Tabela 12).



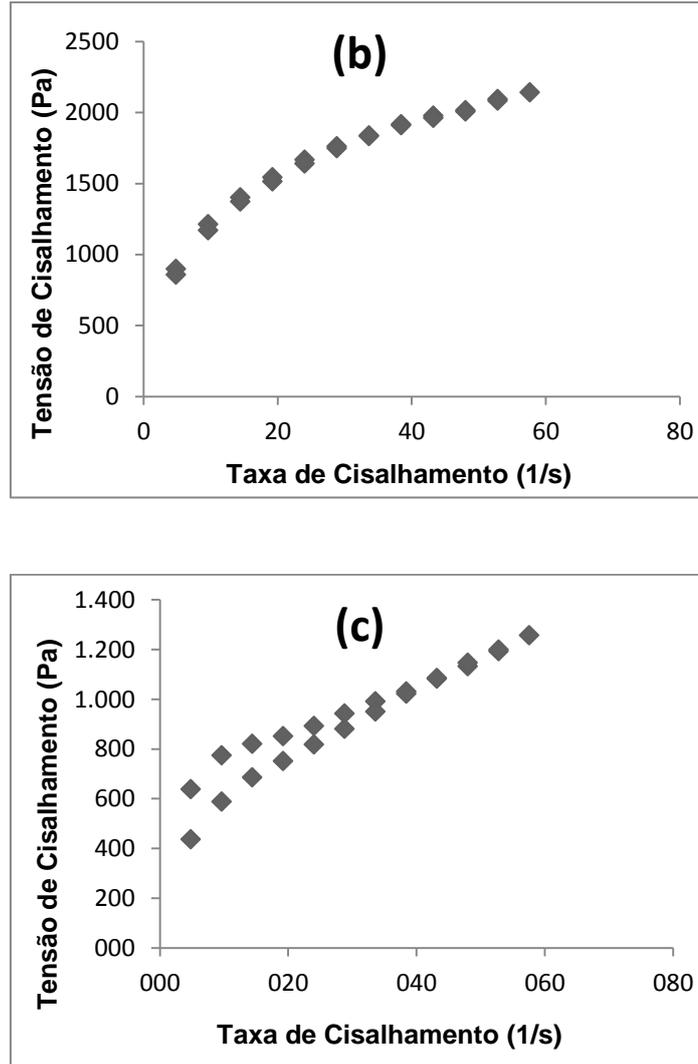


Figura 24. Reogramas de tensão de cisalhamento versus taxa de cisalhamento referentes a série de hidrogel: (a) HG-Br; (b) HG-NCE (c) HG-NCP1.

Na Tabela 12 são apresentados os coeficientes de regressão dos modelos matemáticos que descrevem os comportamentos não-Newtonianos.

Tabela 12. Coeficientes de regressão obtidos para os modelos matemáticos característicos de comportamentos não-Newtonianos.

Formulação	Bingham	Casson	Herschel-Bulkley	Ostwald
HG-Br	91,7	97,2	99,6	96,8
HG-NCP1	94,6	97,3	93,7	94,1
HG-NCE	93,8	97,9	99,9	98,0

HG-Br: hidrogel branco, HG-NCP1: hidrogel contendo nanocápsulas de PCL e dapsona; HG-NCE: hidrogel contendo nanocápsulas de Eudragit RS®100 e dapsona.

A hidroxietilcelulose (Natrosol[®]), base escolhida para incorporação das suspensões de nanocápsulas, comporta-se como fluido não-Newtoniano com perfil reológico pseudoplástico (GONÇALVES, 2008; SIQUEIRA et al., 2011).

Analisando a Tabela 12, nota-se que a incorporação da suspensão de nanocápsula (NC-E), em total substituição à água, para obtenção do hidrogel, não alterou o comportamento pseudoplástico original característico do Natrosol[®], sendo que o modelo matemático que melhor se adequou ao HG-Br e ao HG-NCE foi o de Herscheld-Bulkley. O comportamento pseudoplástico, de acordo com a literatura, é o mais comum para formulações dermocosméticas (CORRÊA et al., 2005).

Entretanto, apesar de diferentes resultados da literatura que demonstraram o comportamento pseudoplástico dos géis de Natrosol[®] (CONTRI et al., 2011; NEMEN e LEMOS-SENNÁ, 2011; SIQUEIRA et al., 2011), a incorporação da formulação NC-P1, alterou o comportamento do hidrogel, passando este a ter um fluxo plástico, sendo o modelo matemático mais satisfatório para descrevê-lo, o modelo de Casson. De acordo com WELIN-BERGER e colaboradores (2001), este comportamento é adequado, já que para formulações tópicas, as propriedades plásticas são as preferidas, uma vez que a resistência de fluxo é baixa quando a formulação é aplicada sob a forma de condições de cisalhamento elevadas.

O índice de consistência (k) e o índice de fluxo (n) foram comparados entre o HG-Br e o HG-NCP1, já que ambos exibiram comportamento pseudoplástico.

Tabela 13. Parâmetros do modelo de Herschel-Bulkley (HG-Br e HG-NCE) para formulações de hidrogéis.

Formulação	Índice de Consistência (k)	Índice de Fluxo (n)
HG-Br	150168	0,15
HG-NCE	334988	0,11

Os índices de fluxo (n) obtidos foram menores que 1, estando de acordo com as características de fluídos pseudoplásticos. O valor de índice de fluxo indica o grau de pseudoplasticidade de uma formulação semissólida, sendo que quanto mais

próximo a zero este valor, mais pseudoplástica é considerada a formulação (CONTRI et al., 2011).

Já os índices de consistência (k) não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) entre as médias das variáveis.

5.7 Teste de oclusão *in vitro*

O estrato córneo contém de 10 a 20% de água. Quando este conteúdo é inferior, devido a perda de água por evaporação, o grau de hidratação da pele é modificado, apresentando aspecto “rachado”. Neste caso torna-se necessário a aplicação de produtos tópicos oclusivos, com a finalidade de regenerar o teor de água do estrato córneo e assim, recuperar a superfície da pele (FERRONY, 2012; WISSING et al., 2001).

Um aumento no conteúdo hídrico da pele corresponde a um aumento na permeabilidade de substâncias aplicadas topicamente. Todas as substâncias penetram melhor através da pele hidratada em comparação à pele seca (GUTERRES et al., 2007; TASQUETTO, 2009).

Entre as alternativas para evitar a perda transepidérmica de água, está o uso tópico de nanopartículas, visto que as mesmas apresentam características oclusivas devido o seu tamanho reduzido, formando uma película protetora na pele após a aplicação (SIQUEIRA et al., 2011).

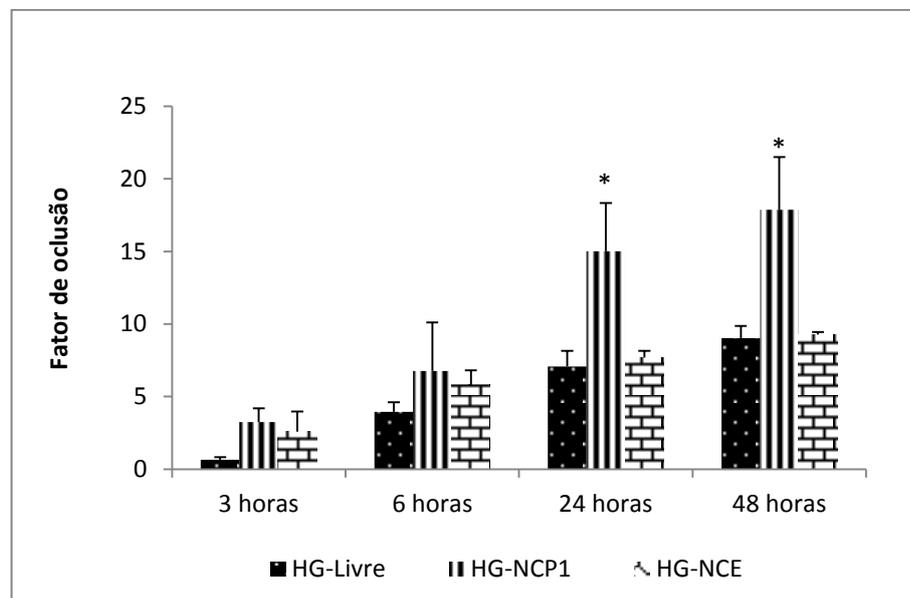
A fim de verificar a influência do uso de nanocápsulas na perda transepidérmica de água, realizou-se o teste de oclusão *in vitro*. Comparou-se um hidrogel contendo o fármaco livre com os hidrogéis HG-NCP1 e HG-NCE.

Conforme é possível observar na Figura 25 os géis HG-NCP1 e HG-NCE exibiram fator de oclusão aparentemente maior quando comparados ao gel contendo o fármaco livre em todo o período de experimento. Após 3h de incubação, gel livre, HG-NCP1 e HG-NE apresentaram fator de oclusão de $0,65 \pm 0,17$; $3,25 \pm 0,93$ e $2,58 \pm 1,39$, respectivamente. Após 6 horas, este fator passou para $3,94 \pm 0,67$ (hidrogel livre); $6,77 \pm 3,34$ (HG-NCP1) e $5,82 \pm 0,99$ (HG-NCE), demonstrando a influência da presença das nanocápsulas nos géis para garantir o poder oclusivo da formulação.

Após 24 horas, é possível observar valores para o fator de oclusão de $7,06 \pm 1,09$; $15,01 \pm 3,32$ e $7,68 \pm 0,48$ para o gel livre, HG-NCP1 e HG-NCE,

respectivamente. A partir deste tempo começa-se a verificar diferenças entre os fatores de oclusão, sendo os valores obtidos para o gel livre e para HG-NCE semelhantes entre si ($p > 0,05$) e diferentes ($p < 0,05$) do valor obtido para o HG-NCP1.

Considerando 48 horas de experimento, o fator de oclusão passou para $9,04 \pm 0,82$ e $9,27 \pm 0,17$ para o hidrogel livre e HG-NCE, enquanto o gel contendo NC-P1 exibiu uma oclusão de $17,87 \pm 3,62$, sendo diferente ($p < 0,05$) dos valores obtidos par gel livre e HG-NCE.



*significativo para $p < 0,05$.

Figura 25. Fator de oclusão dos hidrogéis HG-Livre, HG-NCP1 e HG-NCE.

De acordo com Wissing e Muller (2002), o fator de oclusão das nanopartículas é uma consequência do seu tamanho, ou seja, aumenta com a diminuição do diâmetro médio da partícula. Os resultados obtidos estão em consonância com os achados da literatura, uma vez que as nanocápsulas preparadas com o polímero PCL apresentaram um diâmetro médio menor ($168 \pm 0,01$ nm) e fator de oclusão maior durante todo o tempo de experimento, quando comparadas à formulações contendo NC-E, a qual apresentou diâmetro de partícula maior ($203 \pm 0,002$ nm) e fator de oclusão menor.

6 CONCLUSÃO

Após análise dos resultados e considerando os objetivos propostos neste estudo, é possível obter algumas conclusões em relação ao trabalho realizado:

- O desenvolvimento de suspensões de nanocápsulas de dapsona mostrou-se viável mediante o emprego de óleo de arroz bruto e diferentes polímeros;
- As suspensões de nanocápsulas preparadas com poli(ϵ -caprolactona), ou Eudragit[®] RS 100 contendo dapsona, apresentaram diâmetros de partícula nanométricos, distribuição granulométrica estreita, teores totais próximos às concentrações teóricas e elevada eficiência de encapsulação;
- A análise morfológica através de MFA evidenciou a existência de um sistema nanoparticulado para as formulações analisadas, as quais mantiveram a estrutura nanométrica após incorporação em base semissólida;
- Os perfis de liberação *in vitro* obtidos com o método de diálise demonstraram que as nanocápsulas proporcionam uma liberação sustentada do fármaco;
- A modelagem matemática dos perfis de liberação demonstrou que o modelo monoexponencial mostrou-se mais adequado para descrever os dados experimentais, tanto para o fármaco livre quanto para o nanoencapsulado. As constantes de velocidade do processo de liberação do fármaco mostraram-se semelhantes entre si, considerando as diferentes formulações de nanocápsulas, e diferentes da dissolução do fármaco puro. O cálculo do tempo de meia-vida mostrou valores mais elevados para a liberação da dapsona a partir das nanocápsulas em comparação ao fármaco livre;
- A nanoencapsulação da dapsona aumentou a fotoestabilidade frente à exposição à radiação UVA quando comparada com sua forma livre;

- As formulações semissólidas apresentaram características físico-químicas adequadas para aplicação tópica de dapsona, tais como pH, teor de fármaco e propriedades reológicas. O hidrogel controle e o hidrogel contendo NC-E apresentaram comportamento não-newtoniano pseudoplástico descrito pelo modelo Herscheld-Bulkley, enquanto o hidrogel contendo NC-P1 apresentou fluxo plástico descrito pelo modelo de Casson;
- O teste de oclusão *in vitro* demonstrou que o hidrogel contendo NC-P1 exibe maior oclusão quando comparado ao hidrogel contendo NC-E e ao hidrogel contendo dapsona livre, fato que, possivelmente, está relacionado com o menor diâmetro de partícula.

A partir dos resultados obtidos no trabalho, tem-se como perspectiva futura a continuidade dos experimentos visando realizar estudos de permeação cutânea do fármaco *in vitro* e/ou *in vivo*. Estes ensaios são de extrema importância para avaliar a capacidade das nanocápsulas em facilitar a permeação da dapsona, de modo a garantir concentrações de fármaco na pele efetivas para o tratamento de doenças cutâneas como a psoríase.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, J.S.; LIMA, F.; DA ROS, S.; BULHÕES, L.O.S.; DE CARVALHO, L.M.; BECK, R.C.R. Nanostructured systems containing rtuin: In vitro antioxidante activity and photostability studies. **Nanosc. Res Lett.**, p.1603-1610, 2010.
- ALVES, M.P. **Formas farmacêuticas plásticas contendo nanocápsulas, nanoesferas e nanoemulsões de nimesulida: desenvolvimento, caracterização e avaliação da atividade antiinflamatória.** Tese de doutorado. Universidade Federal do Rio grande do Sul. Porto Alegre, 2006
- ALVES, M.P.; SCARRONE, A.L.; SANTOS, M.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S. Human skin penetration and distribution of nimesulide from hydrophilic gels containing nanocarriers. **Int. Journ. of Pharmac.**, v.341, p.315-320, 2007.
- ANGELLI, Valéria W.; **Desenvolvimento e caracterização de formulações fotoprotetoras contendo nanocápsulas.**; Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2007.
- ANTONOW, M.B. **Desenvolvimento tecnológico e avaliação dos perfis de liberação in vitro de suspensões contendo nanocápsulas de desonida com diferentes polímeros.** Dissertação de Mestrado. Centro Universitário Franciscano. Santa Maria, 2012.
- ANVISA, **Resolução - RE 899, de 29 de maio de 2003.** Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial [da República Federativa do Brasil], Brasília, 2003.
- ARRAIS, M.A.S. **Obtenção e caracterização físico-química do complexo de inclusão dapsona: β cd e dapsona:sbe β cd para incremento de solubilidade em forma farmacêutica;** Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas, UFPI, Terezina, 2012.
- ARRUDA, C.S.; NOGUEIRA, E.; OLIVEIRA, M.S.; PEREIRA, E.R.; SILVA, R.M.C.A. Avanços e desafios da enfermagem na produção científica sobre psoríase. **Rev. Bras. Enf.**, 2010.
- ARRUDA, L.; YPIRANGA, S.; MARTINS, G.A. Tratamento sistêmico da psoríase- Parte II: imunomoduladores biológicos. **An. Bras. Dermatol.**, 2004.
- AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas.** 2ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.
- BARSOITI, V.; PENHA, G.G.; MARTINS, A.L.G.P.; PINTO, P.G.; BARBO, M.L.P. SIMIS, D.R.C. Psoríase pustulosa. **Rev. Fac. Ciênc. Méd. Sorocaba.**, v.8, n.2, p. 28-29, 2006.

BERNARDI, D.D.; PEREIRA, T.A.; MACIEL, N.R.; BORTOLOTO, J.; VIERA, G.S.; FILHO, P.A.R. Formation and stability of oil-in-water nanoemulsions containing rice bran oil: in vitro and in vivo assessments. **Journ. of Nanobiotechnol.**, 2011.

BETONI, C.C. **Avaliação da permeação cutânea de nanocápsulas de isotretinoína por *tape stripping* in vitro em pele humana e suína.** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2009.

BRAGHETTO, J.B. **Avaliação do potencial da arginina na prevenção da hemotoxicidade induzida pela dapsona em ratos.** Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2007.

CALHEIROS, M.N. **Extração de orizanol da borra de neutralização do óleo de farelo de arroz.** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2007.

CAMARGO, Z.T. **Preparação e caracterização de nanocápsulas de poly(D,L-Lactídeo) no encapsulamento de palmitato de retinila.** Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2009.

CONTRI, R.V.; KAISER, M. POLETTO, F.S.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S. Simultaneous control of capsaicinoids release from polymeric nanocapsules. **Journ. Nanosc. Nanotechnol.**, v. 11, p. 2398-2406, 2011.

CORRÊA, N.M.; JÚNIOR, F.B.C.; IGNÁCIO, R.F.; LEONARDI, G.R. Avaliação do comportamento reológico de diferentes géis hidrofílicos. **Rev. Bras. Ciên. Farm.**, v.41, n.1, 2005.

DAS, S.; SURESH, P.K. Nanosuspension: a new vehicle for the improvement of the delivery of drugs to the ocular surface. Application to amphotericin B. **Nanomed: Nanotechnol., Biol., and Med.**, p.242-247, 2011.

DE AZEVEDO, M.M.M. **Sistemas poliméricos de liberação controlada utilizando micro e nanopartículas encapsulando violaceína: caracterização, atividade biológica, consequências e perspectivas.** Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2005.

DE MELO, N.F.S.; GRILLO, R.; ROSA, A.H.; FRACETO, L.F.; FILHO, N.L.D.; DE PAULA, E.; DE ARAÚJO, D.R. Desenvolvimento e caracterização de nanocápsulas de poli (l-lactídeo) contendo benzocaína. **Quim. Nova**, v.33, n.1, 2010.

DETONI, C.B.; SOUTO, G.D.; SILVA, A.L.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S. Photostability and skin penetration off different E-resveratrol-loaded supramolecular structures. **Photochem. and Photobiol.**, v.88, p.913-921, 2012.

DOMINGUES, G. S.; GUTERRES, S. S.; BECK, R. C. R; POHLMAN, A. R. Micropartículas nanorrevestidas contendo um fármaco modelo hidrofóbico: preparação em etapa única e caracterização biofarmacêutica. **Quím. Nova**, v. 31, n. 8, p. 1966-1972, 2008.

DUARTE, A.A.; CHEHIN, F.B. Psoríase moderada a grave tratada com infliximabe em 53 pacientes: perfil dos pacientes, eficácia e efeitos adversos. **An. Bras. Dermatol.**, 2011.

FARHI, D.; BÉGON, P.W.; CHOSIDOW, O. Dapsone en dermatología. **EMC-Dermatologie-Cosmétologie**, v.2, p. 103-107, 2005.

FERNANDES, E.I.; FERREIRA, C.T.; SILVEIRA, T.R.; CESTARI, T.F. Psoríase pustulosa associada à doença de Crohn: relato de caso. **An. Bras. Dermatol.**, 2000.

FERRONY, D. **Desenvolvimento de uma formulação semi-sólida contendo nanocápsulas de dexametasona: Estudo da estabilidade e avaliação da liberação “in vitro”**. Dissertação de Mestrado. Centro Universitário Franciscano. Santa Maria, 2012.

FESSI, H.; DEVISSAGUET, J-Ph.; PUISIEUX, F. Procédé de préparation des systèmes colloïdaux dispersibles d'une substance sous forme de nanocapsules. **European Patent**, 0274961 A1, 1988.

FONTANA, M.C.; CORADINI, K.; GUTERRES, S.S.; POHLMANN, A.R.; LEAL, D.B.R.; BECK, R.C.R. Nanoencapsulation as a way to control the release and to increase the photostability of clobetasol propionate: influence of the nanostructured system. **Journ. of Biomed. Nanotechnol.**, v.5, p.254-263, 2009.

GONÇALVES, M.C.F. **Desenvolvimento, caracterização físico-química e avaliação biológica de quitossomas para liberação cutânea de melatonina**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), 2008.

GUTERRES, S.S; ALVES, M.P.; POLHMANN, A.R. Polymeric nanoparticles, nanospheres and nanocapsules, for cutaneous applications. **Drugs Target Insights**, 2007.

JIMÉNEZ, M.M.; PELLETIER, J.; BOBIN, M.F.; MARTIN, M.C. Influence of encapsulation on the in vitro percutaneous absorption of octyl methoxynnamate. **Int. Journ. of Pharm.**, 2004.

JULIANO, C.; COSSU, M.; ALAMANNI, M. C.; PIU, L. Antioxidant activity of gamma-oryzanol: Mechanism of action and its effect on oxidative stability of pharmaceutical oils. **Int. Journ. of Pharm.**, 2005.

KIBE, A. H. **Handbook Of Pharmaceutical Excipients**, 3 ed. London: Ed United Kingdom, 2000.

KORTING, M.S.; MEHNERT, W.; KORTING, H.C. Lipid nanoparticles for improved topical application of drugs for skin diseases. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, 2007.

KRUEGER, G.; ELLIS, C.N. Psoriasis – recente advances in understanding its pathogenesis and treatment. **Journ. of the Americ. Acad. of Dermatol.**, v.53, p.94-100, 2005.

LARA, V.C.D. **Desenvolvimento de nanocápsulas contendo ácido retinóico para tratamento tópico da acne.** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2008.

LEITE, E.A. **Nanocápsulas de poli- ϵ -caprolactona contendo halofantrino: desenvolvimento, caracterização e estudo da cardiotoxicidade.** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Ouro Preto. Ouro Preto, 2006.

MEZZALIRA, G. **Caracterização de suspensões de nanopartículas poliméricas estudadas como carreadores de fármacos através de técnicas de espalhamento de luz de raios-x a baixo ângulo.** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2005.

MILADI, K.; IBRAHEEM, D.; IQBAL, M.; SFAR, S.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Particles from preformed polymers as carriers for drug delivery. **Excli Journ.**, v.13, p.28-57, 2014.

MOREIRA, E.R.; SOUZA, P.R.K. Psoríase: a doença e sua terapêutica. **Rev. Bras. Ciên. Saúde.** Ano III, n.5, 2008.

NEMEN, D.; LEMOS-SENNA, E. Preparação e caracterização de suspensões coloidais de nanocarreadores lipídicos contendo resveratrol destinados à administração cutânea. **Quim. Nova**, v.34, n.3, 2011.

NEVES, B.R.A.; VILELA, J.M.C.; ANDRADE, M.S. Microscopia de varredura por sonda mecânica: uma introdução. **Cerâm.**, v.44, n.290, 1998.

OLIVEIRA, R.B.; LIMA, E.M. Polímeros na obtenção de sistemas de liberação de fármacos. **Rev. Elet. Farm.**, v.3, 2006.

OURIQUE, A.F.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S.; BECK, R.C.R. Tretinoin-loaded nanocapsules: Preparation, physicochemical characterization, and photostability study. **Int. Journ. of Pharmac.**, v.352, p.1-4, 2008.

OURIQUE, A.F.; MELERO, A.; SILVA, C.B.; SCHAEFER, U.F.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S.; LEHR, C-M; KOSTKA, K-H.; BECK, R.C.R. Improved photostability and reduced skin permeation of tretinoin: Development of a semisolid nanomedicine. **Eur. Journ. Pharm. and Biopharm.**, v.79, 2011.

PAUCAR-MENACHO, L.M.; SILVA, L.H.; SANT'ANA, A.D.; GONÇALVES, L.A.G. Refino de óleo de arroz (*Oryza sativa* L.) em condições brandas para preservação de γ -orizanol. **Ciên. Technol. Aliment.**, n.27, p. 45-53, 2007.

PAESE, K. **Desenvolvimento tecnológico, estudo da fotoestabilidade e avaliação da permeação cutânea in vitro da benzofenona-3 a partir de nanocápsulas poliméricas incorporadas em diferentes veículos semi-sólidos.** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2008.

PAESE, K.; JAGUER, A.; POLETTO, F.S.; PINTO, E.F.; BERGMANN, B.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S. Semisolid formulation containing a nanoencapsulated sunscreen: Effectiveness, in vitro photostability and immune response. **Journ. of Biomed. Nanotech.**, v.5, p.1-7, 2009.

PEREIRA, R.; JULIANTO, T.; YUEN, K.H.; MAJEED, A.B. Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas de eudragit L100 preparadas pela técnica de nanomoagem húmida para posterior incorporação de compostos bioativos. **Rev. Lusófona de Ciên. Tecn. Saúde**, p.117-131, 2010.

PERUGINI, P.; SIMEONI, S.; SCALIA; GENTA, I.; MODENA T.; CONTI, B.; PAVANETTO, F. Effect of nanoparticle encapsulation on the photostability of the sunscreen agente, 2-ethylhexil-p-methoxynnamate. **Int. Journ. of Pharm.**, p.37-45, 2002.

REIS, C.P.; NEUFELD, R.J.; RIBEIRO, A.J.; VEIGA, F. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. **Nanomed.: Nanotechnol., Biol. and Med.** 2, 2006.

RODRIGUES, A.P.; TEIXIERA, R.M. Desvendando a psoríase. **RBAC.**, v.41, 2009.

SAHOO, N.G.; KAKRAN, M.; LI, L.; JUDEH, S. Fabrication of composite microparticles of artemisinin for dissolution enhancement. **Power Technol.**, v.203, p.277-287, 2010.

SANTOS, G.S.; PEREIRA, G.G.; BENDER, E.A.; COLOMÉ, L.M.; GUTERRES, S.S.; CARVALHO, C.M.; WEISSMULER, G. Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas lipídicas destinadas à aplicação tópica de dapsona. **Quím. Nova**, v.35, n.7, 2012.

SANTOS, S.S.; LORENZONI, A.; PEGORARO, N.S.; DENARDI, L.B.; ALVES, S.H.; SCHAFFAZICK, S.R.; CRUZ, L. Formulation and in vitro evaluation of coconut oil-core cationic nanocapsules intended for vaginal delivery of clotrimazole. **Coll. and suf. B: Bioint.**, v.116, 2014

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

SCHAFFAZICK, S.R.; POHLMANN, A.R.; MEZZALIRA, G.; GUTERRES, S.S. Development of nanocapsule suspensions and nanocapsule spray-dried powders containing melatonin. **Journ. Braz. Chem. Soc.**, v.17, n.3, p. 562-569, 2006.

SIEPMANN, J.; PEPPAS, N. A. Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). **Adv. Drug Del. Rev.**, v. 48, n. 2-3, p. 139-157, 2001.

SIQUEIRA, N.M.; CONTRI, R.V.; PAESE, K.; BECK, R.C.R.; POHLMANN, A.R. Innovate sunscreen formulation based on benzophenone-3-loaded chitosan-coated polymeric nanocapsules. **Skin Pharm. Physiol.**, v.24, p. 166-174, 2011.

SILVA, K.S.; SILVA, E.A.T. Psoríase e sua relação com aspectos psicológicos, stress e eventos da vida. **Estud. Psicol.**, v.24, n.2, 2007.

SILVA, J.A.; APOLINÁRIO, A.C.; SOUZA, M.S.R.; DAMASCENO, B.P.G.L.; MEDEIROS, A.C.D. Administração cutânea de fármacos: desafios e estratégias para o desenvolvimento de formulações transdérmicas. **Rev. Cien. Farm. Bás. Apl.**, v.31, n.3, 2010.

SINHA, V.R.; BANSAL, K.; KAUSHIK, R.; TREHAN, A. Poli- ϵ -coprolactone microspheres and nanospheres: an overview. **Int. Journ. of Pharm.**, v.278, 2004.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DERMATOLOGIA (SBD). **Consenso Brasileiro de Psoríase - Guias de avaliação e tratamento**. Sociedade Brasileira de Dermatologia: Rio de Janeiro, 2.ed., 2012

SOUZA, P.M.S; LOBO, F.P.; ROSA, A.R.; FRACETO, L.F. Desenvolvimento de nanocápsulas de poli- ϵ -caprolactona contendo o herbicida atrazina. **Quim. Nova**, v.35, n.1, 2012.

TASQUETTO, A.P.S. **Biometria cutânea com formulações semissólidas contendo nanocápsulas de palmitato de ascorbila**. Dissertação de Mestrado. Centro Universitário Franciscano. Santa Maria, 2012.

TEERANACHAIDEEKUL, V.; SOUTO, E.B.; VARAPORN, B.J.; MULLER, R.H. Cetyl palmitate-based NLC for topical delivery of Coenzyme Q₁₀ – Development, physicochemical characterization and *in vitro* release studies. **Eur. Journ. of Pharmac. and Biopharmac.**, v.67, p.141-148, 2007.

WELIN-BERGER, K; NEELISSEN, J.A.M.; BERGENSTAHL, B. The effect of rheological behaviour of a topical anaesthetic formulation on the release and permeation rates of the active compound. **Eur. Journ. of Pharm. Scien.**, n.13, p.309-318, 2001.

WISSING, S.A.; LIPPACHER, A.; MULLER, R.H. Investigations on the occlusive properties of solid lipid nanoparticles (SLN). **Journ. of Cosmet. Sci.**, v.52, p.313-324., 2001.

WISSING, S.A.; MULLER, R.H. The influence of the crystallinity of lipid nanoparticles on their occlusive properties. **Int. Journ. of Pharm.**, v.242, p.377-379, 2002.

WOZEL, V.W.G. Innovative use of dapsons. **Dermatol. Clin.**, v.28, p.599-610, 2010.

ZAMPIERI, A.L.T.C. **Desenvolvimento, caracterização e avaliação da permeação cutânea de isoflavona genisteína em nanocápsulas poliméricas**. Tese de doutorado, Universidade Federal de Goiás. Goiânia, 2009.