

Monika Piazzon Tagliari

**DESENVOLVIMENTO DE NANOPARTÍCULAS DE
QUITOSANA E ALGINATO DE SÓDIO PARA
INCORPORAÇÃO DE ÁCIDO GLICIRRÍZICO, ÁCIDO
SALICÍLICO OU CAFEÍNA VISANDO LIBERAÇÃO TÓPICA**

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em Farmácia, Departamento de Ciências Farmacêuticas, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito para obtenção do Título de Doutora em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Antônio Segatto Silva

Florianópolis
2012

Dedico este trabalho aos meus queridos pais, Valmor e Lorene, e ao Tiago, meu amor e companheiro.

AGRADECIMENTOS

À minha família, especialmente meus pais Valmor e Lorene, por acreditarem em mim, estando sempre ao meu lado nesta caminhada;

Ao Tiago, que acompanhou todos os momentos, bons e ruins, ouvindo desabafos, secando lágrimas e passando a segurança e força que eu precisava para seguir em frente;

Ao Prof. Marcos Segatto, pela oportunidade e confiança no meu trabalho;

À Prof^a. Simone Cardoso e à Prof^a. Silvia Cuffini, pelos momentos agradáveis de aprendizado;

À Hellen Stulzer e ao Alexandre Parize, que me introduziram no mundo da quitosana, fornecendo amostras e, principalmente, conhecimento;

Às amigas que levo no coração, Andréa Granada, Gabriela Rauber, Gislaine Kuminek e Manoela Riekens, que foram capazes de transformar dias difíceis em diversão;

Aos amigos do laboratório, Amarilis, Ana Carolina, Andréa M., Cassiana, Cinira, Larissa, Paulo e Rafael, pela companhia, ensinamentos, cafés e bate-papos;

Ao amigo e companheiro de trabalho Thiago Caon, pela parceria e amizade acima de tudo;

À todos os professores, servidores e colegas, que contribuíram de alguma forma na realização deste trabalho;

À UFSC, à FAPESC, e ao PGFAR por possibilitarem a realização deste trabalho, apesar dos inúmeros atrasos no pagamento da bolsa.

**A vida é assim: esquenta e esfria,
aperta e daí afrouxa,
sossega e depois desinquieta.
O que ela quer da gente é coragem.**

(Guimarães Rosa)

RESUMO

A pele é uma rota alternativa para administração de fármacos, permitindo a liberação controlada na corrente circulatória. Por outro lado, de um produto dermatológico destinado ao tratamento de patologias cutâneas é esperada a retenção do fármaco nas camadas da pele. Nanopartículas de quitosana e alginato de sódio para liberação de fármacos por via tópica foram desenvolvidas através da técnica de complexação de polieletrólitos, em que ocorre a interação de dois ou mais polieletrólitos com cargas elétricas opostas. O complexo formado entre estes dois polímeros é biodegradável, biocompatível e mecanicamente forte em baixos valores de pH onde a quitosana é solúvel. O objetivo do sistema é permitir uma maior penetração ou retenção dos ativos nas camadas da pele devido às características bioadesivas da quitosana, além da sua capacidade de fluidificar o estrato córneo e causar uma desorganização das junções epiteliais. Inicialmente, as nanopartículas foram preparadas variando a concentração de polieletrólitos na faixa de 0,4 a 2,0 mg/mL. As suspensões obtidas foram caracterizadas quanto ao grau de agregação, turbidez, pH, tamanho de partícula, polidispersão, potencial zeta, viscosidade, e morfologia. Estes parâmetros físico-químicos podem ser afetados pela concentração de polieletrólitos e pelo pH da solução de quitosana, sendo que a formulação contendo quitosana 0,9 mg/mL (pH 5,0), alginato de sódio 1,6 mg/mL, e tripolifosfato 1,0 mg/mL demonstrou os resultados mais adequados. Os fármacos ácido glicirrízico, ácido salicílico e cafeína foram incorporados ao sistema previamente desenvolvido. O ácido glicirrízico apresentou os melhores resultados de eficiência de encapsulação, teor, e recuperação. A formulação AG 3_{pH5,0} (preparada com ácido glicirrízico 1,0 mg/mL; quitosana 0,9 mg/mL; alginato de sódio 1,2 mg/mL; e tripolifosfato 1,0 mg/mL) foi selecionada após caracterização físico-química. O sistema nanoparticulado possui uma limitação quanto à quantidade de fármaco capaz de ser eficientemente encapsulada, sendo que a concentração de 1,0 mg/mL (0,02 %) resultou em partículas estáveis. A morfologia revelou uma estrutura esférica e compacta, com uma superfície densa. Através das técnicas de calorimetria exploratória diferencial, termogravimetria e espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier foi possível confirmar a interação entre os polieletrólitos e o ácido glicirrízico. A suspensão de nanopartículas de ácido glicirrízico demonstrou estabilidade físico-química durante 90 dias armazenada a 25 °C. Um gel de natrosol[®] para aplicação tópica foi desenvolvido utilizando a suspensão de nanopartículas como fase aquosa. Estas mantiveram suas características

iniciais após a incorporação no gel. A análise da permeação cutânea do ácido glicirrízico foi realizada em pele de orelha de porco através do modelo da câmara de difusão de Franz. Este sistema proporcionou alta retenção de ácido glicirrízico na derme e epiderme, efeito este atribuído a presença da quitosana. O uso de um gel como base retardou ainda mais a retenção do fármaco em relação à suspensão de nanopartículas, justamente pela presença de uma etapa adicional na liberação do ativo. Desta forma, o sistema nanoestruturado desenvolvido poderia ser utilizado topicamente nos casos em que uma liberação de ácido glicirrízico controlada e prolongada é desejada.

Palavras-chave: nanopartículas, quitosana, fármacos, caracterização físico-química, permeação cutânea.

ABSTRACT

The skin is an alternative route for drug administration, permitting controlled release in the bloodstream. Moreover, from a product developed for dermatological treatment is expected the drug retention in the skin layers. Chitosan and sodium alginate nanoparticles for topic drug release have been developed using the technique of polyelectrolyte complexation. In this technique, the interaction of two or more polyelectrolytes with opposite electric charges leads to the spontaneous formation of nanoparticles. The complex formed between these two polymers is biodegradable, biocompatible and mechanically strong at low pH where chitosan is soluble. In addition, while chitosan is easily degraded by lysozymes, alginate-chitosan complex showed increased resistance due to strong interaction between the polymer chains. The system aims to allow greater penetration or retention of drugs in the skin layers due to the bioadhesive characteristic of chitosan, besides its ability to fluidize the stratum corneum and to disturb the epithelial junctions. Initially, the nanoparticles were prepared varying the polyelectrolyte's concentration in the range of 0.4 to 2.0 mg/mL. The obtained suspensions were characterized according to the degree of aggregation, turbidity, pH, particle size, polydispersity, zeta potential, viscosity, and morphology. These physico-chemical parameters can be affected by the concentration of polyelectrolytes and the pH of chitosan solution. The formulation containing chitosan 0.9 mg/mL (pH 5.0), sodium alginate 1.6 mg/ml, and tripolyphosphate 1.0 mg/ml showed the most suitable results. Glycyrrhizic acid, salicylic acid and caffeine were incorporated into the system previously developed. The glycyrrhizic acid showed the best results of encapsulation efficiency, drug content, and recovery, being the chosen drug. The formulation AG 3_{pH5.0} (prepared with glycyrrhizic acid 1.0 mg/ml, chitosan 0.9 mg/ml, sodium alginate 1.2 mg/ml, and tripolyphosphate 1.0 mg/mL) was selected after physical-chemical characterization. The effect of glycyrrhizic acid concentration was evaluated and it was observed that the nanoparticulate system limits the amount of drug that can be efficiently encapsulated. The concentration of 1.0 mg/ml resulted in stable particles. The morphology revealed a compact spherical structure with a dense surface. Differential scanning calorimetry, thermogravimetry and Fourier transform infrared spectroscopy techniques were employed to confirm the interaction between the polyelectrolytes and glycyrrhizic acid. The nanoparticles suspension of glycyrrhizic acid showed physical-chemical stability during 90 days stored at 25 °C. A natrosol® gel for topical application was developed using the nanoparticles suspension as

aqueous phase. These maintained their initial characteristics after incorporation into the gel, which was qualified as a non-Newtonian pseudoplastic fluid. The analysis of the cutaneous permeation of glycyrrhizic acid was performed in the pig's ear skin model by the Franz diffusion chamber. This system provided high retention of glycyrrhizic acid in the dermis and epidermis, an effect attributed to the presence of chitosan. The use of a gel as carrier provoked a further retention of the drug comparing to the suspension of nanoparticles, precisely by the presence of an additional step in the release of active. Thus, the developed nanostructured system could be used topically in cases where a controlled and prolonged release of glycyrrhizic acid is desired.

Keywords: nanoparticles, chitosan, drugs, physical-chemical characterization, skin permeation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura da pele e seus apêndices.....	35
Figura 2	Rotas de penetração de moléculas através do estrato córneo.....	37
Figura 3	Modelos de estruturas de CPE: (A) <i>ladder</i> e (B) <i>scrambled egg</i>	43
Figura 4	Figura esquemática de uma partícula carregada e sua dupla camada elétrica.....	46
Figura 5	Representação esquemática da estrutura química da quitosana.....	48
Figura 6	Representação esquemática da estrutura química do alginato de sódio.....	52
Figura 7	Esquema representativo da reticulação entre a quitosana e o tripolifosfato.....	54
Figura 8	Reograma representando os comportamentos reológicos em função da velocidade de cisalhamento versus tensão de cisalhamento.....	59
Figura 9	Estrutura química do ácido glicirrízico.....	61
Figura 10	Estrutura química do ácido salicílico.....	64
Figura 11	Estrutura química da cafeína.....	65
Figura 12	Valores de tamanho de partícula médio das nanopartículas placebo obtidas com ALG 0,8 mg/mL.....	115
Figura 13	Valores de tamanho de partícula médio das nanopartículas placebo obtidas com ALG 1,6 mg/mL.....	116
Figura 14	Análise do tamanho de partícula e turbidez das formulações preparadas com alginato 1,6 mg/mL e TPP 1,0 mg/mL.....	117
Figura 15	Potencial zeta médio das nanopartículas placebo obtidas com ALG 0,8 mg/mL.....	120
Figura 16	Potencial zeta médio das nanopartículas placebo obtidas com ALG 1,6 mg/mL.....	120
Figura 17	Viscosidade aparente (238 s^{-1}) das suspensões de nanopartículas placebo obtidas com ALG 0,8 mg/mL.....	123
Figura 18	Viscosidade aparente (238 s^{-1}) das suspensões de nanopartículas placebo obtidas com ALG 1,6 mg/mL.....	123
Figura 19	Fotomicrografia obtida por MET de nanopartículas de QUI-ALG-TPP placebo.....	125

Figura 20	Cromatogramas obtidos utilizando fase móvel constituída por metanol:tampão fosfato de potássio 25,0 mM (60:40 v/v) adicionada de 5,0 mM de tetrabutilamônio de sódio sob fluxo de 1,2 mL/min e detecção UV a 254 nm. (a) Suspensão de nanopartículas de ácido glicirrízico; (b) Suspensão de nanopartículas placebo.....	127
Figura 21	Curva de calibração média do ácido glicirrízico obtida por CLAE, com sua respectiva equação da reta e coeficiente de correlação (R^2).....	128
Figura 22	Análise dos resíduos da curva de calibração do ácido glicirrízico obtida por CLAE.....	129
Figura 23	Cromatogramas obtidos utilizando fase móvel constituída por metanol:água (70:30 v/v) pH 2,6 sob fluxo de 1,0 mL/min e detecção UV a 237 nm. (a) Suspensão de nanopartículas de ácido salicílico; (b) Suspensão de nanopartículas placebo.....	131
Figura 24	Curva de calibração média do ácido salicílico obtida por CLAE, com sua respectiva equação da reta e coeficiente de correlação (R^2).....	132
Figura 25	Análise dos resíduos da curva de calibração do ácido salicílico obtida por CLAE.....	133
Figura 26	Cromatogramas obtidos utilizando fase móvel constituída por H_3PO_4 0,01 M (ajustado a pH 2,8 com trietilamina):acetonitrila (90:10 v/v) sob fluxo de 1,0 mL/min e detecção UV a 262 nm. (a) Suspensão de nanopartículas de cafeína; (b) Suspensão de nanopartículas placebo.....	135
Figura 27	Curva de calibração média da cafeína obtida por CLAE, com sua respectiva equação da reta e coeficiente de correlação (R^2).....	136
Figura 28	Análise dos resíduos da curva de calibração da cafeína obtida por CLAE.....	137
Figura 29	Tamanho de partícula médio obtido das suspensões de nanopartículas contendo ácido glicirrízico.....	161
Figura 30	Potencial zeta médio obtido das suspensões de nanopartículas contendo ácido glicirrízico.....	163
Figura 31	Turbidez das suspensões de nanopartículas contendo ácido glicirrízico avaliada pela transmitância (--○--) e contagens por segundo (--■--).	167
Figura 32	Tamanho de partícula (--○--) e potencial zeta (--■--)	

	das suspensões de nanopartículas contendo ácido glicirrízico.....	168
Figura 33	Fotomicrografias obtidas por MET de nanopartículas contendo AG.....	170
Figura 34	Espectro de infravermelho da QUI (A); ALG (B); TPP (C); nanopartículas placebo (D), AG (E); nanopartículas contendo AG (F); e mistura física (G).....	171
Figura 35	Curvas termoanalíticas obtidas por DSC no primeiro ciclo de aquecimento: QUI (A); ALG (B); AG (C); mistura física (D); nanopartículas placebo (E); nanopartículas contendo AG (F).....	172
Figura 36	Curvas termoanalíticas obtidas por DSC no segundo ciclo de aquecimento: QUI (A); ALG (B); AG (C); mistura física (D); nanopartículas placebo (E); nanopartículas contendo AG (F).....	175
Figura 37	Curvas termogravimétricas obtidas por TG: QUI (A); ALG (B); AG (C); mistura física (D); nanopartículas placebo (E); nanopartículas contendo AG (F).....	176
Figura 38	Eficiência de encapsulação de AG no estudo de estabilidade acelerado.....	178
Figura 39	Tamanho de partícula (--○--) e potencial zeta (--■--) das suspensões de nanopartículas contendo ácido glicirrízico submetidas ao estudo de estabilidade acelerada.....	180
Figura 40	Reogramas médios de taxa de cisalhamento <i>versus</i> tensão de cisalhamento de amostras de gel placebo (-■--) e gel contendo nanopartículas de AG (--○--)...	183
Figura 41	Reogramas médios de taxa de cisalhamento <i>versus</i> viscosidade de amostras de gel placebo (--■--) e gel contendo nanopartículas de AG (--○--).....	184
Figura 42	Fotomicrografia obtida por MET de gel contendo nanopartículas de AG.....	186
Figura 43	Esquema representativo da câmara de difusão de Franz.....	201
Figura 44	Cromatograma obtido após análise por CLAE de amostra de pele sem a presença de fármaco. Fase móvel constituída por metanol:tampão fosfato de potássio 25,0 mM (60:40 v/v) adicionada de 5,0 mM de tetrabutylamônio de sódio sob fluxo de 1,2 mL/min e detecção UV a 254 nm.....	205

Figura 45	Curva de calibração média do ácido glicirrízico obtida por CLAE, com sua respectiva equação da reta e coeficiente de correlação (R^2).....	206
Figura 46	Análise dos resíduos da curva de calibração do ácido glicirrízico obtida por CLAE.....	206
Figura 47	Perfil de permeação do AG em solução através da pele de orelha de porco.....	208
Figura 48	Quantidade (%) de AG retido na epiderme e derme após 24 e 36 h. Dados: solução de AG (SAG); suspensão de nanopartículas (SNP); gel contendo nanopartículas (GNP).....	209

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Revisão de trabalhos disponíveis na literatura sobre nanopartículas incorporadas em formas semissólidas	56
Tabela 2	Composição e concentrações avaliadas no preparo das nanopartículas placebo.....	103
Tabela 3	Avaliação visual do grau de agregação dos sistemas formados.....	111
Tabela 4	Turbidez das suspensões de nanopartículas avaliada pela transmitância (T %) e contagens por segundo (kcps).....	113
Tabela 5	Turbidez das suspensões de nanopartículas avaliada pela transmitância (T %) e contagens por segundo (kcps).....	114
Tabela 6	Potencial zeta médio obtido das soluções estoque antes da complexação.....	119
Tabela 7	Potencial zeta médio das nanopartículas placebo.....	119
Tabela 8	Valores de <i>n</i> obtidos das suspensões de nanopartículas placebo.....	122
Tabela 9	Resultados do teste de conformidade do sistema.....	127
Tabela 10	Resultados dos ensaios de precisão e exatidão do método de quantificação de ácido glicirrízico.....	130
Tabela 11	Condições cromatográficas e faixa investigada durante o teste de robustez do método do ácido glicirrízico.....	130
Tabela 12	Resultados do teste de conformidade do sistema.....	131
Tabela 13	Resultados dos ensaios de precisão e exatidão do método de quantificação de ácido salicílico.....	133
Tabela 14	Condições cromatográficas e faixa investigada durante o teste de robustez do método do ácido salicílico.....	134
Tabela 15	Resultados do teste de conformidade do sistema.....	135
Tabela 16	Resultados dos ensaios de precisão e exatidão do método de quantificação de cafeína.....	137
Tabela 17	Condições cromatográficas e faixa investigada durante o teste de robustez do método da cafeína.....	138
Tabela 18	Composição das formulações de suspensões de nanopartículas contendo ácido glicirrízico.....	139
Tabela 19	Resultados de eficiência de encapsulação (EE %), teor ($\mu\text{g/mL}$) e recuperação (%) obtidos com as formulações contendo ácido glicirrízico.....	139

Tabela 20	Composição das formulações de suspensões de nanopartículas contendo ácido salicílico.....	141
Tabela 21	Resultados de eficiência de encapsulação (EE %), teor ($\mu\text{g/mL}$) e recuperação (%) obtidos com as formulações contendo ácido salicílico.....	141
Tabela 22	Composição das formulações de suspensões de nanopartículas contendo cafeína.....	143
Tabela 23	Resultados de eficiência de encapsulação (EE %), teor ($\mu\text{g/mL}$) e recuperação (%) obtidos com as formulações contendo cafeína.....	143
Tabela 24	Composição das formulações de suspensões de nanopartículas contendo ácido glicirrízico.....	156
Tabela 25	Turbidez das suspensões de nanopartículas contendo ácido glicirrízico avaliada pela transmitância (T %) e contagens por segundo (kcps).....	160
Tabela 26	Turbidez das suspensões de nanopartículas placebo e com ácido glicirrízico avaliada pela transmitância (T %) e contagens por segundo (kcps).....	161
Tabela 27	Tamanho de partícula médio das nanopartículas placebo e com ácido glicirrízico.....	162
Tabela 28	Potencial zeta médio das nanopartículas placebo e com ácido glicirrízico.....	164
Tabela 29	Viscosidade e valor de n (índice de fluxo) obtidos das suspensões de nanopartículas contendo ácido glicirrízico.....	165
Tabela 30	Viscosidade média das suspensões de nanopartículas placebo e com ácido glicirrízico.....	166
Tabela 31	Resultados de eficiência de encapsulação (EE %), teor ($\mu\text{g/mL}$) e recuperação (%) obtidos com as formulações contendo ácido glicirrízico.....	168
Tabela 32	Formulação selecionada após caracterização físico-química.....	169
Tabela 33	Dados obtidos a partir da análise termogravimétrica diferencial.....	177
Tabela 34	Resultados dos ensaios de precisão e exatidão do método de quantificação de AG em amostras de pele.....	207

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agencia Nacional de Vigilância Sanitária
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DPR	Desvio Padrão Relativo
DRX	Difração de raio-x
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
g	Gramas
h	Hora
ICH	<i>International Conference of Harmonization</i>
IV	Infravermelho
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
µg	Micrograma
µm	Micrômetro
mm	Milímetro
MET	Microscopia Eletrônica de Varredura
mg	Miligrama
mL	Mililitro
nm	nanômetro
RPM	Rotações por Minuto
TG	Termogravimetria
USP	<i>United States Pharmacopea</i>
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL.....	29
1.1	OBJETIVOS.....	31
1.1.1	Objetivo geral.....	31
1.1.2	Objetivos específicos.....	31
CAPÍTULO I – REVISÃO DE LITERATURA		
1	INTRODUÇÃO.....	35
1.1	PELE.....	35
1.1.1	Anatomia e fisiologia.....	35
1.1.2	Rotas de permeação.....	37
1.1.3	A pele como via de administração.....	39
1.2	NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS.....	41
1.2.1	Técnicas de preparação de nanopartículas poliméricas.....	41
1.2.2	Caracterização físico-química de nanopartículas.....	44
1.2.3	Aplicação tópica de nanopartículas.....	47
1.3	POLIELETRÓLITOS FORMADORES DE CPES... ..	48
1.3.1	Quitosana.....	48
1.3.2	Alginato de sódio.....	52
1.3.3	Tripolifosfato de sódio.....	53
1.4	INCORPORAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS EM BASES SEMISSÓLIDAS.....	55
1.4.1	Reologia.....	58
1.4.1.1	Comportamentos reológicos.....	59
1.5	FÁRMACOS – ÁCIDO GLICIRRÍZICO, ÁCIDO SALICÍLICO E CAFEÍNA.....	60
1.5.1	Ácido glicirrízico.....	60
1.5.2	Ácido salicílico.....	63
1.5.3	Cafeína.....	65
2	REFERÊNCIAS.....	68
CAPÍTULO II - PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS OBTIDAS ATRAVÉS DE COMPLEXAÇÃO ENTRE QUITOSANA E ALGINATO DE SÓDIO		
1	INTRODUÇÃO.....	101
2	METODOLOGIA.....	102
2.1	PREPARAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS PLACEBO (SEM FÁRMACO).....	102

2.2	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS NANOPARTÍCULAS PLACEBO (SEM FÁRMACO).....	103
2.2.1	Grau de agregação.....	103
2.2.2	Turbidez.....	103
2.2.3	Determinação do tamanho de partícula e distribuição.....	104
2.2.4	Determinação do potencial zeta.....	104
2.2.5	Determinação do pH	104
2.2.6	Reologia.....	104
2.2.7	Morfologia.....	105
2.3	INCORPORAÇÃO DE FÁRMACOS NAS NANOPARTÍCULAS.....	105
2.3.1	Desenvolvimento e validação dos métodos analíticos (CLAE) utilizados para quantificação dos fármacos.....	105
2.3.1.1	Desenvolvimento do método para quantificação do ácido glicirrízico.....	106
2.3.1.2	Desenvolvimento do método de quantificação do ácido salicílico.....	106
2.3.1.3	Desenvolvimento do método de quantificação da cafeína.....	106
2.3.1.4	Conformidade do sistema.....	106
2.3.1.5	Validação dos métodos.....	107
2.3.1.5.1	<i>Especificidade.....</i>	<i>107</i>
2.3.1.5.2	<i>Linearidade, e Limites de Detecção (LD) e Quantificação (LQ).....</i>	<i>107</i>
2.3.1.5.3	<i>Exatidão.....</i>	<i>108</i>
2.3.1.5.4	<i>Precisão.....</i>	<i>108</i>
2.3.1.5.5	<i>Robustez.....</i>	<i>108</i>
2.3.2	Determinação da eficiência de encapsulação e do teor de fármaco nas suspensões de nanopartículas.....	109
2.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	109
3	RESULTADOS.....	110
3.1	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS NANOPARTÍCULAS PLACEBO (SEM FÁRMACO).....	111
3.1.1	Grau de agregação.....	111
3.1.2	Turbidez	112
3.1.3	Determinação do tamanho de partícula e	

	distribuição.....	115
3.1.3.1	Correlação entre tamanho de partícula e turbidez.....	117
3.1.4	Determinação do Potencial zeta.....	118
3.1.5	Determinação do pH.....	121
3.1.6	Reologia.....	121
3.1.7	Morfologia.....	124
3.2	INCORPORAÇÃO DE FÁRMACOS NAS NANOPARTÍCULAS.....	125
3.2.1	Desenvolvimento e validação dos métodos analíticos (CLAE) utilizados para quantificação dos fármacos.....	126
3.2.1.1	Desenvolvimento do método para quantificação do ácido glicirrízico.....	126
3.2.1.1.1	<i>Validação do método.....</i>	128
3.2.1.1.1.1	Especificidade.....	128
3.2.1.1.1.2	Linearidade, e Limites de Detecção (LD) e Quantificação (LQ).....	128
3.2.1.1.1.3	Exatidão e Precisão.....	129
3.2.1.1.1.4	Robustez.....	130
3.2.1.2	Desenvolvimento do método para quantificação do ácido salicílico.....	131
3.2.1.2.1	<i>Validação do método.....</i>	132
3.2.1.2.1.1	Especificidade.....	132
3.2.1.2.1.2	Linearidade, e Limites de Detecção (LD) e Quantificação (LQ).....	132
3.2.1.2.1.3	Exatidão e Precisão.....	133
3.2.1.2.1.4	Robustez.....	134
3.2.1.3	Desenvolvimento do método para quantificação da cafeína.....	134
3.2.1.3.1	<i>Validação do método.....</i>	136
3.2.1.3.1.1	Especificidade.....	136
3.2.1.3.1.2	Linearidade, e Limites de Detecção (LD) e Quantificação (LQ).....	136
3.2.1.3.1.3	Exatidão e Precisão.....	137
3.2.1.3.1.4	Robustez.....	138
3.2.2	Determinação da eficiência de encapsulação e do teor de fármaco nas suspensões de nanopartículas.....	138
3.2.2.1	Determinação da eficiência de encapsulação e do teor de ácido glicirrízico.....	138

3.2.2.2	Determinação da eficiência de encapsulação e do teor de ácido salicílico.....	141
3.2.2.3	Determinação da eficiência de encapsulação e do teor de cafeína.....	142
4	CONCLUSÕES.....	144
5	REFERÊNCIAS.....	145

CAPÍTULO III - ÁCIDO GLICIRRÍZICO: PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS E INCORPORAÇÃO EM GEL TÓPICO

1	INTRODUÇÃO.....	155
2	METODOLOGIA.....	156
2.1	PREPARAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE AG.....	156
2.2	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS NANOPARTÍCULAS DE AG.....	156
2.2.1	Espectroscopia de Infravermelho.....	157
2.2.2	Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e Termogravimetria (TG).....	157
2.3	ESTUDO DE ESTABILIDADE PRELIMINAR....	158
2.4	PREPARAÇÃO DO GEL CONTENDO AS NANOPARTÍCULAS DE AG.....	158
2.5	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO GEL CONTENDO NANOPARTÍCULAS DE AG.....	158
2.5.1	Características organolépticas.....	158
2.5.2	Determinação do pH do gel.....	158
2.5.3	Determinação do teor de AG no gel.....	159
2.5.4	Determinação do tamanho de partícula no gel... 	159
2.5.5	Determinação do potencial zeta das nanopartículas no gel.....	159
2.5.6	Reologia do gel contendo nanopartículas de AG. 	159
2.5.7	Morfologia das nanopartículas no gel.....	159
2.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	160
3	RESULTADOS.....	160
3.1	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS NANOPARTÍCULAS CONTENDO ÁCIDO GLICIRRÍZICO.....	160
3.1.1	Turbidez.....	160
3.1.2	Determinação do tamanho de partícula e	

	distribuição.....	161
3.1.3	Determinação do potencial zeta.....	163
3.1.4	Determinação do pH.....	164
3.1.5	Reologia.....	164
3.2	AVALIAÇÃO DO EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE AG.....	166
3.2.1	Turbidez.....	166
3.2.2	Determinação do tamanho de partícula e potencial zeta.....	167
3.2.3	Determinação da eficiência de encapsulação, recuperação e teor de AG.....	168
3.3	MORFOLOGIA.....	169
3.4	ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO.....	170
3.5	CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC) E TERMOGRAVIMETRIA (TG).....	173
3.6	ESTUDO DE ESTABILIDADE PRELIMINAR...	178
3.6.1	Teor, eficiência de encapsulação e recuperação de AG.....	178
3.6.2	Tamanho de partícula e potencial zeta.....	179
3.7	PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO GEL CONTENDO AS NANOPARTÍCULAS DE AG.....	181
3.7.1	Características organolépticas.....	181
3.7.2	Determinação do pH do gel.....	181
3.7.3	Determinação do teor de AG no gel.....	182
3.7.4	Determinação do tamanho de partícula.....	182
3.7.5	Determinação do potencial zeta.....	182
3.7.6	Reologia.....	182
3.7.7	Morfologia.....	185
4	CONCLUSÕES.....	186
5	REFERÊNCIAS.....	188

CAPÍTULO IV - AVALIAÇÃO DA PERMEAÇÃO E RETENÇÃO CUTÂNEA DE NANOPARTÍCULAS PREPARADAS COM QUITOSANA, ALGINATO E ÁCIDO GLICIRRÍZICO

1	INTRODUÇÃO.....	199
1.1	AVALIAÇÃO DA PERMEAÇÃO E RETENÇÃO CUTÂNEA.....	200
1.1.1	Modelo de difusão da câmara de Franz.....	200
2	METODOLOGIA.....	201

2.1	REVALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO (CLAE) UTILIZADO PARA QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDO GLICIRRÍZICO EM AMOSTRAS DE PELE.....	201
2.1.1	Especificidade	202
2.1.2	Linearidade, e limites de detecção (LD) e quantificação (LQ)	202
2.1.3	Precisão e exatidão	202
2.2	OBTENÇÃO DA PELE DE ORELHA SUÍNA...	203
2.3	AVALIAÇÃO DA PERMEAÇÃO E/OU RETENÇÃO CUTÂNEA DE AG.....	203
2.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	205
3	RESULTADOS	205
3.1	REVALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO (CLAE) UTILIZADO PARA QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDO GLICIRRÍZICO EM AMOSTRAS DE PELE.....	205
3.2	AVALIAÇÃO DA PERMEAÇÃO E/OU RETENÇÃO CUTÂNEA DE AG.....	207
4	CONCLUSÕES	211
5	REFERÊNCIAS	212
	CONCLUSÕES	217
	APÊNDICE A - CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS FÁRMACOS (ácido glicirrízico, ácido salicílico e cafeína)	219

1 INTRODUÇÃO GERAL

A administração de fármacos pela pele vem sendo amplamente utilizada como uma alternativa a outras vias usuais, pois é capaz de aumentar a biodisponibilidade, evitar o metabolismo de primeira passagem do fígado e a degradação enzimática no sistema gástrico (LV et al., 2011; POLLETO et al., 2011; SMITH; WOOD; DORNISH, 2004). Além disso, formulações dermatológicas destinadas ao tratamento de patologias cutâneas devem ser capazes de reter o fármaco nas camadas da pele, evitando um efeito sistêmico (SATO et al., 2007). Entretanto, apesar de inúmeras vantagens como grande área superficial, pequena degradação enzimática e o longo tempo de aplicação permitido pela liberação cutânea, a função barreira do estrato córneo representa a principal limitação desta rota de administração (ANTON; BENOIT; SAULNIER, 2008; BOLZINGER et al., 2012; YENILMEZ; BASARAN; YAZAN, 2010).

Para contornar esta limitação, o desenvolvimento de sistemas nanoparticulados apresenta-se como uma estratégia interessante, uma vez que poderia causar uma maior penetração do ativo pelas subcamadas da epiderme a fim de alcançar seu local de ação, além de reduzir efeitos colaterais e prolongar o efeito terapêutico devido à liberação controlada do fármaco a partir da nanoestrutura (ALENCASTRE et al., 2006; FORSTER et al., 2009; SCHAFER-KORTING; MEHNERT; KORTING, 2007; SENYIGIT et al., 2010; SHIN et al., 2010).

Dentre os diversos polímeros utilizados no desenvolvimento de nanopartículas, a quitosana possui características biofarmacêuticas ideais, como sensibilidade ao pH, biocompatibilidade, bioadesão, permeabilidade, biodegradabilidade e atoxicidade (BALDRIK, 2010; GAN & WANG 2007). Pode atuar como um acelerador da permeação de fármacos por via tópica, devido à interação das cargas positivas com a membrana celular epitelial, resultando em uma reorganização estrutural das junções epiteliais, permitindo o transporte paracelular de compostos hidrofílicos (SCHIPER et al., 1997; SHIN et al., 2012; SMITH; WOOD; DORNISH, 2004; VLLASALIU et al., 2010; ZHOU et al., 2010). Outros estudos sugerem que a quitosana é capaz de aumentar a hidratação do estrato córneo e diminuir o potencial de membrana, promovendo a permeação através da pele (HE et al., 2009; MIHRANYAN, FERRAZ, STROMME, 2011). O fato de ser solubilizada em ácidos diluídos é outro fator positivo para seu uso por via tópica, pois apresenta afinidade pela superfície ácida da pele (JUNGINGER & VERHOEF, 1998; SCHMID-WENDTNER &

KORTING 2007). O alginato de sódio é um polieletrólito aniônico frequentemente utilizado na formação de nanopartículas através de interação eletrostática com a quitosana. Ao mesmo tempo em que o complexo formado entre estes dois polímeros é biodegradável e biocompatível, ele também é mecanicamente forte em baixos valores de pH onde a quitosana é solúvel. Além disso, enquanto esta é facilmente degradada pelas lisozimas, o complexo quitosana-alginato demonstrou maior resistência devido a forte interação entre as cadeias poliméricas (HAMMAN, 2010).

Após o desenvolvimento de um sistema nanoparticulado, este deve ser incorporado em uma formulação com viscosidade adequada para aplicação tópica. O gel é capaz de criar uma dispersão uniforme das nanopartículas na matriz polimérica e aumentar o tempo de contato e a deposição das mesmas sobre a pele, resultando em um aumento da permeação do ativo (BATHEJA et al., 2011).

Considerando o exposto, o presente trabalho propôs-se a desenvolver nanopartículas para a administração de fármacos topicamente. Para este fim, o ácido glicirrízico, o ácido salicílico e a cafeína foram encapsulados em nanopartículas formadas através da complexação dos polieletrólitos quitosana e alginato de sódio. O ácido glicirrízico ((3 β , 20 β)-20-carboxi-11-oxo-30-norlean-12-en-3-yl-2-*o*- β -17-glucopiranosil- α -D-ácido glucopiranosidurônico) é o principal componente ativo da raiz de Alcaçuz (*Glycyrrhiza uralensis*, Fisch) (CIRILLO et al., 2011). O ácido salicílico (ácido 2-hidroxibenzóico) é um beta-hidroxi ácido com valor de pKa de 2,8 o que o torna um ácido fraco, solúvel em água, apresentando atividade anti-inflamatória e antimicrobiana (LEE & KIM, 2003; SHOU et al., 2009). A cafeína (1,3,7-trimetilxantina) é um estimulante do sistema nervoso central e diurético, sendo também aplicada externamente em formulações tópicas.

O fármaco que apresentar os resultados mais adequados após caracterização físico-química foi selecionado para a formulação final. O esperado é que o sistema nanoparticulado permita uma maior penetração ou retenção do ativo nas camadas da pele devido às características bioadesivas da quitosana, além de uma liberação prolongada e controlada.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Desenvolver nanopartículas para aplicação tópica utilizando quitosana e alginato de sódio contendo os fármacos ácido glicirrízico, ácido salicílico ou cafeína.

1.1.2 Objetivos específicos

Desenvolver estratégias experimentais para a obtenção de nanopartículas de quitosana e alginato de sódio e caracterizá-las quanto ao grau de agregação, turbidez, pH, tamanho de partícula, polidispersão, potencial zeta, viscosidade e morfologia;

Desenvolver e validar métodos analíticos para quantificação dos fármacos nas nanopartículas;

Incorporar os fármacos nas nanopartículas de quitosana e alginato de sódio e caracterizá-las quanto à eficiência de encapsulação, teor de fármaco, e demais técnicas já descritas a fim de selecionar o fármaco mais adequado para o sistema;

Avaliar o efeito da concentração de fármaco selecionado nas características físico-químicas das suspensões de nanopartículas;

Avaliar a interação do fármaco selecionado com as nanopartículas através de técnicas de calorimetria exploratória diferencial (DSC), termogravimetria (TG) e espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR);

Realizar estudo de estabilidade acelerado da suspensão de nanopartículas;

Desenvolver gel contendo nanopartículas para aplicação tópica e caracterizá-lo quanto às características organolépticas, pH, teor, tamanho de partícula, potencial zeta, reologia e morfologia;

Realizar avaliação *in vitro* da permeação cutânea dos fármacos em pele de orelha suína através do modelo da câmara de difusão de Franz.

CAPÍTULO I
REVISÃO DE LITERATURA

1 INTRODUÇÃO

1.1 PELE

A pele é o maior órgão do corpo que atua retendo água e como uma barreira contra a penetração de agentes externos. A penetração na pele é uma etapa essencial para que ocorra uma contaminação por microrganismos ou substâncias químicas, para liberação de fármacos na pele (tratamentos dermatológicos) ou através da pele (transdérmicos), e para o cuidado e proteção (cosméticos) (BOLZINGER et al., 2012; PATZELT et al., 2008). Adicionalmente, a pele contribui para o controle da temperatura corporal (termorregulação); apresenta funções endócrinas, como por exemplo, síntese da vitamina D e síntese periférica de pró-hormônios (como a conversão da testosterona em diidrotestosterona, mais ativa) e funções sensoriais (dor, tato, percepção de temperatura) (MENON, 2002).

1.1.1 Anatomia e fisiologia

A pele humana é composta de duas camadas principais de tecidos: a epiderme celular, estratificada e avascular; a derme subjacente de tecido conectivo e gordura subcutânea (figura 1).

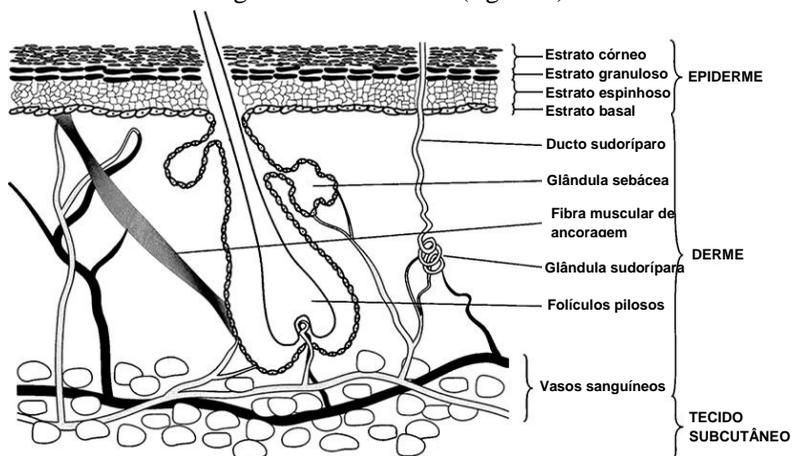


Figura 1. Estrutura da pele e seus apêndices (EL MAGHRABY; BARRY; WILLIAMS, 2008).

A epiderme é dividida em duas camadas: o estrato córneo e a epiderme viável. O primeiro constitui a camada mais superficial da pele

e possui uma estrutura estratificada, sendo constituído por dois sistemas heterogêneos compostos por queratinócitos (também conhecidos como corneócitos, nesta camada), embebidos em uma matriz lipídica intercelular, organizada em bicamadas lamelares. Os lipídeos são ácidos graxos, colesterol e esfingolipídeos, a exemplo das ceramidas, representando a principal barreira física à entrada de substâncias na pele e à perda de água (ARAYACHUKEAT; WANICHWECHARUNGRUANG; TREE-UDOM, 2011). Esta camada superficial possui espessura entre 5 e 20 μm e é altamente hidrofóbica. A função barreira depende do teor e da composição dos lipídios e, em particular, do arranjo estrutural das matrizes lipídicas intercelulares e da bicamada lipídica que envolve as células. Além da função barreira, o estrato córneo atua como um reservatório para fármacos aplicados topicamente (KORTING & SCHAFFER-KORTING, 2010; SUHONEN; BOWSTRA; URTTI, 1999). Substâncias que penetram por esta camada estão sujeitas ao metabolismo na epiderme viável, que é o maior sítio de metabolismo da pele (BOUWSTRA et al., 2003; HARDING, 2004).

A epiderme viável (50-150 μm) é subdividida em três camadas: estrato germinativo (camada basal), estrato espinhoso (camada espinhosa), e estrato granuloso (camada granular). Cada camada é definida pela posição, morfologia e estado de diferenciação dos queratinócitos. As células tornam-se queratinizadas à medida que migram para a superfície (BERGH et al., 1997; HOAT & LEAHY, 2003; MONTEIRO-RIVIERE, 2006; PROST-SQUARCIONI, 2006). A barreira formada pela epiderme viável é composta por células com junções contendo lacunas estreitas e aderentes (DRAELOS, 2012). Considerando-se que a epiderme não apresenta vasos sanguíneos, os nutrientes devem se difundir da derme para a epiderme para garantir a viabilidade da mesma (EL MAGHRABY; BARRY; WILLIAMS, 2008).

A derme consiste em uma matriz de tecido conectivo de 3 a 5 mm de espessura entremeada de proteínas fibrosas (colágeno, elastina e reticulina) que são embebidas em uma substância composta por mucopolissacarídeos. É extensivamente vascularizada, com unidades pilosebáceas e glândulas. A derme contém também fibroblastos, macrófagos, mastócitos e leucócitos. Esse suprimento sanguíneo é fundamental para transportar nutrientes, remover produtos de degradação, regular a pressão e a temperatura e mobilizar forças de defesa (RIBEIRO, 2006). O volume de sangue na pele geralmente age como um sistema *sink*, difundindo as moléculas que alcançam os capilares, mantendo as concentrações penetrantes na derme baixas e

maximizando gradientes de concentração epidérmicos, promovendo, dessa forma, a absorção percutânea (AULTON, 2005; MOSER et al., 2001).

A hipoderme ou tecido celular subcutâneo representa uma transição do tecido dérmico conectivo fibroso para o tecido predominantemente adiposo. Esta estrutura confere proteção contra traumas físicos, além de servir como reserva energética e como barreira térmica (MONTEIRO-RIVIERE, 2006). Não possui um papel na absorção percutânea, pois se situa abaixo do sistema vascular. Os folículos pilosos e ductos sudoríferos encontrados nesta camada se comunicam com o meio externo através da superfície da pele, constituindo uma rota de trânsito de substâncias (via apêndices da pele) (EL MAGHRABY; BARRY; WILLIAMS, 2008).

1.1.2 Rotas de permeação

As moléculas são transferidas do meio externo para o estrato córneo através de três rotas principais: via transcelular e intercelular (figura 2) e através dos apêndices.

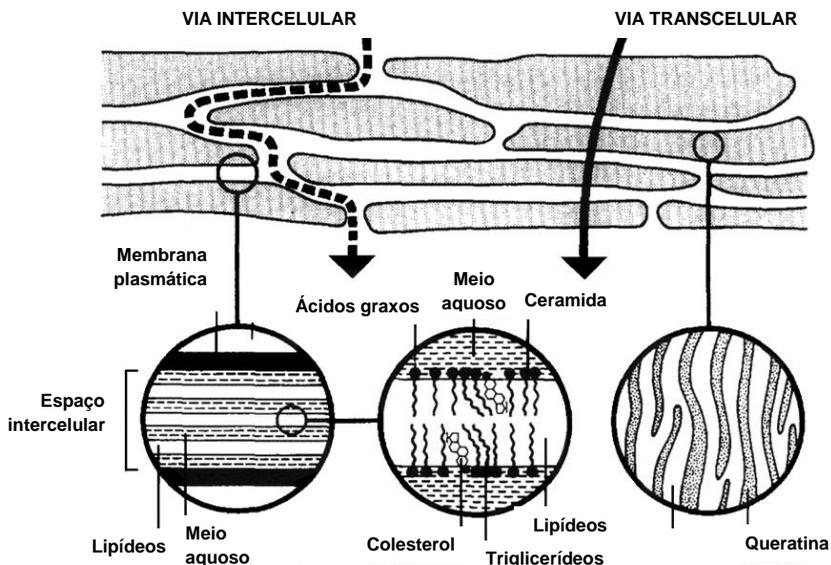


Figura 2. Rotas de penetração de moléculas através do estrato córneo (EL MAGHRABY; BARRY; WILLIAMS, 2008).

Na rota intercelular as moléculas interagem com a matriz lipídica, sem penetrar através das células. Esta via é descrita como a rota predominante de permeação, especialmente para moléculas lipofílicas (ARAYACHUKHEAT; WANICHWECHARUNGRUANG; TREEUDOM, 2011; KORTING & SCHAFFER-KORTING, 2010).

Na via transcelular, as moléculas (predominantemente hidrofílicas) atravessam as membranas das células por difusão e a barreira limitante é a bicamada lipídica (BUCK, 2004; PATZELT et al., 2008). Entretanto, o transporte de moléculas por esta via pode ser restrito pela presença das junções epiteliais encontradas principalmente no estrato granuloso (PROW et al., 2011; WARD; TIPPIN; THAKKER, 2000).

Os apêndices apresentam uma rota paralela, na qual macromoléculas, íons e fármacos polares de baixo peso molecular podem permear, especialmente através dos folículos pilosos (PATZELT et al., 2008; SUHONEN; BOWSTRA; URTTI, 1999).

A difusão passiva de acordo com a Lei de Fick é a via mais comum de transporte de substâncias ativas através da pele, enquanto o transporte ativo, mediado por carreadores é menos comum. A permeação de moléculas é governada por vários fatores, como o tamanho molecular, coeficiente de partição e grau de ionização, onde moléculas pequenas, lipofílicas e não-ionizadas são favorecidas (MIHRANYAN; FERRAZ; STROMME, 2011).

A primeira Lei de Fick estabelece que o fluxo de matéria (J) é proporcional à diminuição da concentração (C) e inversamente proporcional à distância (x). O sinal negativo do coeficiente de difusão (D) indica que o fluxo está na direção de redução de concentração, ou seja, diminuindo o gradiente de concentração (equação 1) (FORSTER et al., 2009).

Equação 1

$$J = -D \frac{\partial C}{\partial x}$$

No entanto, a primeira Lei de Fick também descreve o processo de difusão sob condições de estado estacionário, ou seja, quando o gradiente de concentração (C/x) não varia com o tempo. Esta situação é aplicável apenas para membranas artificiais homogêneas, não sendo observável em membranas biológicas heterogêneas, tal como o estrato córneo. Na determinação experimental da quantidade de fármaco permeada em função do tempo, observa-se que esta relação não é

totalmente linear, como se esperaria na abordagem do estado estacionário. Na realidade, observa-se, nos tempos iniciais, uma pequena curvatura, onde não há constância do fluxo em relação ao tempo. Este tempo necessário para que a passagem de um fármaco, através de uma membrana, atinja o equilíbrio é definido como *lag time* ou tempo de latência, obtido através da extrapolação da linha do estado estacionário até o eixo do tempo. Desta forma, o processo de difusão em membranas biológicas pode ser melhor explicado pela segunda Lei de Fick (equação 2), que expressa a velocidade de alteração da concentração do fármaco (C) em função do tempo (t) e da área, ou seja, duas variáveis importantes na determinação do coeficiente de difusão (FORSTER et al., 2009; NETZ & ORTEGA, 2002).

Equação 2

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C}{\partial x^2}$$

1.1.3 A pele como via de administração

A pele é uma rota alternativa para administração de fármacos, permitindo a liberação controlada na corrente circulatória e evitando efeitos adversos geralmente observados pela via oral ou parenteral (BOLZINGER et al., 2012). O uso desta via pode aumentar a biodisponibilidade, evitar o metabolismo de primeira passagem do fígado e a degradação enzimática no sistema gástrico (LV et al., 2011; POLLETO et al., 2011; SMITH; WOOD; DORNISH, 2004). Por outro lado, de um produto dermatológico destinado ao tratamento de patologias cutâneas é esperada a retenção do fármaco nas camadas da pele (SATO et al., 2007).

Muitos fatores podem afetar a liberação de fármacos na pele, tais como o peso molecular, lipofilicidade e grau de ionização da substância, a formulação, a presença de modificadores de permeação e o estado físico e grau de hidratação do estrato córneo (FORSTER et al., 2009; GUTERRES; ALVES; POHLMANN, 2007; MIHRANYAN; FERRAZ; STROMME, 2011). Para que ocorra absorção em uma administração transdérmica, a substância deve possuir uma massa molar menor do que 500 g/mol, um baixo ponto de fusão, adequada solubilidade em óleo e água, e um coeficiente de partição octanol:água ($\log P$) de 1-3 (KORTING & SCHAFFER-KORTING, 2010). Por outro lado, em formulações cosméticas e dermatológicas a absorção sistêmica deve ser evitada, sendo necessária somente a permeação cutânea por difusão da substância ativa na epiderme (GUTERRES; ALVES; POHLMANN,

2007). A administração tópica de fármacos é especialmente atrativa pela possibilidade de vetorização da substância ativa à área lesada (CHIU & TSAI, 2011).

Podem ser encontrados na literatura diversos trabalhos relatando o uso tópico de fármacos originalmente desenvolvidos para administração por via oral. Parsad e colaboradores (2002) e Kapoor, Phiske e Jerajani (2009) reportaram estudos comprovando a eficácia da aplicação tópica da prostaglandina E₂ no tratamento do vitiligo. O metotrexato por via oral é um dos fármacos mais eficazes no tratamento da psoríase, porém seu uso é limitado pela sua hepatotoxicidade, e a via tópica apresentou resultados promissores como alternativa para o tratamento (ESKICIRAK, ZEMHERI, CERKEZOGLU, 2006; KUMAR, SANDHU, KAUR, 2004; SUTTON et al., 2001; TIWARI et al., 2003). O nifedipino, um anti-hipertensivo bloqueador de canal de cálcio, é comumente utilizado como cicatrizante em fissuras anais (KATSINELOS et al., 2006; PERROTI et al., 2002). Uma solução tópica de finasteride apresentou resultados promissores no tratamento de alopecia (HAJHEYDARI et al., 2009).

Entretanto, apesar de inúmeras vantagens, como grande área superficial, pequena degradação enzimática e o longo tempo de aplicação permitido pela liberação cutânea, a função barreira do estrato córneo representa a principal limitação desta rota de administração (ANTON; BENOIT; SAULNIER, 2008; BOLZINGER et al., 2012; YENILMEZ; BASARAN; YAZAN, 2011). Geralmente, a barreira epidérmica apresenta danos no início da terapia tópica permitindo a livre penetração do fármaco. Porém, com a recuperação da capacidade de barreira do estrato córneo durante o tratamento, poderá ocorrer uma redução desta penetração podendo prejudicar a eficácia do tratamento em doenças crônicas, onde é desejável que o fármaco aplicado topicamente mantenha uma penetração adequada por longos períodos (BENFELDT; SERUP; MENNE, 1999).

O grande desafio dos pesquisadores é como desestabilizar e/ou fluidificar o estrato córneo, a fim de favorecer a difusão de moléculas através de microporos (SHIN et al., 2012). Existem algumas estratégias para reforçar a permeação ou retenção na pele, que incluem a utilização de promotores químicos, métodos físicos e novos sistemas de liberação (MOSER et al., 2001; THONG; ZHAI; MAIBACH, 2007). No desenvolvimento de novos sistemas para liberação de fármacos, micelas, lipossomas, emulsões sub-micrométricas e nanopartículas poliméricas tem sido propostas para aumentar a absorção percutânea de ativos farmacológicos, atenuando o dano causado na função de barreira da pele

(ALVAREZ-ROMAN et al., 2004; SHIM et al., 2004; GUTERRES; ALVES; POHLMANN, 2007; KULKAMP et al., 2009; MORAES et al., 2009). Assim, os sistemas nanoparticulados podem levar a uma maior penetração do ativo pelas subcamadas da epiderme a fim de alcançar seu local de ação, e a liberação controlada do fármaco a partir da nanoestrutura pode reduzir efeitos colaterais e prolongar o efeito terapêutico (ALENCASTRE et al., 2006; FORSTER et al., 2009; SCHAFER-KORTING; MEHNERT; KORTING, 2007; SENYIGIT et al., 2009; SHIN et al., 2010).

1.2 NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS

Dentre os sistemas carreadores de fármacos, as nanopartículas preparadas a partir de polímeros biodegradáveis ocupam posição de destaque. Estas podem ser definidas como partículas sólidas coloidais com tamanho inferior a 1,0 μm que carregam a substância ativa (NAGPAL; SINGH; MISHRA, 2010). Devido ao seu tamanho reduzido, podem facilmente atravessar barreiras biológicas assim como penetrar todos os tipos de células (COELHO et al., 2010).

Nanopartículas desenvolvidas com polímeros sintéticos como poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) ou polianidridos são ideais como carreadoras de fármacos insolúveis em água, como o paclitaxel e a dexametasona, além de moléculas hidrofílicas como proteínas e DNA (BILATI; ALLEMANN; DOELKER, 2005; SAHOO & LABHASETWAR, 2004; VAUTHIER et al., 2003). Entretanto, geralmente demonstram baixa eficiência de encapsulação e rápida liberação de fármacos solúveis em água (CHAVANPATIL et al., 2007). Por outro lado, polissacarídeos são polímeros naturais biodegradáveis amplamente utilizados para encapsular fármacos tanto hidrofílicos como hidrofóbicos (DAS; KASOJU; BORA, 2010; DELAIR et al., 2011; KALOTI & BOHIDAR, 2010; LI et al., 2008). Dentre os polissacarídeos mais comumente utilizados destacam-se a quitosana, o alginato de sódio e a dextrana (COELHO et al., 2010).

1.2.1 Técnicas de preparação de nanopartículas poliméricas

Nanopartículas podem ser preparadas por meio de vários métodos físico-químicos, tais como, polimerização interfacial de monômeros, emulsão seguida da evaporação do solvente, nanoprecipitação, *Salting-out*, *Spray-drying*, microemulsificação, coacervação simples ou complexa, dentre outros (AGNIHOTRI et al., 2004; KUMARI et al.,

2010; PINTO REIS et al., 2006; SINHA et al., 2004; SOPPIMATH et al., 2001).

O método de obtenção de nanopartículas representa um fator crucial para as suas características físico-químicas como distribuição de tamanho e morfologia, o que, em contrapartida, determina o comportamento destas em relação à encapsulação e liberação de ativos.

Algumas técnicas utilizadas no preparo de nanopartículas poliméricas utilizam óleos minerais e solventes orgânicos tóxicos para manter a estabilidade do polímero e melhorar o rendimento. Nanopartículas obtidas através da técnica de coacervação tem sido desenvolvidas para superar estas limitações (TIYABOONCHAI & LIMPEANCHOB, 2007).

De acordo com a definição da IUPAC (*—IUPAC Compendium of Chemical Terminology, electronic version*), a coacervação é a separação de duas fases líquidas em sistemas coloidais. A fase mais concentrada no componente coloidal é o coacervado e a outra fase é a solução de equilíbrio. Sob o termo de coacervação estão agrupadas uma série de técnicas de encapsulação baseadas na desolvatação do polímero induzida por algum procedimento que conduz a alteração das características do meio. Quando apenas uma única macromolécula está presente, o processo é designado por coacervação simples. Entre os procedimentos capazes de induzir a precipitação do polímero sob a forma de esferas destacam-se a mudança de temperatura, a modificação do pH e a adição de um não solvente ou sal (KALOTI & BOHIDAR, 2010; VILLA-JATO, 1997).

Na técnica de coacervação complexa, também chamada de formação de redes interpenetrantes ou complexação de polieletrólitos (CPE), ocorre a interação de dois ou mais polieletrólitos com cargas elétricas opostas (DAVIDENKO et al., 2008; DUCCEL et al., 2006). Devido à peculiaridade dos polieletrólitos de possuir características tanto de um polímero como de um eletrólito, o estudo destes sistemas tem atraído muita atenção pela alta relevância científica. Atualmente, os complexos de polieletrólitos (CPEs) são utilizados em larga escala como flocculantes, agentes de revestimento e, principalmente, para microencapsulação de fármacos, enzimas, células, microrganismos, entre outros. A formação do CPE pode resultar em diferentes estruturas, dependendo das características dos componentes utilizados e das condições externas de reação. Existem dois modelos estruturais discutidos na literatura (figura 3):

- 1) A estrutura chamada “*ladder model*”, onde a formação do complexo ocorre em nível molecular, através de uma adaptação conformacional.
- 2) A estrutura chamada “*scrambled egg model*”, onde um grande número de cadeias é incorporado dentro da partícula.

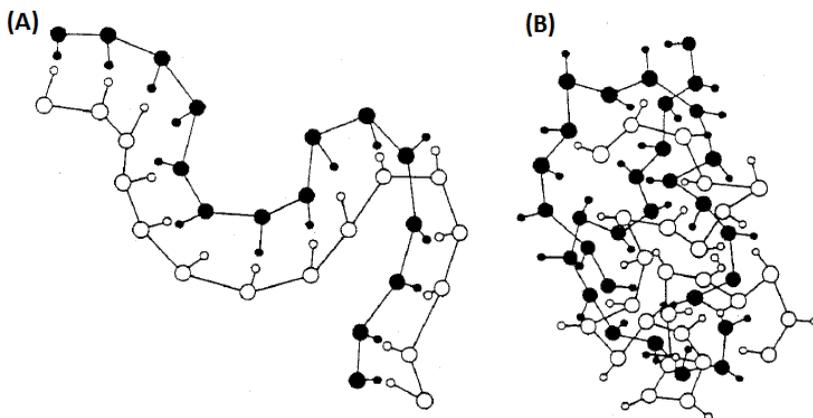


Figura 3. Modelos de estruturas de CPE: (A) *ladder* e (B) *scrambled egg* (RADEVA et al., 2001).

Esta estrutura organizacional é influenciada pela razão molar e massa molar dos polieletrólitos utilizados. Geralmente sistemas compostos por polieletrólitos de baixa massa molar e fracos grupos iônicos originam estruturas tipo *ladder*, enquanto os de alta massa molar e fortes grupos iônicos originam estruturas tipo *scrambled egg* (GOYCOOLEA et al., 2009; HARTIG et al., 2007).

Para incorporação de fármacos, o modelo *scrambled egg* é o ideal, pois é capaz de formar uma estrutura entrelaçada que pode aprisionar o fármaco em seu núcleo, denominado encapsulação física. Neste modelo, as partículas consistem em um núcleo compacto neutro cercado por uma camada carregada do componente em excesso. Esta camada externa estabiliza a partícula evitando aglomeração. A compactação do núcleo pode variar dependendo das densidades de carga dos componentes (RADEVA et al., 2001).

As dispersões de complexos de polieletrólitos (CPEs) resultam principalmente de fortes interações eletrostáticas entre macromoléculas com cargas opostas. Estas interações possuem força suficiente para prevenir a dissolução do complexo em água (AELENEI et al., 2009; SILVA et al., 2008). A interação também pode ocorrer entre os resíduos

de suas cadeias laterais ou pelas interações entre outro grupamento presente na macromolécula. Entretanto, ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas e forças de van der Waals podem complementar a formação (BHATTARAI; GUNN; ZHANG, 2010; BODDOHI & KIPPER, 2010; SANKALIA et al., 2007; SIMSEK-EGE; BOND; STRINGER, 2003).

A mistura de soluções contendo poliânions e polications leva a formação espontânea de CPEs, dependendo da força e localização dos sítios iônicos, da rigidez da cadeia polimérica, do pH, temperatura, força iônica, peso molecular, velocidade da mistura, entre outros fatores (HARTIG et al., 2007; HAMMAM, 2010). É fundamental que exista um equilíbrio entre cargas positivas e negativas de modo que a maior parte dos sítios ativos estejam ligados (DUCCEL et al., 2006).

Esta técnica é particularmente interessante, pois polieletrólitos poliméricos são biodegradáveis e degradam lentamente, não alteram a função celular e utilizam água como solvente, o que é uma grande vantagem para produtos farmacêuticos. Além disso, o processo de obtenção de CPEs é fácil, rápido, realizado em temperatura ambiente e com agitação moderada (DELAIR et al., 2011). Podem ser complexados sem o uso de precursores orgânicos ou agentes reativos. A complexação é reversível e pode ser obtida com macromoléculas solúveis em água (BHATTARAI; GUNN; ZHANG, 2010).

Podem ser obtidos três tipos de CPEs (HARTIG et al., 2007):

- 1) CPEs solúvel: sistema macroscopicamente homogêneo contendo poucos agregados com interações fracas;
- 2) CPEs turvo: sistemas na faixa de transição para separação de fase, com interações fortes e que apresenta efeito Tyndall ou espalhamento de luz;
- 3) CPEs precipitado: sistema contendo duas fases, com sobrenadante líquido e precipitado no fundo (não desejável).

Os compostos geralmente utilizados na formação de CPEs são polissacarídeos (quitosana, alginato de sódio, pectina, carragenana, dextrana, carboximetilcelulose, xantana, ácido hialurônico), proteínas (gelatina, albumina, queratina) e polímeros sintéticos (ácido poliacrílico) (AELENEI et al., 2009; BHATTARAI; GUNN; ZHANG, 2010; BODDOHI & KIPPER, 2010; COELHO et al., 2010).

1.2.2 Caracterização físico-química de nanopartículas

A formação de CPEs pode ser verificada através da turbidez da suspensão resultante. A medida da turbidez, também conhecida como método *cloud point*, baseia-se num fenômeno que tem sido reconhecido

como propriedade característica de macromoléculas, e deve-se ao fato de a interação entre os polieletrólitos poder ser visualizada através da turbidez e opacidade da suspensão resultante. A turbidez pode depender da massa molar dos polieletrólitos, da concentração (número de partículas), e/ou do tamanho e polidispersão das partículas (CHIENG & CHEN 2011; DRAGAN; MIHAI; SCHWARZ, 2006; HUANG et al., 2012).

O tamanho de partícula, polidispersão, e o potencial zeta são algumas características físico-químicas fundamentais para a estabilidade dos sistemas. O conjunto de informações fornecidas pela caracterização desses sistemas pode conduzir a modelos descritivos da organização das nanopartículas em nível molecular, que será dependente da composição quali-quantitativa das formulações e método de preparação empregado (GUTERRES; ALVES; POHLMANN, 2007).

Através da técnica de espalhamento de luz dinâmico, é realizada a medida do movimento browniano das partículas em suspensão, obtendo uma correlação com o seu tamanho. Uma distribuição monomodal em uma faixa de tamanho estreita é ideal para garantir a estabilidade (MAGENHEIM & BENITA, 1991; WU; ZHANG; WATANABE, 2011). Em formulações destinadas à aplicação tópica o ideal é que o tamanho das partículas seja inferior a 600 nm (VERMA et al., 2003).

De acordo com a presença ou ausência de cargas na superfície, as nanopartículas podem ser classificadas em iônicas ou não iônicas, respectivamente. A estimativa do potencial de superfície é capaz de identificar alterações na superfície das nanopartículas. Na figura 4 pode ser visualizado um esquema de uma partícula, em que a carga da superfície influencia a distribuição espacial dos íons próximos à superfície, atraindo íons de carga oposta (contra-íons) e repelindo íons de mesma carga (co-íons). Este efeito somado aos efeitos de movimento térmico, leva à formação da dupla camada elétrica, que consiste de uma superfície carregada e de um excesso neutralizante de contra-íons sobre co-íons distribuídos de maneira difusa no meio aquoso (AULTON, 2005; NETZ & ORTEGA, 2002).

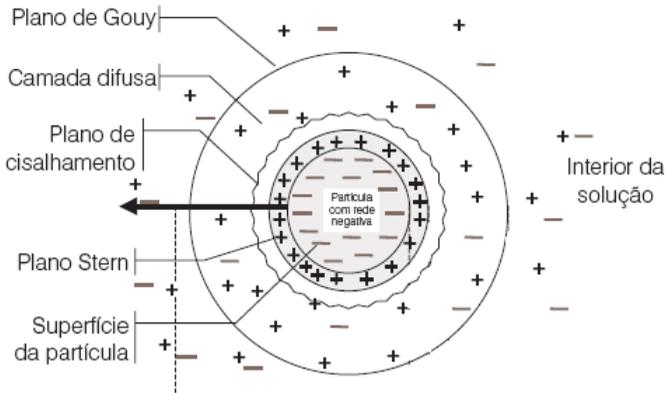


Figura 4. Figura esquemática de uma partícula carregada e sua dupla camada elétrica (<http://qnesc.sbq.org.br/online/qnesc09/quimsoc.pdf>).

Apesar de alguns autores se referirem ao potencial zeta como a carga superficial da partícula, este valor corresponde ao potencial elétrico na interface da dupla camada, sendo uma medida indireta da carga das partículas (CAI; ODE; MURAKAMI, 2006; DELGADO et al., 2005; GUNGOR et al., 2001).

Os polímeros não iônicos tendem a reduzir o valor de potencial zeta, enquanto polímeros iônicos aumentam. Valores elevados, em módulo, de potencial zeta indicam suspensões de nanocápsulas mais estáveis fisicamente, pois a repulsão entre as partículas previne a agregação (COUVRER et al., 2002; POLLETO et al., 2011; SANTANDER-ORTEGA, 2010).

Dependendo da natureza química dos polímeros utilizados, as partículas com superfícies iônicas podem ser classificadas como aniônica (negativa) ou catiônica (positiva). Polímeros negativamente carregados geralmente são formados por ácidos acrílico e metacrílico, enquanto polímeros positivamente carregados geralmente contém grupos amino substituintes (SANTANDER-ORTEGA et al., 2010).

A estabilidade química das suspensões pode ser monitorada pela análise do pH, pois a sua diminuição pode indicar a degradação dos polímeros ou outros componentes. Análises de calorimetria exploratória diferencial, termogravimetria, e infravermelho fornecem informações sobre a organização dos componentes das nanopartículas em nível molecular. Adicionalmente, a microscopia é útil na caracterização da morfologia e tamanho das partículas (GUTERRES; ALVES; POHLMANN, 2007).

1.2.3 Aplicação tópica de nanopartículas

As nanopartículas vem sendo largamente utilizadas com sucesso, promovendo a oclusão da pele, a proteção química, mascarando cor/odor e como carreador de fármacos em veículos de uso tópico (MODDARESI et al., 2010). A suspensão de nanopartículas deve ser levemente ácida, a fim de manter a afinidade pelo pH fisiológico da pele. Após a aplicação tópica, as nanopartículas formam um filme fino na pele, que pode levar a uma liberação prolongada do ativo e uma maior capacidade de retenção da pele (POLLETO et al., 2011). Apresenta ainda outras vantagens, como melhorar a estabilidade de fármacos lábeis, capacidade de vetorização, aumento da biodisponibilidade, habilidade de incorporar fármacos com diferentes características físico-químicas, e o pequeno tamanho que permite um maior contato com o estrato córneo (MONTENEGRO et al, 2012).

As características superficiais das nanopartículas podem influenciar não somente a estabilidade físico-química das formulações, mas também seu comportamento na pele. Por exemplo, a bioadesividade ao estrato córneo está relacionada à carga superficial das nanopartículas, reduzindo a perda de ativo que poderia ocorrer durante a aplicação (POLLETO et al., 2011). Estudos realizados em suínos descrevem que nanopartículas positivamente carregadas apresentaram maior afinidade pela pele, que é negativamente carregada e liberaram uma maior quantidade de ativo no estrato córneo (WU et al., 2010). Em outro estudo, um grupo amino foi quimicamente ligado a uma cadeia de poli(ácido láctico-co-ácido glicólico), sendo que as nanopartículas formadas aumentaram a penetração de genisteína em pele humana (SHIN et al., 2010).

Segundo Alencastre e colaboradores (2006), a liberação da substância ativa de sistemas particulados via tópica está direta ou indiretamente ligada aos seguintes fatores: (i) presença ou ausência de macro e microporos no sistema particulado; (ii) tamanho de partícula, já que as nanopartículas possuem grande probabilidade de penetrar no estrato córneo, enquanto micropartículas podem ficar retidas na superfície ou penetrar via folículos pilosos; (iii) características intrínsecas relacionadas ao processo de fabricação e materiais utilizados; (iv) características intrínsecas da substância ativa a ser encapsulada; (v) dependendo das características da substância ativa e carreador, podem ser esperados diferentes comportamentos de liberação, pois a substância ativa deve difundir através das barreiras da pele para alcançar seu sítio de ação.

Desta forma, como o processo de permeação cutânea envolve diferentes etapas que incluem, primeiramente, a liberação do fármaco do veículo, seguido da sua penetração através das barreiras da pele e, por fim, a ativação da resposta farmacológica, todas estas etapas devem ser otimizadas para garantir a eficácia terapêutica. Modelos *in vivo* e *ex vivo* podem ser utilizados para prever a taxa e a extensão de penetração do(s) composto(s) e adjuvante(s), através da pele (MUHAMMAD & RIVIERE, 2006). Adicionalmente, devem ser considerados aspectos relativos à natureza físico-química do fármaco, o tipo de veículo utilizado, as condições da pele, além das interações pele/fármaco e pele/veículo (ANSEL; POPOVICH; ALLEN, 2000).

1.3 POLIELETRÓLITOS FORMADORES DE CPES

1.3.1 Quitosana

A quitosana (figura 5) é um copolímero formado por unidades de 2-desoxi-N-acetil-D-glucosamina e 2-desoxi-D-glucosamina unidas por ligações glicosídicas β 1-4, obtida a partir da desacetilação da quitina em meio alcalino (AGNIHOTRI et al., 2004; PILLAI; PAUL; SHARMA, 2009; SINHA et al., 2004).

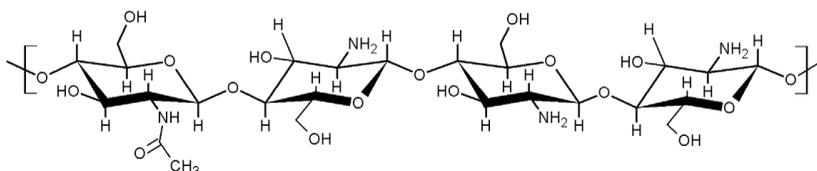


Figura 5. Representação esquemática da estrutura química da quitosana (CARREIRA et al., 2010)

A quitina é um polímero natural extraído de exoesqueleto de crustáceos, insetos, e alguns fungos, insolúvel em meio aquoso e na maioria dos solventes orgânicos, apresentando baixa reatividade química (LARANJEIRA & FAVERE, 2009; MOURYA & INAMDAR, 2008; PRASHANTH & THARANATHAN, 2007).

Na estrutura da quitina, que é insolúvel na maioria dos solventes testados, predominam unidades de 2-desoxi-N-acetil-D-glucosamina enquanto que a quitosana é predominantemente formada por unidades de 2-desoxi-D-glucosamina. O polímero passa a ser considerado quitosana quando a fração molar de grupos NH₂ na cadeia é superior a 0,5 (BODDOHI & KIPPER, 2010). O grau de desacetilação da

quitosana determina a densidade de grupos amino carregados positivamente, podendo variar de 56 a 99 % dependendo da espécie de crustáceo e do método de extração (ABOU-SHOER, 2010; MARTINS; MANO; ALVES, 2010).

A quitosana é uma base fraca com valores de pK_a entre 5,9 e 6,7. Os grupos amino presentes em toda a extensão da cadeia polimérica atuam como polieletrólitos catiônicos em $pH < 6,5$ (GEORGE & ABRAHAM, 2006). Assim, este biopolímero pode se dissolver facilmente em soluções de ácidos fracos diluídos, sendo o ácido acético o solvente mais empregado (LARANJEIRA & FAVERE, 2009). Por outro lado, conforme o pH é ajustado acima de 6,5, os grupamentos amino se tornam deprotonados e o polímero perde suas cargas, tornando-se insolúvel (DASH et al., 2011).

Com relação às características biofarmacêuticas, a quitosana possui sensibilidade ao pH , biocompatibilidade, bioadesão, permeabilidade, é biodegradável e atóxica (BALDRIK, 2010; GAN & WANG 2007). Pode ser degradada por várias enzimas, como por exemplo, lisozima, di-N-acetilquitobiase, N-acetil-beta-D-glucosaminidase e quitotriosidade, as quais estão presentes nas mucosas e outros fluidos fisiológicos (KEAN & THANOU, 2010). Apresenta citotoxicidade dependente da concentração, com concentração inibitória máxima (IC 50) variando entre 0,2 a 2,0 mg/mL na maioria dos modelos celulares. Estes valores dependem da massa molar e do grau de desacetilação (GARCIA-FUENTES & ALONSO, 2012). Testes clínicos conduzidos com biomateriais compostos por quitosana não reportaram reações inflamatórias ou alérgicas após implantação, injeção, aplicação tópica ou ingestão (DASH et al., 2011). A quitosana disponibilizada comercialmente pela empresa Sigma-Aldrich é classificada como polímero de baixa massa molar (20.000 a 190.000 g/mol) ou alta massa molar (190.000 a 375.000 g/mol) (DASH et al., 2011).

Devido às propriedades biofarmacêuticas e toxicológicas favoráveis, o uso da quitosana e seus derivados em aplicações de liberação de fármacos é um campo de pesquisa muito atraente, especialmente no desenvolvimento de nanocarreadores. O número de trabalhos utilizando quitosana como nanocarreador tem aumentado exponencialmente nas últimas duas décadas, onde os primeiros protótipos industriais já estão sendo avaliados em testes clínicos (GARCIA-FUENTES & ALONSO, 2012; MIHRANYAN; FERRAZ; STROMME, 2011).

A preparação de nanopartículas contendo quitosana pode ser realizada através de diversos métodos, os quais envolvem um ou dois tipos de associação entre macromoléculas (TAVARES et al., 2012):

- *cross-linking* covalente: necessita de um agente de *cross-linking*, como glutaraldeído e genipina (BANERJEE et al., 2002; LIU & HUANG, 2008; OCAK, 2012).

- interação física: envolve métodos como *spray-drying*, gelificação iônica, microemulsão reversa, evaporação/difusão de solvente, complexação de polieletrólitos e coacervação/precipitação (HARRIS et al., 2011; LEE et al., 2010; LEONG et al., 1998; MUKHOPADHYAY et al., 2012; RUSU et al., 2005; SHU et al., 2011; ZHU et al., 2009)

A complexação de quitosana com vários poliânions como pectina, colágeno, copolímero de ácido maléico-polialquilenoóxido e alginato de sódio mostra ser eficiente para o desenvolvimento de formulações (DAVIDENKO et al., 2009; PLAPIED et al., 2011). Em tais aplicações é extremamente importante que a quitosana seja hidrossolúvel e carregada positivamente. Estas propriedades permitem que este biopolímero interaja com polímeros carregados negativamente, macromoléculas e poliânions em meio aquoso, favorecendo a difusão de fármacos no mecanismo de liberação (CALVO et al., 1997; KRAJEWSKA, 2004; NAGPAL; SINGH; MISHRA, 2010).

A quitosana pode atuar como um acelerador da permeação de fármacos por via tópica, devido à interação das cargas positivas com a membrana celular epitelial, resultando em uma reorganização estrutural das junções epiteliais, permitindo o transporte paracelular de compostos hidrofílicos (SCHIPPER et al., 1997; SMITH; WOOD; DORNISH, 2004; SHIN et al., 2012; VLLASALIU et al., 2010; ZHOU et al., 2010). As junções epiteliais possuem uma função de barreira dinâmica que é modulada por processos celulares que regulam a movimentação de moléculas hidrofílicas através do epitélio (WARD; TIPPIN; THAKKER, 2000). Além deste mecanismo, estudos sugerem que a quitosana é capaz de alterar a camada de queratina no estrato córneo tornando-a menos rígida e, conseqüentemente, permitindo a passagem da substância ativa (HE et al., 2009). Também foi relatado que a quitosana pode aumentar a hidratação do estrato córneo e diminuir o potencial de membrana, promovendo a permeação através da pele (KHALIL et al., 2012; MIHRANYAN; FERRAZ; STROMME, 2011). O fato de ser solubilizada em ácidos diluídos é outro fator positivo para seu uso por via tópica, pois apresenta afinidade pela superfície ácida da

pele (JUNGINGER & VERHOEF, 1998; SCHMID-WENDTNER & KORTING 2007).

Diversos estudos descrevem o uso de quitosana como carreador de fármacos pela pele. Conti e colaboradores (1998) desenvolveram microesferas de quitosana contendo cetilpiridina para liberação controlada do fármaco via tópica, onde foi observado um aumento da atividade farmacológica devido a uma maior permeação. Nanopartículas de quitosana e lecitina aumentaram o acúmulo de clobetasol na epiderme, pois a nanoestrutura foi capaz de permear pelo estrato córneo, mantendo o fármaco encapsulado até a degradação completa da estrutura (SENYIGIT et al., 2009). Estudos *in vivo* de microesferas de quitosana contendo vitamina E resultaram em uma diminuição da rugosidade da pele e aumento da elasticidade e hidratação, sendo promissores para uma aplicação antienvhecimento (YENILMEZ; BAZARAN; YAZAN, 2010). Harris e colaboradores (2011) desenvolveram nanopartículas de quitosana e TPP para incorporação de polifenóis da erva mate visando uso cosmético. Estudos preliminares realizados por Ridolfi e colaboradores (2012) sugerem que nanopartículas lipídicas revestidas com quitosana apresentam um grande potencial para liberação tópica de tretinoína, devido à alta eficiência de encapsulação, estabilidade física e ausência de citotoxicidade em queratinócitos. Outro estudo avaliou nanopartículas de DNA preparadas através da interação entre quitosana e TPP para liberação de genes na pele de ratos. A quitosana protegeu o DNA da ação de enzimas, transferindo-o para a pele com sucesso (OZBAS-TURAN & AKBUGA, 2011). Hafner e colaboradores (2011) estudaram o potencial de nanopartículas de quitosana e lecitina para liberação transdérmica de melatonina. Os autores verificaram um aumento da permeação, sem danos à membrana plasmática. Em outro trabalho, lipossomas modificados pela incorporação de quitosana demonstraram uma liberação mais lenta de ácido glicólico em estudos *in vitro* (PERUGINI et al., 2000). Lam e colaboradores (2012) verificaram uma liberação controlada de 5-fluoruracil encapsulado em micropartículas de quitosana, promovendo uma inibição contínua do crescimento de queratinócitos, que são células responsáveis pelo carcinoma basocelular. Lv e colaboradores (2011) complexaram quitosana e arginina com o objetivo de aumentar a permeação de adefovir. Os autores concluíram que os grupamentos amino do complexo adsorveram na superfície celular, abrindo as junções epiteliais e permitindo o transporte paracelular do fármaco. Tan e colaboradores (2011) desenvolveram nanopartículas de quitosana e lecitina contendo quercetina. A interação

entre as nanopartículas e a superfície da pele foi capaz de modificar a morfologia do estrato córneo e quebrar a conjugação das camadas de corneócitos, o que resultou em um aumento da permeação de quercetina na epiderme. Wisuitiprot e colaboradores (2011) utilizaram micropartículas de quitosana como carreadores de catequinas do chá verde (*Camellia sinensis*) para liberação tópica. As micropartículas protegeram as catequinas da degradação enzimática e aumentaram a permeação através da rota transfolicular.

CPEs contendo quitosana modificada também são utilizados como carreadores de vacinas para administração intradérmica. Em estudo de Bal e colaboradores (2010) as nanopartículas apresentaram resultados promissores na imunização contra difteria toxóide. Verheul e colaboradores (2011) obtiveram um sistema de quitosana estabilizada com PEG contendo ovoalbumina, que demonstrou imunogenicidade superior à obtida com nanopartículas não estabilizadas.

1.3.2 Alginato de sódio

Os alginatos pertencem a uma extensa classe de polímeros polissacarídeos que formam suspensões coloidais em água (TOLSTOGUZOV, 2004). Alginato de sódio (figura 6) é um sal de sódio de ácido algínico e é um polímero aniônico solúvel em água. O ácido algínico é um conhecido polissacarídeo natural, extraído de algas marinhas pardas, que é formado de resíduos de ácido β -D-manurônico (M) e ácido α -L-gulurônico (G) unidos por ligação (1 \rightarrow 4), de composição e seqüência variada. A razão destas duas unidades influencia as propriedades físicas deste biopolímero. Estes monômeros são epímeros com diferentes orientações na cadeia polimérica, e somente a unidade G é orientada de forma a permitir a interação iônica (LAWRIE et al., 2007). Os valores de pKa das unidades ácido manurônico e ácido gulurônico do alginato é de 3,38 e 3,65, respectivamente (LI et al., 2009; MARTINS; MANO; ALVES, 2010).

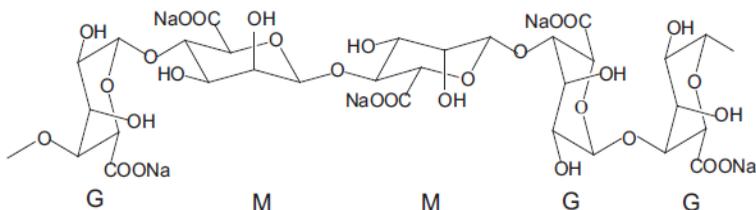


Figura 6. Representação esquemática da estrutura química do alginato de sódio (YANG; XIE; HE, 2011)

Dentre as principais propriedades do alginato destaca-se o fato de ser biocompatível, hidrofílico e biodegradável em condições fisiológicas normais (SAETHER et al., 2008). É quimicamente estável em valores de pH entre 5,0 e 10,0, sendo que valores muito ácidos causam sua descarboxilação (AELENEI et al., 2009; SANKALIA et al., 2007).

O alginato é um polieletrólito aniônico frequentemente utilizado na formação de complexos com quitosana. Ao mesmo tempo em que o complexo formado entre estes dois polímeros é biodegradável e biocompatível, ele também é mecanicamente forte em baixos valores de pH onde a quitosana é solúvel. Além disso, enquanto a quitosana é facilmente degradada pelas lisozimas, o complexo quitosana-alginato demonstrou maior resistência devido a forte interação entre as cadeias poliméricas (HAMMAN, 2010).

São descritos na literatura diversos trabalhos utilizando os polímeros quitosana e alginato de sódio na formação de nanopartículas por meio de polimerização ou interação iônica (AELENEI et al., 2009; CAFFAGI et al., 2007; LERTSUTTHIWONG; ROJSITTHISAK; NIMMANNIT, 2009; LI et al., 2008; SANKALIA et al., 2007; SARMENTO et al., 2006). O complexo quitosana-alginato reduziu a porosidade das partículas de alginato diminuindo a difusão do fármaco encapsulado (GEORGE & ABRAHAM, 2006; PRASHANTH & THARANATHAN, 2007). Chen e colaboradores (2011) desenvolveram microcápsulas de quitosana, alginato e histidina para liberação controlada de hemoglobina. Micropartículas de alginato revestidas com quitosana foram responsáveis por uma liberação prolongada de ácido retinóico na pele, promovendo menor irritação dérmica. Além disso, as micropartículas ocasionaram uma permeação do fármaco até camadas mais profundas da pele, confirmando a viabilidade deste sistema para uso tópico (LIRA et al., 2009). Yogeshkumar e colaboradores (2010) prepararam partículas milimétricas de alginato e quitosana contendo *aloe vera*. As partículas obtidas foram incorporadas em uma loção, tendo sido observado que o CPEs aumentou a estabilidade da formulação. Nanopartículas de alginato revestidas com quitosana foram avaliadas como carreadores de antígeno da hepatite B para aplicação subcutânea. A formulação foi considerada uma alternativa com potencial para administração de vacinas (BORGES et al., 2008).

1.3.3 Tripolifosfato de sódio

Partículas obtidas através de complexação de polieletrólitos apresentam características de porosidade e resistência mecânica nem sempre adequadas, requerendo algum tipo de modificação para melhorar

tais propriedades. Isto pode ser conseguido através do uso de agentes reticulantes, como o tripolifosfato de sódio (TPP).

A reticulação, também chamada gelificação iônica, consiste na formação de ligações estáveis entre segmentos de cadeias polipeptídicas dentro da molécula (ligações intramoleculares) ou entre cadeias poliméricas vizinhas (ligações intermoleculares) formando uma estrutura em rede tridimensional, normalmente mais rígida que o material não reticulado (SHU & ZHU, 2002). A reticulação pode ser química (glutaraldeído) ou física (TPP) (KALOTI & BOHIDAR, 2010; KULKARNI; SOPPIMATH; AMINABHAVI, 1999). A reticulação química pode induzir toxicidade e requer a purificação durante a formação, que pode afetar a estabilidade dos fármacos a serem encapsulados (GUPTA & JABRAIL 2008; SILVA et al., 2008). A reticulação física através de interações eletrostáticas é a preferida atualmente, pois evita o uso de reagentes tóxicos (SHU & ZHU, 2000).

A dissolução do TPP em água resulta em íons OH^- , $\text{P}_3\text{O}_{10}^{5-}$ e $\text{HP}_3\text{O}_{10}^{4-}$. Em soluções com pH básico, os íons $\text{P}_3\text{O}_{10}^{5-}$ e $\text{HP}_3\text{O}_{10}^{4-}$ podem interagir ionicamente com grupos amino protonados (NH_3^+) da quitosana através de deprotonação ou reticulação iônica. O ajuste do pH para valores abaixo de 6,0 resulta apenas em íons $\text{P}_3\text{O}_{10}^{5-}$ e as partículas podem ser formadas apenas por reticulação iônica, ocorrendo um entrelaçamento cruzado possibilitando uma aproximação entre duas moléculas de quitosana (figura 7) (DUDHANI & KOSARAJU, 2010; GOYCOOLEA et al., 2009; KALOTI & BOHIDAR, 2010; MI et al., 1999).

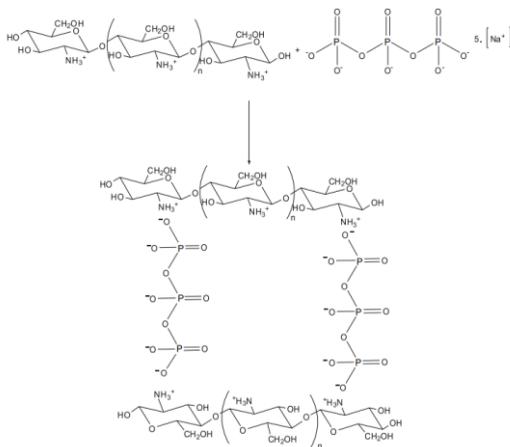


Figura 7. Esquema representativo da reticulação entre a quitosana e o tripolifosfato (COELHO et al., 2010).

Anal e Stevens (2005) desenvolveram CPEs contendo quitosana, alginato e TPP a fim de estudar a liberação de ampicilina no sistema gastrointestinal. A presença do TPP como um “reforço” na complexação ocasionou uma liberação controlada do ativo durante 24 h.

1.4 INCORPORAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS EM BASES SEMISSÓLIDAS

Suspensões de nanopartículas poliméricas podem ser aplicadas diretamente na pele ou incorporadas em uma formulação. As formulações desenvolvidas para o cuidado da pele geralmente são emulsões ou géis, devido à possibilidade de controlar a viscosidade, a qual proporciona características apropriadas para aplicação cutânea pelo paciente (GUTERRES; ALVES; POHLMANN, 2007). Estas formulações mantêm sua forma durante o armazenamento, porém fluem ou deformam quando uma força externa é aplicada (SOUTO et al., 2004).

Os géis semissólidos apresentam características sensoriais agradáveis, sendo adequados para produtos com finalidades de proteção, lubrificação, hidratação e veiculação de ativos na pele. Os géis se liquefazem ao contato com a pele, deixando uma camada delgada não-gordurosa e não oclusiva (ANSEL; POPOVICH; ALLEN, 2000).

A dispersão de nanopartículas em géis hidrofílicos pode melhorar a liberação de fármacos na pele. O gel é capaz de criar uma dispersão uniforme das nanopartículas na matriz polimérica, aumentando o tempo de contato e a deposição das nanopartículas sobre a pele, resultando em um incremento da permeação do ativo (BATHEJA et al., 2011).

As formas semissólidas contendo nanocarreadores são formulações promissoras largamente estudadas atualmente. Na tabela 1 estão resumidos os principais trabalhos sobre nanopartículas incorporadas em formas semissólidas.

Tabela 1. Revisão de trabalhos disponíveis na literatura sobre nanopartículas incorporadas em formas semissólidas.

Nanopartícula	Fármaco	Agente formador de gel	Referência
Polimérica	Indometacina	Pluronic F127 [®]	Mizayaki et al., 2003
Lipídica	----	Carbopol [®] , Natrosol [®] , Quitosana, Goma Xantana	Souto et al., 2004
Lipídica	Nimesulida	Carbopol [®]	Alves; Pohlmann; Guterres, 2005
Lipídica	Coenzima Q10	Goma xantana	Junyaprasert et al., 2009
Polimérica	Ácido flufenâmico	Natrosol [®]	Luengo et al., 2006
Lipídica	Vitamina A	Carbopol [®] , Permulen [®] , Lutrol [®] e Goma xantana	Pople & Singh, 2006
Lipídica	Triamcinolona	Carbopol [®]	Liu et al., 2008
Lipídica	Minoxidil	Carbopol [®]	Silva et al., 2009
Lipídica	Coenzima Q10	Carbopol [®]	Terroso et al., 2009
Polimérica	Dexametasona	Carbopol Ultrez [®]	Marchiori et al., 2010
Lipídica	Tacrolimus	Carbopol [®]	Pople & Singh, 2010
Polimérica	Octilmetoxicinamato	Natrosol [®]	Weiss-Angeli et al., 2010
Polimérica	Diclofenaco	Carbopol [®] e HPMC	Batheja et al., 2011
Lipídica	Inibidores de fosfolipase A2	Natrosol [®]	Pardeike et al., 2011
Polimérica	Benzofenona	Natrosol [®]	Siqueira et al., 2011
Lipídica	Aceclofenaco	Carbopol [®]	Chawla & Saraf, 2012
Polimérica	Isotretinoína	Natrosol [®]	Bettoni et al., 2012

A consistência dos géis é causada por agentes gelificantes, principalmente polímeros. Estes polímeros formam uma matriz tridimensional onde moléculas de água ligam-se através de forças intermoleculares, ocasionando uma menor mobilidade e consequente aumento da viscosidade. Os polímeros mais comumente utilizados são os derivados de ácido poliacrílico como os carbômeros, e os derivados de celulose como a hidroxipropilcelulose, hidroxietilcelulose e croscarmelose (VALENTA & AUNER, 2004).

Apesar de ser muito utilizado no preparo de géis carreadores de sistemas nanoestruturados, Souto e colaboradores (2004) relataram a incompatibilidade do gel de carbopol[®] com sistemas de nanopartículas com cargas superficiais. O carbopol[®] possui grupamentos carboxílicos que são neutralizados com NaOH. Este agente neutralizante possui íons sódio como eletrólitos, o que induz a redução da carga superficial das nanopartículas ocasionando a agregação.

Por outro lado, o Natrosol[®] (hidroxietilcelulose) possui as características físico-químicas ideais para ser utilizado como base semissólida de nanopartículas obtidas por interação eletrostática. A principal delas é seu caráter não-iônico, ou seja, o gel não é eletricamente carregado. O natrosol[®] possui características de fluido não-newtoniano de caráter pseudoplástico, é compatível com a maioria dos materiais, é solúvel em água quente ou fria e tolera uma ampla faixa de pH (KIBBE, 2000). Luengo e colaboradores (2006) incorporaram nanopartículas contendo ácido flufenâmico em um gel de natrosol[®]. Os pesquisadores demonstraram através de microscopia que tanto a forma quanto o tamanho das nanopartículas manteve-se intacta após a incorporação no gel. Similarmente, Siqueira e colaboradores (2011) não observaram interferência do natrosol[®] sobre o tamanho e potencial de superfície de nanopartículas contendo benzofenona.

Na literatura são descritas duas técnicas principais para preparo de um gel contendo nanopartículas. A mais comumente utilizada consiste em incorporar uma parte da suspensão contendo nanopartículas em um gel preparado previamente (ALVES; POHLMANN; GUTERRES, 2005). A técnica alternativa consiste em utilizar a própria suspensão de nanopartículas como fase aquosa no preparo do gel (SIQUEIRA et al., 2011). Neste caso, a suspensão deve ter uma densidade próxima da água, pois o agente espessante será disperso sob agitação na suspensão. Esta técnica é ideal para sistemas com menor concentração de partículas ou com pequeno teor de fármaco, pois a formulação final mantém o teor da suspensão original.

Após o desenvolvimento dos géis, a caracterização físico-química é realizada através de análises usuais como pH, teor de fármaco e caracteres organolépticos. As análises de tamanho de partícula, potencial zeta e morfologia são realizadas novamente para garantir que a integridade física das nanopartículas não tenha sido prejudicada no preparo do gel, já que a suspensão é submetida à adição de um agente espessante com agitação. Além disso, devido à complexidade do sistema nanoestruturado, a análise reológica é essencial para o entendimento das interações entre nanopartículas, veículo e ativo (ALVES; RAFFIN; FAGAN, 2011).

1.4.1 Reologia

A reologia é definida como o estudo das propriedades de fluxo e deformação da matéria. A compreensão adequada das propriedades reológicas de materiais farmacêuticos é essencial à preparação, ao desenvolvimento e ao desempenho das formas farmacêuticas. A definição de viscosidade foi realizada por Newton, que foi o primeiro a perceber que a velocidade do fluxo (γ) é diretamente proporcional à tensão aplicada (σ): a constante de proporcionalidade é o coeficiente de viscosidade dinâmica (η) (AULTON, 2005; GENNARO, 2000).

Em sua abordagem matemática, Newton utilizou o modelo de duas placas de áreas A , separadas por uma distância h , movimentadas através da aplicação de uma força F . De acordo com esse modelo, a força requerida por unidade de área (F/A) para manter uma diferença de velocidade entre as placas (dv/dx) é diretamente proporcional ao gradiente de velocidade através do líquido. Assim, o coeficiente de proporcionalidade é igual à viscosidade (η). A força por unidade de área é conhecida como tensão de cisalhamento (σ) e o gradiente de velocidade é conhecido como taxa de cisalhamento (γ). Quando se pensa em taxas de cisalhamento estas são, na verdade, gradientes de velocidade (BARNES; HUTTON; WALTERS, 1989; SCHRAMM, 2000). A partir disto, tem-se a equação de Newton para a viscosidade de um fluido:

Equação 3

$$\eta = \frac{\sigma}{\gamma}$$

Conforme a equação 3, quanto maior a viscosidade de um líquido, maior a tensão de cisalhamento necessária para produzir certa velocidade de cisalhamento.

1.4.1.1 Comportamentos reológicos

Os fluidos são divididos em duas categorias gerais: newtonianos e não-newtonianos. O fluxo newtoniano caracteriza-se por viscosidade constante, independentemente da velocidade de cisalhamento aplicada. O fluxo não newtoniano apresenta uma mudança na viscosidade com o aumento da taxa de cisalhamento. Estes valores de viscosidade são considerados como viscosidade aparente, definida como razão entre a tensão de cisalhamento medida a uma determinada taxa de cisalhamento (ANSEL; POPOVICH; ALLEN, 2000).

Nos sistemas não-newtonianos, a extensão das interações entre as partículas é a principal responsável pela complexidade do comportamento reológico das preparações. Desta forma, os fluxos podem assumir vários comportamentos, determinando diferentes tipos de reogramas, tais como: plástico; pseudoplástico ou dilatante.

Na figura 8 pode ser visualizado um reograma representando o comportamento de vários materiais.

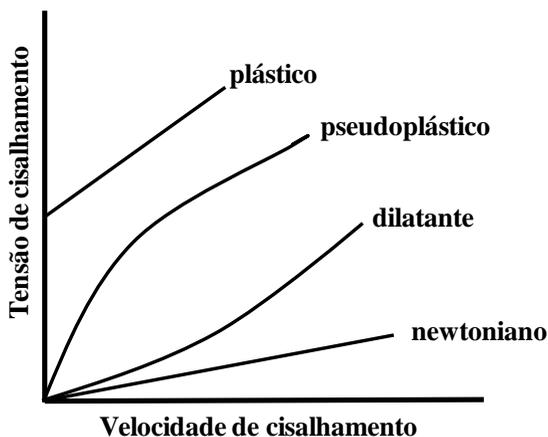


Figura 8. Reograma representando os comportamentos reológicos em função da velocidade de cisalhamento versus tensão de cisalhamento (adaptado de AULTON, 2005).

Os fluidos que necessitam de uma tensão finita, conhecida como tensão de escoamento, para que ocorra movimento das partículas são chamados fluidos plásticos. Para outros tipos de fluidos, os valores de viscosidade aumentam com o aumento da taxa de cisalhamento; neste caso, diz-se que o material possui um comportamento dilatante, como suspensões com alta percentagem de sólidos. Quando o contrário

acontece, ou seja, a viscosidade diminui com o aumento da taxa de cisalhamento, diz-se que o material possui comportamento pseudoplástico. Os materiais que exibem esse tipo de fluxo incluem dispersões aquosas de hidrocolóides naturais ou quimicamente modificados, como goma adraganto, metilcelulose e carmelose, além de polímeros sintéticos, como polivinilpirrolidona e ácido poliacrílico (AULTON, 2005; DULLAERT & MEWIS, 2005; GENNARO, 2000; LACHMAN; LIEBERMAN; KANIG, 2001).

Os fluidos não-newtonianos podem apresentar ou não tixotropia, em que a viscosidade diminui em função do tempo de deformação. Este fenômeno pode ser visualizado através da formação de um *loop* de histerese no reograma (GENNARO, 2000).

A determinação das propriedades reológicas de um sistema disperso é fundamental para o desenvolvimento tecnológico, pois as características reológicas podem influenciar a estabilidade física do sistema, a espalhabilidade, as características sensoriais e as finalidades de uso (BATHEJA et al., 2011).

Na literatura estão descritos vários trabalhos referentes a estudos reológicos de produtos farmacêuticos e cosméticos. De especial interesse são os estudos que investigam as propriedades de fluxo de sistemas nanoestruturados incorporados em bases semissólidas para aplicação tópica. Geralmente as formulações nanoestruturadas são incorporadas a veículos hidrofílicos e apresentam comportamento não-newtoniano, plástico ou pseudoplástico. Alves, Pohlmann e Guterres (2005) avaliaram a incorporação de diferentes nanocarreadores (nanocápsulas, nanoesferas e nanoemulsão) contendo nimesulida em géis de carbopol 940[®] e observaram comportamento não-newtoniano pseudoplástico. Por outro lado, Milão e colaboradores (2003) visualizaram um comportamento não-newtoniano plástico em amostras de gel de carbopol contendo nanocápsulas de diclofenaco.

1.5 FÁRMACOS – ÁCIDO GLICIRRÍZICO, ÁCIDO SALICÍLICO E CAFEÍNA

1.5.1 Ácido glicirrízico

O ácido glicirrízico ((3 β , 20 β)-20-carboxi-11-oxo-30-norlean-12-en-3-yl-2-*o*- β -17-glucopiranosidurônico- α -D-ácido glucopiranosidurônico; **AG**) é o principal componente ativo da raiz de Alcaçuz (*Glycyrrhiza uralensis*, Fisch) (CIRILLO et al., 2011). É um ácido fraco solúvel em água com três valores de pKa (pKa1 = 2,7; pKa2 = 2,8; pKa3 = 4,7)

(SHEN, et al., 2007; SUN et al., 2007). Possui massa molar de 822,92 g/mol e fórmula molecular $C_{42}H_{62}O_{16}$ (figura 9).

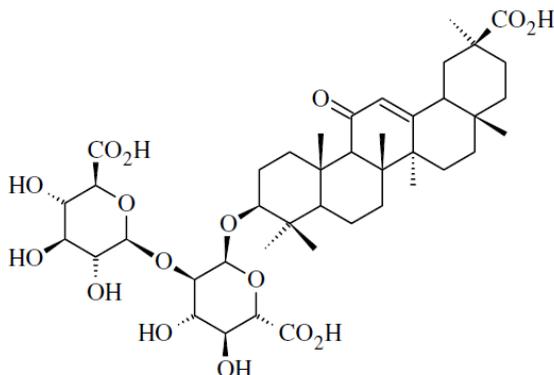


Figura 9. Estrutura química do ácido glicirrízico (ISBRUKER & BURDOCK, 2006).

Tradicionalmente o extrato de alcaçuz é utilizado para vários tratamentos dermatológicos e em produtos cosméticos (AFNAN et al., 2012). O extrato pode conter de 10 a 25 % de ácido glicirrízico. Por via oral, a dose clínica aceitável é de 0,015 – 0,229 mg/kg de peso corporal ao dia (ISBRUKER & BURDOCK, 2006; SCHWARZ & CSUK, 2010).

O AG é responsável pelas atividades imunomoduladora, antiúlcera, anti-inflamatória, antiepiléptica, hipocolesterêmica, hipoglicêmica, antialérgica, antitumoral, antiviral, anti-hipotensiva entre outras (ASL & HOSSEINZADEH 2008; BADAM et al., 1997; BALTINA et al., 2003; CHAN; CHAN; HO, 2003; CHERNG et al., 2006; CHUNG et al., 2000; CRANCE et al., 1994; ISBRUKER & BURDOCK, 2006; KHAN et al., 2005; LI et al., 2011; LIN et al., 2003; LIN et al., 2008; MATSUI et al., 2004; NAKAJIMA et al., 1996; ; NI et al. 2011; RAM et al., 2006; RAPHAEL & KUTTAN 2003; SHANMUGAM et al., 2012; SITOHY et al., 1991; YADAV et al., 2010; WOLKESTOFER et al., 2009). Também foi utilizado com sucesso na redução dos sintomas de dermatite atópica e dermatite de contato (DRAELOS, 2012).

O AG é utilizado como antioxidante natural contra dano celular causado por compostos químicos (TRIPATHI & SINGH, 2009). Estudos *in vivo* demonstram que o AG induz a morte celular programada, provavelmente inibindo a enzima do fígado 11-hidroxiesteróide desidrogenase tipo I (HORIGOME et al., 2001). Em

mitocôndrias de fígado de rato o AG induziu o fenômeno de transição de permeabilidade mitocondrial através de estresse oxidativo, sugerindo que é um desencadeador de apoptose mediada por mitocôndria (BATAGGLIA et al., 2008). Previne dano cerebral provocado por glutamato (CHERNG et al., 2006). Fortalece a integridade da membrana de eritrócitos contra dano oxidativo e proteolítico (FIORE et al., 2008). O efeito anti-inflamatório do AG foi comprovado em estudo realizado por Wang e colaboradores (2011). O AG age atenuando a geração excessiva de óxido nítrico e prostaglandina E₂, além de suprimir a expressão de genes pro-inflamatórios.

Tanto em estudos com ratos como em humanos apresentou baixa biodisponibilidade oral, pois é pouco absorvido no trato gastrointestinal (CANTELLI-FORTI et al., 1994; SUI et al., 2012; WANG et al., 1994; YAMAMURA et al., 1995). Para aumentar a solubilidade do fármaco, Cui, Cui, e Zhang (2008) desenvolveram comprimidos revestidos de AG e β -ciclodextrina para liberação colônica.

Alguns trabalhos sobre encapsulação do AG em nano e micropartículas destinadas para uso oral são descritos na literatura. Micropartículas contendo AG obtidas através de um processo de anti-solvente supercrítico exibiram um aumento da taxa de dissolução *in vitro* e maior biodisponibilidade *in vivo*, quando comparadas ao fármaco puro (SUI et al., 2012). Similarmente, Takahashi, Onishi e Machida (2004) observaram um aumento da concentração de AG no plasma e no fígado após administração de micropartículas de poli(DL-ácido lático-ácido glicólico). Nanopartículas de prata contendo AG administradas oralmente foram eficazes na proteção do DNA de ratos contra radiação gama (CHANDRASEKHARAN; KHANNA; NAIR, 2011). Wu e colaboradores (2005) alcançaram uma EE de 80 % de glicirrizinato de amônio, utilizando somente QUI e TPP. Zheng e colaboradores (2006) relataram a complexação entre AG e QUI através de gelificação iônica entre os grupos carboxila deprotonados do AG e os grupos amino protonados da QUI, resultando em valores de eficiência de encapsulação entre 55,5 e 88,1 %, com tamanho de partícula de 30 nm. Estes mesmos autores realizaram outro estudo com carboximetilquitosana ligada à galactose e observaram que aumentando a concentração de AG no sistema ocorreu um aumento na eficiência de encapsulação (ZHENG et al., 2011).

A administração de AG pela pele foi relatada em modelo de carcinogênese induzido por metilcolantereno. A aplicação tópica de 1,2 mg de AG reduziu significativamente o número de nódulos e a mortalidade (NOZAWA et al., 1967). Também apresentou efeito em

modelo de tumor em pele de rato induzido por 7,12-dimetilbenzantraceno e 12-*O*-tetradecanoilforbol-13-acetato (AGARWAL; WANG; MUKHTAR, 1991; ISBRUKER & BURDOCK, 2006; WANG & NIXON, 2001). Em células tumorais tem efeito apoptótico (SHWARZ & CSUK, 2010). Além da ação antitumoral, o AG foi utilizado como anti-inflamatório tópico em associação à hidrocortisona, atuando tanto na inibição da 11 β -hidroxiesteróide desidrogenase (TEELUCKSINGH et al., 1990) como exercendo uma fraca ação adrenocorticóide (CAPELLA & FINZI, 2003). Afnan e colaboradores (2012) analisaram o efeito do AG contra a ação da irradiação ultravioleta B (UVB) em fibroblastos da derme. O tratamento com AG inibiu significativamente o dano causado pelo UVB bloqueando a ativação de metaloproteinase, que é a responsável pela degradação da matriz extracelular e pode ocasionar câncer de pele. Koga e colaboradores (2011) desenvolveram uma nanoemulsão contendo AG para liberação prolongada via subcutânea. A liberação do AG ocorreu até 72 h após administração, sendo a nanoemulsão considerada uma formulação promissora no tratamento da hepatite crônica. Entretanto, a baixa estabilidade do fármaco e o fato de ser pouco solúvel em água influenciam negativamente seu perfil de absorção cutânea. Para modificar estas propriedades algumas estratégias foram propostas, como a síntese de derivados de AG (INOUE et al., 1989; PUGLIA et al., 2006; UM et al., 2003). Puglia e colaboradores (2006) obtiveram uma ação anti-inflamatória tópica prolongada com a síntese de ésteres de polioxietileno de AG. Em outro trabalho, Puglia e colaboradores (2010) desenvolveram nanoemulsões contendo ácido glicirrético que levaram a um aumento na permeabilidade transdérmica do fármaco *in vitro* e *in vivo*.

1.5.2 Ácido salicílico

O ácido salicílico (ácido 2-hidroxibenzóico; **AS**) é um beta-hidroxi ácido com valor de pK_a de 2,8 o que o torna um ácido fraco, solúvel em água, apresentando atividade anti-inflamatória e antimicrobiana (LEE & KIM, 2003; SHOU et al., 2009). Possui massa molar de 138,1 g/mol e fórmula molecular $C_7H_6O_3$ (figura 10) (F. BRAS. V, 2010).

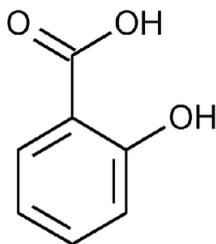


Figura 10. Estrutura química do ácido salicílico (F. BRAS. V, 2010).

É um composto que remove lipídios intercelulares que estão covalentemente ligados ao envoltório das células cornificadas no epitélio, causando uma desorganização do comedão (IMAYAMA; UEDA; ISODA, 2000; MILLS; ADLER; VERDICCHIO, 2007). Devido a esta ação comedolítica específica é utilizado em produtos tópicos para o tratamento de acne. Possui outras aplicações, como no tratamento de psoríase, rosácea, calos e verrugas (KRUNIC; CETNER; GRIMES, 2007; KESSLER et al., 2008). É muito utilizado para *peeling* facial em casos de melasma, pele áspera e oleosa e danos causados pelo sol (BENFELDT; SERUP; MENNE, 1999; FUNG et al., 2007; LEE & KIM 2003; ORESAJO; YATSKAYER; HANSENNE, 2008). De Benedittis e Lorenzetti (1996) e Balakrishnan e colaboradores (2001) investigaram a aplicação tópica de AS para o tratamento de herpes aguda e neuralgia pós-herpética. Estudo realizado por Oosterkamp e colaboradores (2006) mostrou que o AS pode reduzir a frequência de intervenção cirúrgica em pacientes com cilindromatose. Cilindromatose familiar é uma rara, autossômica predisposição genética onde tumores se desenvolvem nas glândulas sudoríparas apócrinas da pele. Entretanto, o estudo apresentou variações provavelmente devido a diferenças na penetração do fármaco na pele em função do tamanho do tumor. O AS possui penetração limitada na pele (RUBIN, 2006). De acordo com Benfeldt, Serup, Menne (1999), quanto maior for o dano causado na barreira da pele, maior é a penetração do AS aplicado topicamente, porém, a penetração irá diminuir conforme a capacidade de barreira do estrato córneo for recuperada durante o tratamento.

Alguns estudos relatados na literatura descrevem a incorporação de AS em sistemas nano/microparticulados. Boonsongrit, Mitrevej e Mueller (2006) encapsularam AS em nanopartículas de QUI reticuladas com TPP. Apesar de utilizar uma solução de QUI em pH 5,0, onde teoricamente o AS estaria 99 % na sua forma ionizada com cargas disponíveis para interação iônica, a eficiência de encapsulação foi de

apenas 23 %. Os autores sugerem que ocorreu somente uma encapsulação física. Ao diminuir o pH da QUI para 3,3, a eficiência de encapsulação aumentou para 77 %, devido a presença de maior densidade de cargas neste pH. Ji e colaboradores (2011) avaliaram razões de massa de QUI/TPP de 3:1 a 7:1 para obtenção de nanopartículas contendo AS. Os autores concluíram que com a diminuição da razão QUI/TPP ocorre uma maior eficiência de encapsulação, alcançando até 80 % com a razão 3:1. Zhang e colaboradores (2011) desenvolveram nanopartículas contendo AS utilizando um polissacarídeo bacteriano (*pachyman*) complexado com epicloridrina. A eficiência de encapsulação foi de 90 % e a liberação do AS foi controlada durante 12 h.

1.5.3 Cafeína

A cafeína (1,3,7-trimetilxantina; CF) é um estimulante do sistema nervoso central e diurético, sendo também aplicada externamente em formulações tópicas. É uma base fraca, solúvel em água, e apresenta pKa de 8,3 (BARBAS et al., 2000). Possui massa molar de 194,2 g/mol e fórmula molecular $C_8H_{10}N_4O_2$ (figura 11) (F. BRAS. V, 2010).

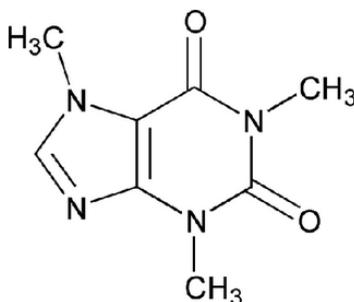


Figura 11. Estrutura química da cafeína (F. BRAS. V, 2010).

Nos últimos anos, muitos estudos apresentam uma variedade de aplicações farmacológicas da CF. Por exemplo, os efeitos da CF aplicada topicamente foram comparados ao aciclovir no tratamento de infecções causadas pelo vírus *herpes simplex*, mesmo em vírus resistentes ao aciclovir devido a mutações na timidina quinase (SHIRAKI & RAPP, 1988; YAMAMURA et al., 1996). A CF parece causar um efeito pró-apoptótico em células tratadas com raios UVB, oferecendo um efeito protetor contra o câncer de pele (CONEY et al., 2002; LU; LOU; LI, 2002; STANIFORTH; CHIU; YANG, 2006).

Devido a esta propriedade, a cafeína foi incorporada em partículas lipídicas para obtenção de um protetor solar com propriedades anti-envelhecimento (GARCÍA-GONZÁLEZ et al., 2009). Em revisão realizada por Chiu e Tsai (2011) foi verificado que a CF aplicada topicamente possui ação efetiva no tratamento de dermatite atópica. Ela atua como mediadora da inibição da fosfodiesterase com subsequente aumento dos níveis cíclicos de adenosina monofosfato (AM).

A CF já foi incorporada com sucesso em nanopartículas, micropartículas, lipossomas, microemulsões e formulações semissólidas para aplicação tópica (BOLZINGER et al., 2008; CHORILLI et al., 2007; CLEMENT; LAUGEL; MARTY, 2000; DI et al., 2011; DIAS et al., 1999; DOUCET et al., 1998; KATSIKOIANNI & AVGOUSTAKIS, 2006; PIRES DE CAMPOS et al., 2008; VARGAS & SOUZA, 2011).

Micropartículas de policaprolactona contendo cafeína foram detectadas por microscopia no estrato córneo e na derme de porco após 24 h da aplicação (BOURGEOIS et al., 2009). Bolzinger e colaboradores (2008) desenvolveram uma microemulsão de cafeína, que foi capaz de modificar a barreira da pele devido ao seu caráter anfifílico e aos surfactantes presentes, ocasionando uma maior permeação de fármaco. Por outro lado, nanopartículas obtidas através do método de emulsificação/difusão de solvente com alta eficiência de encapsulação (80%), demonstraram uma permeação insignificante, devido à barreira do estrato córneo (SANTANDER-ORTEGA et al., 2010).

Em formulações cosméticas a CF é utilizada como uma substância lipolítica. O seu sítio de ação são os adipócitos presentes na hipoderme (BERTIN et al., 2001; BOLZINGER et al., 2008). Ela age inibindo a fosfodiesterase, que é a enzima responsável pela quebra de AMPc no adipócito. A disponibilidade de AMPc ativa a proteinoquinase A e, consequentemente, a lipase hormônio sensível (LHS), induzindo à lipólise através da mobilização de ácidos graxos e glicerol (CHORILLI et al., 2001; HEXSEL; ORLANDI; PRADO, 2005; VELASCO et al., 2007).

Segundo Brandner e colaboradores (2006), a ação da CF sobre a fosfodiesterase também está relacionada com uma inibição do efeito de andrógenos (testosterona e seus metabólitos) na barreira epidérmica. A presença de andrógenos leva a quadros clínicos de alopecia (região temporal), estimula o crescimento de pelos (região genital), estimula as glândulas sebáceas (acne), entre outros. Neste caso o aumento nos níveis celulares de AMPc antagoniza o efeito dos andrógenos, que atuam inibindo a adenil ciclase e consequentemente reduzindo os níveis de

AMPc. No estudo em questão, a CF foi capaz de reduzir a perda de água transepidermica de voluntários masculinos devido a um aumento na barreira epidérmica.

2 REFERÊNCIAS

ABOU-SHOER, M. A Simple Colorimetric Method for the Evaluation of Chitosan. **American Journal of Analytical Chemistry**, v. 2, p. 91-94, 2010.

AELENEI, N.; POPA, M. I.; NOVAC, O.; LISA, G.; BALAITA, L. Tannic acid incorporation in chitosan-based microparticles and in vitro controlled release. **Journal of Material Science: Materia Medica**, v. 20, p.1095–1102, 2009.

AFNAN, Q.; ADIL, M.; NISSAR-UL, A.; RAFIQ, A. R.; AMIR, H. F.; KAISER, P.; GUPTA, V. K.; VISHWAKARMA, R.; TASDUQ, S. A. Glycyrrhizic acid (GA), a triterpenoid saponin glycoside alleviates ultraviolet-B irradiation-induced photoaging in human dermal fibroblasts. **Phytomedicine**, v. 19, p. 658– 664, 2012.

AGARWAL, R.; WANG, Z.; MUKHTAR, H. Inhibition of mouse skin tumor-initiating activity of DMBA by chronic oral feeding of glycyrrhizin in drinking water. **Nutrition and Cancer**, v. 15, p. 187 – 193, 1991.

AGNIHOTRI, S.A.; NADAGOUDA, N.; MALLIKARJUNA, M.; TEJRAJ, M.; AMINABHAVI, L. Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 100, p. 5 –28, 2004.

ALENCASTRE, J.B.; BENTLEY, M.V.; GARCIA, F.S.; MORAGAS, M.; VILADOT, J.; MARCHETTI, J.M. A study of the characteristics and in vitro permeation properties of CMC/chitosan microparticles as a skin delivery system for vitamin E. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 1, 2006.

ALVAREZ-ROMAN, R.; NAIK, A.; KALIA, Y. N.; GUY, R.H.; FESSI, H. Skin penetration and distribution of polymeric nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, v. 99, p. 53 – 62, 2004.

ALVES, M. P.; RAFFIN, R. P.; FAGAN, S. B. Rheological Behavior of Semisolid Formulations Containing Nanostructured Systems. Chapter 2. In: BECK, R.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. (eds.).

Nanocosmetics and Nanomedicines. New approaches for skin care. Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2011, 380 p.

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

ANAL, A. K. & STEVENS, W. F. Chitosan–alginate multilayer beads for controlled release of ampicillin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 290, p. 45–54, 2005.

ANSEL, H.C.; POPOVICH, N.G.; ALLEN, L.V. **Farmacotécnica: Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos.** 6 ed., São Paulo: Editorial Premier, 2000, p. 398-400.

ANTON, N., BENOIT, J.P., SAULNIER, P. Design and production of nanoparticles formulated from nanoemulsion templates - A review. **Journal of Controlled Release**, v. 128, p. 185–199, 2008.

ARAYACHUKEAT, S.; WANICHWECHARUNGRUANG, S. P.; TREE-UDOM, T. Retinyl acetate-loaded nanoparticles: Dermal penetration and release of the retinyl acetate. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 404, p. 281–288, 2011.

ASL, M. N.; HOSSEINZADEH, H. Review of pharmacological effects of Glycyrrhiza sp. and its bioactive compounds. **Phytotherapy Research**, v. 22, p. 709–724, 2008.

AULTON, M.E. **Delineamento de formas farmacêuticas.** 2 ed., São Paulo: Artmed, 2005. 677 p.

BADAM, L. In vitro antiviral activity of indigenous glycyrrhizin, licorice and glycyrrhizic acid on Japanese encephalitis virus. **Journal of Communicable Disease**, v. 29, n. 2, p. 91-99, 1997.

BAL, S. M.; SLÜTTER, B.; VAN RIET, E.; KRUIHOF, A. C.; DING, Z.; KERSTEN, G. F. A.; JISKOOT, W.; BOUWSTRA, J. A. Efficient induction of immune responses through vaccination with N-trimethyl chitosan containing antigen formulations. **Journal of Controlled Release**, v. 142, p. 374 – 383, 2010.

BALAKRISHNAN, S.; BHUSHAN, K.; BHARGAVA, V. K.; PANDHI, P. A. Randomized parallel trial of topical aspirin-moisturizer solution vs oral aspirin for acute herpetic neuralgia. **International Journal of Dermatology**, v. 40, p. 535-8, 2001.

BALDRICK, P. The safety of chitosan as a pharmaceutical excipient. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 56, p. 290–299, 2010.

BALTINA, L.A. Chemical modification of glycyrrhizic acid as a route to new bioactive compounds for medicine. **Current Medicinal Chemistry**, v. 10, p. 155–171, 2003.

BANERJEE, T.; MITRA, S.; SINGH, A. K.; SHARMA, R. K.; MAITRA, A. Preparation, characterization and biodistribution of ultrafine chitosan nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 243, p. 93, 2002.

BARBAS, C.; GARCIA, A.; SAAVEDRA, L.; CASTRO, M. Optimization and validation of a method for the determination of caffeine, 8-chlorotheophylline and diphenhydramine by isocratic high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 870, p. 97–103, 2000.

BARNES, H.Á.; HUTTON, J. F.; WALTERS, K. **An introduction to rheology**. 1 ed. New York: Elsevier, 1989, 199 p.

BATHEJA, P.; SHEIHET, L.; KOHN, J.; SINGER, A.; MICHNIAK-KOHN, B. Topical drug delivery by a polymeric nanosphere gel: Formulation optimization and in vitro and in vivo skin distribution studies. **Journal of Controlled Release**, v. 149, p. 159–167, 2011.

BATTAGLIA, V.; BRUNATI, A. M.; FIORE, C.; ROSSI, C.; SALVI, M.; TIBALDI, E.; PALERMO, M.; ARMANINI, D.; TONINELLO, A. Glycyrrhetic acid as inhibitor or amplifier of permeability transition in rat heart mitochondria. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1778, p. 313–323, 2008.

BENFELDT, E.; SERUP, J.; MENNE, T. Effect of barrier perturbation on cutaneous salicylic acid penetration in human skin: in vivo pharmacokinetics using microdialysis and non-invasive quantification of barrier function. **British Journal of Dermatology**, v. 140, p. 739–748, 1999.

BERGH, B.A.I.V.; SWARTZENDRUDER, D.C.; GEST, A.B.; HOOGSTRAATE, J.J.; SCHRIJVERS, A.H.G.J; BODDÉ, H.E.; JUNGINGER, H.E.; BOUESTRA, J.A. Development of an optimal protocol for ultrastructural examination of skin by transmission electron microscopy. **Journal of Microscopy**, v.187, p.125-133, 1997.

BERTIN, C.; ZUNINO, H.; PITTET, J. C.; BEAU, P.; PINEAU, P.; MASSONNEAU, M.; ROBERT, C.; HOPKINS, J. A double-blind evaluation of the activity of an anti-cellulite product containing retinol, caffeine and ruscogenine by a combination of several non-invasive methods. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 52, p. 199–210, 2001.

BETTONI, C.; FELIPPI, C.; DE ANDRADE, C.; RAFFIN, R.; JAGER, A.; GUTERRES, S. S.; COSTA, T. D. Isotretinoin-Loaded Nanocapsules: Stability and Cutaneous Penetration by Tape Stripping in Human and Pig Skin. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 8, n. 2, p. 258-271, 2012.

BHATTARAI, N.; GUNN, J.; ZHANG, M. Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 62, p. 83 –99, 2010.

BILATI, U.; ALLEMANN, E.; DOELKER E. Poly(D,Llactide-co-glycolide) protein-loaded nanoparticles prepared by the double emulsion method—processing and formulation issues for enhanced entrapment efficiency. **Journal of Microencapsulation**, v. 22, n. 2, p. 205–214. 2005.

BODDOHI, S. & KIPPER, M. J. Engineering Nanoassemblies of Polysaccharides. **Advanced Materials**, v. 22, p. 2998–3016, 2010.

BOLZINGER, M. A.; BRIANCON, S.; PELLETIER, J.; FESSI, H.; CHEVALIER, Y. Percutaneous release of caffeine from microemulsion, emulsion and gel dosage forms. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 68, p. 446-51, 2008.

BOLZINGER, M.; BRIANÇON, S.; PELLETIER, J.; CHEVALIER, Y. Penetration of drugs through skin, a complex rate-controlling membrane. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 17, p. 156– 165, 2012.

BOONSONGRIT, Y.; MITREVEJ, A.; MUELLER, B. Chitosan drug binding by ionic interaction. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 62, p. 267–274, 2006.

BORGES, O.; SILVA, M.; SOUSA, A.; BORCHARD, G.; JUNGINGER, H.; CORDEIRO-DA-SILVA, A. Alginate coated chitosan nanoparticles are an effective subcutaneous adjuvant for hepatitis B surface antigen. **International Immunopharmacology**, v. 8, p. 1773 – 1780, 2008.

BOURGEOIS, S.; BOLZINGER, M. A.; PELLETIER, J.; VALOUR, J. P.; BRIANCON, S. T. Caffeine microspheres—an attractive carrier for optimum skin penetration. **IFSCC Magazine**, v. 12, p. 359–363, 2009.

BOUWSTRA, J.A. HONEYWELL-NGUYEN, P.L. GOORIS, G. S. PONEC, M. Structure of the skin barrier and its modulation by vesicular formulations. **Progress in Lipid Research**, v.42, p.1-36, 2003.

BRANDNER J.M.; BEHNE M.J.; HUESING, B.; MOLL, I. Caffeine improves barrier function in male skin. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 28, p. 343–347, 2006.

BUCK, P. Skin barrier function: effect of age, race and inflammatory disease. **The International Journal of Aromatherapy**, v. 14, p. 70–76, 2004.

CAFAGGI, S.; RUSSO, E.; STEFANI, R.; LEARDI, R.; CAVIGLIOLI, G.; PARODI, B.; BIGNARDI, A.; DE TOTERO, B.; AIELLO, C.; VIALE, M. Preparation and evaluation of nanoparticles made of chitosan or N-trimethyl chitosan and a cisplatin–alginate complex. **Journal of Controlled Release**, v. 121, p. 110–123, 2007.

CAI, K.; ODE, M.; MURAKAMI, H. Influence of polyelectrolyte dispersants on the surface chemical properties of aluminum in aqueous suspension. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical Engineering Aspects**, v. 284–285, p. 458–463, 2006.

CALVO, P., REMUÑÁN-LÓPEZ, C., VILA-JATO, J.L., ALONSO, M.J. Development of positively charged colloidal drug carriers: Chitosan coated polyester nanocapsules and submicron-emulsions. **Colloidal Polymers Science**, v. 275, p. 46–53, 1997.

CANTELLI-FORTI, G.; MAFFEI, F.; HRELIA, P.; BUGAMELLI, F.; BERNARDI, M.; D'INTINO, P.; MARANESI, M.; RAGG, M.A. Interaction of licorice on glycyrrhizin pharmacokinetics. **Environmental Health Perspect**, v. 102, p. 65–68, 1994.

CAPELLA, G.L. & FINZI, A.F. Complementary therapy for psoriasis. **Dermatologic Therapy**, v. 16, p.164–74, 2003.

CARREIRA, A.S.; GONÇALVES, F.A.M.M.; MENDONÇA, P.V.; GIL, M.H.; COELHO, J.F.J. Temperature and pH responsive polymers based on chitosan: Applications and new graft copolymerization strategies based on living radical polymerization. **Carbohydrate Polymers**, v. 80, p. 618–630, 2010.

CHAN, H.; CHAN, C.; HO, J. Inhibition of glycyrrhizic acid on aflatoxin B1-induced cytotoxicity in hepatoma cells. **Toxicology**, v. 188, p. 211-217, 2003.

CHANDRASEKHARAN, D.; KHANNA, P.; KRISHNAN, C.; NAIR, K. Cellular radioprotecting potential of glycyrrhizic acid, silver nanoparticle and their complex. **Mutation Research**, v. 723, p. 51–57, 2011.

CHAVANPATIL, M.; KHDAIR, A.; PATIL, Y.; HANDA, H.; MAO, G.; PANYAM, J. Polymer-Surfactant Nanoparticles for Sustained Release of Water-Soluble Drugs. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 96, n. 12, 2007.

CHAWLA, V. & SARAF, S. Rheological studies on solid lipid nanoparticle based carbopol gels of aceclofenac. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 92, p. 293–298, 2012.

CHEN, A.; CHEN, M.; WANG, M.; HUANG, X.; LIU, Y.; CHEN, Z. Poly(L-histidine)-Chitosan/Alginate Complex Microcapsule as a Novel Drug Delivery Agent. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 1, p. 3728–3, 2011.

CHERNG, J., LIN, H.; HUNG, M.; LIN, Y.; CHAN, M.; LIN, J. Inhibition of nuclear factor κ B is associated with neuroprotective effects of glycyrrhizic acid on glutamate-induced excitotoxicity in primary neurons. **European Journal of Pharmacology**, v. 547, p. 10–21, 2006.

CHIENG, Y. Y.; CHEN, S. B. Complexation of cationic polyelectrolyte with anionic phospholipid vesicles: Concentration, molecular weight and salt effects. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 354, p. 226–233, 2011.

CHIU, H. & TSAI, W. Topical use of systemic drugs in dermatology: A comprehensive review. **Journal of American Academy of Dermatology**, v. 65, n. 5, p. 1-22, 2011.

CHORILLI, M.; RIMÉRIO, T.; OLIVEIRA, T.; SCARPA, M. V. Estudo da estabilidade de lipossomas unilamelares pequenos contendo cafeína por turbidimetria. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 88, n. 4, p. 194-199, 2007.

CHUNG J. G.; CHANG, H.L.; LIN, W.C.; WANG, H.H.; YEH, C.; HUNG, C.; LI, Y.C. Inhibition of N-Acetyltransferase Activity and DNA±2-Amino⁻uorene Adducts by Glycyrrhizic Acid in Human Colon Tumour Cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 38, p. 163-172, 2000.

CIRILLO, G.; CURCIO, M.; PARISI, O. I.; PUOCI, F.; IEMMA, F.; SPIZZIRRI, U.; RESTUCCIA, D.; PICCI, N. Molecularly imprinted polymers for the selective extraction of glycyrrhizic acid from liquorice roots. **Food Chemistry**, v. 125, p. 1058–1063, 2011.

CLEMENT, P.; LAUGEL, C.; MARTY, J. In vitro release of caffeine from concentrated W:O emulsions: effect of formulation parameters. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 207, p. 7–20, 2000.

COELHO, J.; FERREIRA, P.; ALVES, P.; CORDEIRO, R.; FONSECA, A. C.; GÓIS, J.; GIL, M. Drug delivery systems: Advanced technologies potentially applicable in personalized treatments. **EPMA Journal**, v. 1, p. 164–209, 2010.

CONEY, A.H.; LU, Y.P.; LOU, Y.R.; HUANG, M.T. Inibitory effects of tea and caffeine on UV-induced carcinogenesis: relationship to enhanced apoptosis and decreased tissue fat. **European Journal of Cancer Prevention**, v. 11, p. 28, 2002.

CONTI, B.; MODENA, T.; GENTA, I.; PERUGINI, P.; DECARRO, C.; PAVANETTO, F. Microencapsulation of cetylpyridinium chloride

with a bioadhesive polymer. **Proceedings of the International Symposium of Controlled Release Bioactive Materials**, v. 25, 822–823, 1998.

COUVRER, P.; BARRAT, G.; FATTAL, E.; LEGRAND, P.; VAUTHIER, C. Nanocapsule technology: a review. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 9, n.2, p. 99-134, 2002.

CRANCE, J.M.; LEVEQUE, F.; BIZIAGOS, E.; VAN CUYCK-GANDRE, H.; JOUAN, A.; DELOINCE, R. Studies on mechanism of action of glycyrrhizin against hepatitis A virus replication in vitro. **Antiviral Research**, v. 23, p. 63–76, 1994.

CUI, Q. H.; CUI, J. H.; ZHANG, J. J. Preparation of coated tablets of glycyrrhetic acid-HP-beta-cyclodextrin tablets for colon-specific release. **Zhongguo zhong yao za zhi**, v. 33, n. 20, p. 2339-43, 2008.

DAS, R.C.; KASOJU, N.; BORA, U. Encapsulation of curcumin in alginate-chitosan-pluronic composite nanoparticles for delivery to cancer cells. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 6, p. 153–160, 2010.

DASH, M.; CHIELLINI, F.; OTTENBRITE, R. M.; CHIELLINI, E. Chitosan—A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. **Progress in Polymer Science**, v. 36, p. 981–1014, 2011.

DAVIDENKO, N.; BLANCO, M.D.; PENICHE, C.; BECHERA N, L.; GUERRERO, S.; TEJON, J.M. Effects of Different Parameters on the Characteristics of Chitosan–Poly(acrylic acid) Nanoparticles Obtained by the Method of Coacervation. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 111, p. 2362–2371, 2009.

DE BENEDITTIS G. & LORENZETTI A. Topical aspirin/diethyl ether mixture versus indomethacin and diclofenac/diethyl ether mixtures for acute herpetic neuralgia and postherpetic neuralgia: a doubleblind crossover placebo-controlled study. **Pain**, v. 65, p. 45–51, 1996.

DELAIR, T. Colloidal polyelectrolyte complexes of chitosan and dextran sulfate towards versatile nanocarriers of bioactive molecules. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.78, p. 10-18, 2011.

DELGADO, A.V.; GONZALEZ-CABALLERO, E.; HUNTER, R.J.; KOOPAL, L.K.; LYKLEMA, J. Measurement and interpretation of electrokinetic phenomena (IUPAC technical report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 77, p. 1753–1805, 2005.

DI, H. W.; LUO, Y. L.; XU, F.; CHEN, Y. S.; NAN, Y. F. Fabrication and caffeine release from Fe₃O₄/P(MAA-co-NVP) magnetic microspheres with controllable core-shell architecture. **Journal of Biomaterials Science Polymer Edition**, v. 22, p. 557-76, 2011.

DIAS, M.; FARINHA, A.; FAUSTINO, C.; HADGRAFT, J.; PAIS, J.; TOSCANO, R. Topical delivery of caffeine from some commercial formulations. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 182, p. 41–47, 1999.

DOUCET, O.; FERRERO, N.; GARCIA, A.; ZASTROW, L. O/W emulsion and W/O/W multiple emulsion: physical characterization and skin pharmacokinetic comparison in the delivery process of caffeine. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 20, p. 283–295, 1998.

DRAELOS, Z. D. New treatments for restoring impaired epidermal barrier permeability: Skin barrier repair creams. **Clinics in Dermatology**, v. 30, p. 345–348, 2012.

DRAGAN, E. S.; MIHAI, M.; SCHWARZ, S. Polyelectrolyte complex dispersions with a high Colloidal stability controlled by the polyion structure and titrant addition rate. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical Engineering Aspects**, v. 290, p. 213–221, 2006.

DUCEL, V.; RICHARD, J.; SAULNIERA, P.; POPINEAUC, Y.; BOURY, F. Evidence and Characterization of Complex Coacervates Containing Plant Proteins: Application to the Microencapsulation of Oil Droplets. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 232, p. 239-247, 2006.

DUDHANI, A.R. & KOSARAJU, S.L. Bioadhesive chitosan nanoparticles: Preparation and characterization. **Carbohydrate Polymers**, v. 81, p. 243–251, 2010.

DULLAERT, K.; MEWISB, J. Thixotropy: Build-up and breakdown curves during flow. **Journal of Rheology**, v. 49, n. 6, p. 1213-1230, 2005.

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

ESKICIRAK, B.; ZEMHERI, E.; CERKEZOGLU, A. The treatment of psoriasis vulgaris: 1% topical methotrexate gel. **International Journal of Dermatology**, v. 45, p. 965-9, 2006.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 5 ed. São Paulo: Atheneu, 2010.

FIORE, C.; BORDIN, L.; PELLATI, D.; ARMANINI, D.; CLARI, G. Effect of glycyrrhetic acid on membrane band 3 in human erythrocytes. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 479, p. 46–51, 2008.

FÖRSTER, M.; BOLZINGER, M.; FESSI, H.; BRIANÇON, S. Topical delivery of cosmetics and drugs. Molecular aspects of percutaneous absorption and delivery. **European Journal of Dermatology**, v. 19, n. 4, p. 309-23, 2009.

FUNG, W.; ORAK, D.; RE, T.; HAUGHEY, D.B. Relative Bioavailability of Salicylic Acid Following Dermal Application of a 30% Salicylic Acid Skin Peel Preparation. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 97, n. 3, 2008.

GAN, Q. & WANG, T. Chitosan nanoparticle as protein delivery carrier—Systematic examination of fabrication conditions for efficient loading and release. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 59, p. 24–34, 2007.

GARCIA-FUENTES, M. & ALONSO, M. J. Chitosan-based drug nanocarriers: Where do we stand? **Journal of Controlled Release**, v. 161, n. 2, p. 496-504, 2012.

GARCÍA-GONZÁLEZ, C. A.; DA SOUSA, S.; ARGEMÍ, A.; PERIAGO, A.; SAURINA, J.; DUARTE, C. M.; DOMINGO, D.

Production of hybrid lipid-based particles loaded with inorganic nanoparticles and active compounds for prolonged topical release. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 382, p. 296–304, 2009.

GENNARO, A. R. **Rheology in Remington: the science and practice of pharmacy**, Schott, H. ed. Philadelphia, 2000.

GEORGE, M. & ABRAHAM, E. Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan — a review. **Journal of Controlled Release**, v. 114, p. 1–14, 2006.

GOYCOOLEA, F.M.; LOLLO, G.; REMUNAN-LOPEZ, C.; QUAGLIA, F.; ALONSO, M.J. Chitosan-Alginate Blended Nanoparticles as Carriers for the Transmucosal Delivery of Macromolecules. **Biomacromolecules**, v. 10, p. 1736–1743, 2009.

GUNGOR, N.; ALEMDAR A.; ATICI A.; ECE, O. The effect of SDS surfactant on the flow and zeta potential of bentonite suspensions. **Materials Letters**, v. 51, p. 250–254, 2001.

GUPTA, K. C. & JABRAIL, F.H. Effect of molecular weight and degree of deacetylation on controlled release of isoniazid from chitosan microspheres. **Polymers for Advanced Technologies**, v. 19, p. 432–441, 2008.

GUTERRES, S.S.; ALVES, M.P.; POHLMANN, A.R. Polymeric nanoparticles, nanospheres and nanocapsules for cutaneous applications. **Drug Target Insights**, v. 2, p. 147–157, 2007.

HAFNER, A.; LOVRIĆ, J.; PEPIĆ, I.; FILIPOVIĆ-GRČIĆ, J. J. Lecithin/chitosan nanoparticles for transdermal delivery of melatonin. **Journal of Microencapsulation**, v. 28, n. 8, p. 807-15, 2011.

HAJHEYDARI, Z.; AKBARI, J.; SAEEDI, M.; SHOKOOHI, L. Comparing the therapeutic effects of finasteride gel and tablet in treatment of the androgenetic alopecia. **Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology**, v. 75, p. 47-51, 2009.

HAMMAN, J. H. Chitosan Based Polyelectrolyte Complexes as Potential Carrier Materials in Drug Delivery Systems. **Marine Drugs**, v. 8, p. 1305-1322, 2010.

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

HARRIS, R.; LECUMBERRI, E.; MATEOS-APARICIO, I.; MENGIBAR, M.; HERAS, A. Chitosan nanoparticles and microspheres for the encapsulation of natural antioxidants extracted from *Ilex paraguariensis*. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, p. 803, 2011.

HARTIG, S. M.; GREENE, R. R.; DIKOV, M. M.; PROKOP, A.; DAVIDSON, J. M. Multifunctional Nanoparticulate Polyelectrolyte Complexes. **Pharmaceutical Research**, v. 24, n. 12, 2007.

HE, W.; GUO, X.; XIAO, L.; FENG, M. Study on the mechanisms of chitosan and its derivatives used as transdermal penetration enhancers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 382, p. 234–243, 2009.

HEXSEL, D.; ORLANDI, C.; PRADO, D.Z. Botanical extracts used in the treatment of cellulite. **Dermatologic Surgery**, v. 31, p. 866- 872, 2005.

HOAT, S. B & LEAHY, D. G. The organization of human epidermis: functional epidermal units and phi proportionality. **Human Epidermis Organization**, v. 121, n. 6, p. 1440-1446, 2003.

HORIGOME, H.; HOMMA, M.; HIRANO, T.; OKA, K. Glycyrrhetic acid induced apoptosis in murine splenocytes. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 24, p. 54–58, 2001.

HUANG, G.; SUN, Y.; XIAO, J.; YANG, J. Complex coacervation of soybean protein isolate and chitosan. **Food Chemistry**, v. 135, p. 534–539, 2012.

IMAYAMA, S.; UEDA, S.; ISODA, M. Histologic Changes in the Skin of Hairless Mice Following Peeling With Salicylic Acid. **Archives of Dermatology**, v. 136, p. 1390-1395, 2000.

INOUE, H.; MORI, T.; SHIBATA, S.; KOSHIHARA, Y. Modulation by glycyrrhetic acid derivatives of TPA-induced mouse ear edema. **Brazilian Journal of Pharmacology**, v. 96, p. 204–10, 1989.

ISBRUCKER, R.A. & BURDOCK, G.A. Risk and safety assessment on the consumption of Licorice root (*Glycyrrhiza* sp.), its extract and powder as a food ingredient, with emphasis on the pharmacology and toxicology of glycyrrhizin. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 46, p. 167–192, 2006.

JI, J.; HAO, H.; WU, D.; HUANG, R.; XU, Y. Preparation, characterization and *in vitro* release of chitosan nanoparticles loaded with gentamicin and salicylic acid. **Carbohydrate Polymers**, v. 85, n. 4, p. 803-808, 2011.

JUNGINGER, H.E. & VERHOEF, J.C. Macromolecules as safe penetration enhancers for hydrophilic drugs –a fiction? **Drug Discovery Today**, v. 1, n. 9, p. 370-376, 1998.

JUNYAPRASERT, V.; TEERANACHAIDEEKUL, V.; SOUTO, E.; BOONME, P.; MÜLLER, D. Q10-loaded NLC versus nanoemulsions: Stability, rheology and *in vitro* skin permeation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 377, p. 207–214, 2009.

KALOTI, M. & BOHIDAR, H.B. Kinetics of coacervation transition versus nanoparticle formation in chitosan–sodium tripolyphosphate solutions. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 81, n. 1, p.165-73, 2010.

KAPOOR, R.; PHISKE, M. M.; JERAJANI, H. R. Evaluation of safety and efficacy of topical prostaglandin E2 in treatment of vitiligo. **Brazilian Journal of Dermatology**, v. 3, p. 160:861, 2009.

KATSIKOGIANNI, G.; AVGOUSTAKIS, K. Poly(lactide-co-glycolide)-Methoxy-Poly(ethylene glycol) Nanoparticles: Drug Loading and Release Properties. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 6, n. 9-10, p. 3080-3086, 2006.

KATSINELOS, P.; KOUNTOURAS, J.; PAROUTOGLU, G.; BELTSIS, A.; CHATZI-MAVROUDIS, G.; ZAVOS, C. Aggressive treatment of acute anal fissure with 0.5% nifedipine ointment prevents its evolution to chronicity. **World Journal of Gastroenterology**, v. 12, p. 6203-6, 2006.

KEAN, T. & THANOU, M. Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 62, p. 3–11, 2010.

KESSLER, E.; FLANAGAN, K.; CHIA, C.; ROGERS, C.; GLASER, A. Comparison of a- and b-Hydroxy Acid Chemical Peels in the Treatment of Mild to Moderately Severe Facial Acne Vulgaris. **Dermatologic Surgery**, v. 34, p. 45–51, 2008.

KHALIL, S. K. H.; EL-FEKY, G. S.; EL-BANNA, S. T.; KHALIL, W. A. Preparation and evaluation of warfarin-cyclodextrin loaded chitosan nanoparticles for transdermal delivery. **Carbohydrate Polymers**, in press, 2012.

KHAN, M. T. K.; ATHER, A.; THOMPSON, K.; GAMBARI, R. Extracts and molecules from medicinal plants against herpes simplex viruses. **Antiviral Research**, v. 67, p. 107–119, 2005.

KIBBE, A. H. **Handbook of Pharmaceutical excipients**, London: Pharmaceutical Press, 2000, p. 87-89 e 252-254.

KOGA, K.; ISHIMON, Y.; ETA, H.; MATSUNO, K.; AKADA, K. Utility of Nano-Sized, Water-in-Oil Emulsion as a Sustained Release Formulation of Glycyrrhizin. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 34, p. 300–305, 2011.

KORTING, H. C. & SCHAFER-KORTING, M. Carriers in the Topical Treatment of Skin Disease. **Drug Delivery, Handbook of Experimental Pharmacology**, v. 197, p. 437-460, 2010.

KRAJEWSKA, B. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, p. 126–130, 2004.

KRUNIC A.; CETNER A.; GRIMES P. Salicylic acid peels - : our experience with dyschromia, photoaging and acne-related conditions. **Kosmetische Medizin**, v. 28, n.4, p. 173-175, 2007.

KULKAMP, I.C.; PAESE, K.; GUTERRES, S.S.; POHLMANN, A.R. Stabilization of lipoic acid by encapsulation in polymeric nanocapsules designed for cutaneous administration. **Quimica Nova**, v. 32, p. 2078–2084, 2009.

KULKARNI, A.R.; SOPPIMATH, K.S.; AMINABHAVI, T.M. Controlled release of diclofenac sodium from sodium alginate beads crosslinked with glutaraldehyde. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, v. 74, p. 29–36, 1999.

KUMAR, B.; SANDHU, K.; KAUR, I. Topical 0.25% methotrexate gel in a hydrogel base for palmoplantar psoriasis. **Journal of Dermatology**, v. 31, p. 798-801, 2004.

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

LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H. A.; KANIG, J. L. **Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica**. vol. 2. Lisboa: Fundação Calouste Gulbekian, 2001.

LAM, P.; LEE, K.; WONG, R.; CHENG, G.; CHENG, S.; YUEN, M.; LAM, K.; GAMBARI, R.; KOK, S.; CHUI, S. Development of hydrocortisone succinic acid/and 5-fluorouracil/chitosan microcapsules for oral and topical drug deliveries. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 22, n. 9, p. 3213-3218, 2012.

LARANJEIRA, M.C.M. & FÁVERE, V.T. Quitosana: biopolímero funcional com potencial industrial biomédico. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 672-678, 2009.

LAWRIE, G.; KEEN, I.; DREW, B.; CHANDLER-TEMPLE, A.; RINTOUL, L.; FREDERICKS, P.; GRØNDAHL, L. Interactions between Alginate and Chitosan Biopolymers Characterized Using FTIR and XPS. **Biomacromolecules**, v. 8, p. 2533-2541, 2007.

LEE, E. J.; KHAN, S. A.; KIM, Y. B.; LIM, K. H. Preparation of chitosan/carboxymethyl dextran nanoparticles by polyelectrolyte complexation. **Journal of Biotechnology**, v. 150, p. 450, 2010.

LEE, H. & KIM, I. Salicylic Acid Peels for the Treatment of Acne Vulgaris in Asian Patients. **Dermatologic Surgery**, v. 29, p. 1196–1199, 2003.

LEONG, K. W.; MAO, H. Q.; TRUONG-LE, V. L.; ROY, K.; WALSH, S.M. DNA-polycation nanospheres as non-viral gene delivery vehicles. **Journal of Controlled Release**, v. 53, p. 183, 1998.

LERTSUTTHIWONG, P.; ROJSITTHISAK, P.; NIMMANNIT, U. Preparation of turmeric oil-loaded chitosan-alginate biopolymeric nanocapsules. **Materials Science and Engineering C**, v. 29, p. 856–860, 2009.

LI, P.; DAI, Y.; ZHANG, J.; WANG, A.; WEI, Q. Chitosan–Alginate Nanoparticles as a Novel Drug Delivery System for Nifedipine. **International Journal of Biomedical Science**, v. 4, n. 3, 2008.

LI, X.; XIE, H.; LIN, J.; XIE, W.; MA, X. Characterization and biodegradation of chitosan–alginate polyelectrolyte complexes. **Polymer Degradation and Stability**, v. 94, p. 1–6, 2009.

LI, X.; ZHOU, A.; LI, X.; ZHANG, Y.; CHEN, W. Antioxidant Status and Immune Activity of Glycyrrhizin in Allergic Rhinitis Mice. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, p. 905-91, 2011.

LIN, J.C. Mechanism of action of glycyrrhizic acid in inhibition of Epstein-Barr virus replication in vitro. **Antiviral Research**, v. 59, p. 41–47, 2003.

LIN, J.C.; CHERNG, J.; HUNGA, M.; BALTINA, L.; KONDRATENKO, R. Inhibitory effects of some derivatives of glycyrrhizic acid against Epstein-Barr virus infection: Structure–activity relationships. **Antiviral Research**, v. 79, p. 6–11, 2008.

LIRA, A. A.; ROSSETTI, F. C.; NANCLARES, D. M.; NETO, A. F.; BENTLEY, M. V.; MARCHETTI, J. M. Preparation and characterization of chitosan-treated alginate microparticles incorporating all-trans retinoic acid. **Journal of Microencapsulation**, v. 26, p. 243–50, 2009.

LIU, B. S. & HUANG, T. B. Nanocomposites of Genipin-Crosslinked Chitosan/Silver Nanoparticles - Structural Reinforcement and Antimicrobial Properties. **Macromolecular Bioscience**, v. 8, p. 932, 2008.

LIU, W.; HU, M.; LIU, W.; XUE, C.; XU, H.; YANG, X. Investigation of the carbopol gel of solid lipid nanoparticles for the transdermal iontophoretic delivery of triamcinolone acetonide acetate. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 364, p. 135–141, 2008.

LU, Y.P.; LOU, Y.R.; LI, X.H. Stimulatory effect of topical application of caffeine on UVB-induced apoptosis in mouse skin. **Oncology Research**, v. 13, p. 61–70, 2002.

LUENGO, J.; WEISS, B.; SCHNEIDER, M.; EHLERS, A.; STRACKE, F.; KÖNIG, K.; KOSTKA, K.H.; LEHR, C.M; SCHAEFER, U.F. Influence of nanoencapsulation on human skin transport of flufenamic acid. **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 19, p. 190–7, 2006.

LV, H.; ZHANG, Z.; WANG, X.; CHENG, Q.; WANG, W.; HUANG, X.; ZHOU, J.; ZHANG, Q.; HOU, L.; HUO, W. A Biomimetic Chitosan Derivates: Preparation, Characterization and Transdermal Enhancement Studies of N-Arginine Chitosan. **Molecules**, v. 16, p. 6778-6790, 2011.

MAGENHEIM, B. & BENITA, S. Nanoparticle characterization: a comprehensive physicochemical approach. **STP Pharma Sciences**, v. 1, p. 221–241, 1991.

MARCHIORI, M. L.; LUBINI, G.; DALLA NORA, G.; FRIEDRICH, R. B.; FONTANA, M. C.; OURIQUE, A. F.; BASTOS, M. O.; RIGO, L. A.; SILVA, C. B.; TEDESCO, S. B.; BECK, R. C. R. Hydrogel containing dexamethasone-loaded nanocapsules for cutaneous administration: preparation, characterization, and in vitro drug release study. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 36, n. 8, p. 962-971, 2010.

MARTINS, G.V.; MANO, J.F.; ALVES, N.M. Nanostructured self-assembled films containing chitosan fabricated at neutral pH. **Carbohydrate Polymers**, v. 80, p. 570–573, 2010.

MATSUI, S.; MATSUMOTO, H.; SONODA, Y.; ANDO, K.; AIZU-YOKOTA, E.; SATO, T.; KASAHARA, T. Glycyrrhizin and related compounds down-regulate production of inflammatory chemokines IL-8 and eotaxin 1 in a human lung fibroblast cell line. **International Immunopharmacology**, v. 4, p. 1633 – 1644, 2004.

MENON, G.K. New insights into skin structure: scratching the surface. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, p. 3-17, 2002.

MI, F.; SHYU, S.; KUAN, C.; LEE, S.; LU, K.; JANG, S. Chitosan-Polyelectrolyte Complexation for the Preparation of Gel Beads and Controlled Release of Anticancer Drug. I. Effect of Phosphorous Polyelectrolyte Complex and Enzymatic Hydrolysis of Polymer. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 74, p. 1868–1879, 1999.

MIHRANYAN, A.; FERRAZ, N.; STRØMME, M. Current status and future prospects of nanotechnology in cosmetics. **Progress in Materials Science**, v. 57, n. 5, p. 875-910, 1012.

MILÃO, D.; KNORST, M. T.; RICHTER, W.; GUTERRES, S. S. Hydrophilic gel containing nanocapsules of diclofenac: development, stability study and physico-chemical characterization. **Pharmazie**, v. 58, p. 325-9, 2003.

MILLS, O.; ADLER, D.; VERDICCHIO, R. Pharmacology of salicylic acid (SA) in acne vulgaris. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 56, n. 2, 2007.

MIYAZAKI, S.; TAKAHASHI, A.; KUBO, W.; BACHYNSKY, J.; LÖBENBERG, R. Poly n-butylcyanoacrylate (PNBCA) nanocapsules as a carrier for NSAIDs: in vitro release and in vivo skin penetration. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science**, v. 6, n. 2, p. 238-245, 2003.

MODDARESI, M.; BROWN, M. B.; ZHAO, Y.; TAMBURIC, S.; JONES, S. A. The role of vehicle-nanoparticle interactions in topical drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 400, p. 176-82, 2010.

MONTEIRO-RIVIERE, N.A. Structure and function of skin. In: RIVIERI, J.E. (ed.) **Dermal absorption models in toxicology and pharmacology**. New York: CRC, 2006, p.1-19.

MONTENEGRO, L.; SINICO, C.; CASTANGIA, I.; CARBONE, C.; PUGLISI, G. Idebnone-loaded solid lipid nanoparticles for drug delivery to the skin: In vitro evaluation.

International Journal of Pharmaceutics, v. 434, p. 169-174, 2012.

MORAES, C.M.; DE MATOS, A.P.; DE PAULA, E.; ROSA, A.H.; FRACETO, L.F. Benzocaine loaded biodegradable poly-(d,l-lactide-co-glycolide) nanocapsules: factorial design and characterization. **Material Science Engineer B Solid-State Mater Advanced Technology**, v. 165, p. 243–246, 2009.

MOSER, K.; KRIWET, K.; NAIK, A.; KALIA, Y. N.; GUY, R. H. Passive skin penetration enhancement and its quantification in vitro. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 52, p. 102-112, 2001.

MOURYA, V.K. & INAMDAR, N.N. Chitosan-modifications and applications: Opportunities galore. **Reactive & Functional Polymers**, v. 68, p. 1013–1051, 2008.

MUHAMMAD, F. & RIVIERE, J.E. In vivo models. In: RIVIERE, J.E. (ed.). **Dermal absorption models in toxicology and pharmacology**. New York: CRC, 2006, p. 49-60.

MUKHOPADHYAY, P.; MISHRA, R.; RANA, D.; KUNDU, P. Strategies for effective oral insulin delivery with modified chitosan nanoparticles: A review. **Progress in Polymer Science**, In Press, 2012.

NAGPAL, K.; SINGH, S.K.; MISHRA, D.N. Chitosan Nanoparticles: A Promising System in Novel Drug Delivery. **Chemical Pharmacy Bulletin**, v. 58, n. 11, p. 1423—1430, 2010.

NAKAJIMA, N.; UTSUNOMIYA, T.; KOBAYASHI, M.; HERNDON, D.N.; POLLARD, R.B.; SUZUKI, F. In vitro induction of anti-type 2 T cells by glycyrrhizin. **Burns**, v. 22, n. 8, p. 612-617, 1996.

NETZ, P.A.; ORTEGA, G.G. **Fundamentos de físico-química: Uma abordagem conceitual para as Ciências Farmacêuticas**. São Paulo: Artmed, 2002.

NI, Y.F.; KUAI, J.K.; LU, Z.F.; YANG, G.D.; FU, H.Y.; WANG, J.; TIAN, F.; YAN, X.L.; ZHAO, Y.C.; WANG, Y.J.; JIANG, T. Glycyrrhizin treatment is associated with attenuation of lipopolysaccharide-induced acute lung injury by inhibiting

cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression. **Journal of Surgical Research**, v. 165, p. 29–35, 2011.

NOZAWA, J. Inhibitory effect of glycyrrhizin on experimental skin carcinogenesis in mice. **Japanese Journal of Dermatology: Series B**, v. 77, p. 415, 1967.

OCAK, B. Complex coacervation of collagen hydrolysate extracted from leather solid wastes and chitosan for controlled release of lavender oil. **Journal of Environmental Management**, v. 100, p. 22–28, 2012.

OOSTERKAMP, H.M.H.; NEERING, S.M.B.; NIJMAN, A.M.G.; DIRAC, W.J.; MOOI, R.; BERNARDS, S. An evaluation of the efficacy of topical application of salicylic acid for the treatment of familial cylindromatosis. **British Journal of Dermatology**, v. 155, p.182–185, 2006.

ORESALO, C.; YATSKAYER, M.; HANSENNE, I. Clinical tolerance and efficacy of capryloyl salicylic acid peel compared to a glycolic acid peel in subjects with fine lines/wrinkles and hyperpigmented skin. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 7, p. 259–262, 2008.

ÖZBAŞ-TURAN, S.; AKBUĞA, J. Plasmid DNA-loaded chitosan/TPP nanoparticles for topical gene delivery. **Drug delivery**, v. 18, n. 3, p. 215–222, 2011.

PARDEIKE, J.; SCHMIDT, C.; VOLZ, I.; MÜLLER, R.H. Nanostructured lipid carriers as delivery system for the phospholipase A₂ inhibitors PX-18 and PX-13 for dermal application. **Die Pharmazie - An International Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 66, n. 5, p. 357–361, 2011.

PARSAD, D.; PANDHI, R.; DOGRA, S.; KUMAR, B. Topical prostaglandin analog (PGE₂) in vitiligo: a preliminary study. **International Journal of Dermatology**, v. 5, p. 41–942, 2002.

PATZELT, A.; ANTONIOU, C.; STERRY, W.; LADEMANN, J. Skin penetration from the inside to the outside: a review. **Drug Discovery Today: Disease Mechanisms**, v. 5, p. 229, 2008.

PERROTTI, P.; BOVE, A.; ANTROPOLI, C.; MOLINO, D.; ANTROPOLI, M.; BALZANO, A. Topical nifedipine with lidocaine ointment vs active control for treatment of chronic anal fissure: results of a prospective, randomized, double-blind study. **Diseases of Colon & Rectum**, v. 45, p. 1468-75, 2002.

PERUGINI, P.; GENTA, I.; PAVANETTO, F.; CONTI, F.; SCALIA, S.; BARUFFINI, A. Study on glycolic acid delivery by liposomes and microspheres. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 196, p. 51 – 61, 2000.

PILLAI, C.K.S.; PAUL, W.; SHARMA, C.P. Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. **Progress in Polymer Science**, v. 34, p. 641–678, 2009.

PINTO REIS, C.; NEUFELD, R. J.; RIBEIRO, A.; VEIGA, F. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 2, p. 2 – 8, 2006.

PIRES-DE-CAMPOS, M.S.M.; LEONARDI, G.R.; CHORILLI, M.; SPADARI-BRATFISCH, R.S.; POLACOW, M.L.; GRASSI-KASSISSE, D.M. The effect of topical caffeine on the morphology of swine hypodermis as measured by ultrasound. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 7, P. 232–237, 2008.

PLAPIED, L.; DUHEM, N.; RIEUX, A.; PRÉAT, V. Fate of polymeric nanocarriers for oral drug delivery. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 16, p. 228–237, 2011.

POLETTI, F. S.; BECK, R. C. R.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R. Polymeric Nanocapsules: Concepts and Applications. Chapter 3. In: BECK, R.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. (eds.). **Nanocosmetics and Nanomedicines. New approaches for skin care**. Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2011, 380 p.

POPLE, P. V.; SINGH, K. K. Development and evaluation of topical formulation containing solid lipid nanoparticles of vitamin A. **AAPS PharmSciTech**, v. 7, p. 91, 2006.

POPLE, P & SINGH, K. Targeting tacrolimus to deeper layers of skin with improved safety for treatment of atopic dermatitis. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 398, p. 165–178, 2010.

PRASHANTH, K.V. & THARANATHAN, R.N. Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potential: an overview. **Trends in Food Science & Technology**, v. 18, p. 117-131, 2007.

PROST-SQUARCIONI, C. Histology of skin and hair follicle. **Medical Science**, v. 22, n.2, p. 131-137, 2006.

PROW, T. W.; GRICE, J. E.; LIN, L. L.; FAYE, R.; BUTLER, M.; BECKER, W.; WURM, E.; YOONG, C.; ROBERTSON, T.; SOYER, P.; ROBERTS, M. Nanoparticles and microparticles for skin drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, p. 470–491, 2011.

PUGLIA, C.; OSTACOLO, C.; SACCHI, A.; LANERI, S.; BONINA, F. In-vitro and in-vivo evaluation of oligoethylene esters as dermal prodrugs of 18beta-glycyrrhetic acid. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 58, p. 311–9, 2006.

PUGLIA, C.; RIZZA, L.; DRECHSLER, M.; BONINA, F. Nanoemulsions as vehicles for topical administration of glycyrrhetic acid: Characterization and in vitro and in vivo evaluation. **Drug Delivery**, v. 17, n. 3, p. 123–129, 2010.

RADEVA. T. **Physycal Chemistry of Polyelectrolites**. Sufactant Science Series, v. 99. Marcel Dekker, Inc., New York, 2001, 882p.

RAM, A.; MABALIRAJAN, U.; DAS, M.; BHATTACHARYA, I.; DINDA, A.K.; GANGAL, S.; GHOSH, B. Glycyrrhizin alleviates experimental allergic asthma in mice. **International Immunopharmacology**, v. 6, p. 1468–1477, 2006.

RAPHAEL, T.J.; KUTTAN, G. Effect of naturally occurring triterpenoids glycyrrhizic acid, ursolic acid, oleanolic acid and nomilin on the immune system. **Phytomedicine**, v. 10, p. 483–489, 2003.

RIBEIRO, C. **Cosmetologia aplicada à dermocosmética**, 1 ed. São Paulo: Pharmabooks, p. 77-115, 2006.

RIDOLFI, D. M.; MARCATO, P. D.; JUSTO, G. Z.; CORDI, L.; MACHADO, D.; DURÁN, N. Chitosan-solid lipid nanoparticles as carriers for topical delivery of tretinoin. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 93, p. 36–40, 2012.

RUBIN, M. **Chemical Peels**. v. 1. Elsevier Health Sciences, 2006, 190p.

RUSU, V. M.; NG, C.; WILKE, M.; TIERSCH, B.; FRATZL, P.; PETER, M.G. Size-controlled hydroxyapatite nanoparticles as self-organized organic–inorganic composite materials. **Biomaterials**, v. 26, p. 5414, 2005.

SAETHER, H.V.; HOLME, H.K.; MAURSTAD, G.; SMIDSRØD, O.; BJØRN, T.; STOKKE, H. Polyelectrolyte complex formation using alginate and chitosan. **Carbohydrate Polymers**, v. 74, p. 813–821, 2008.

SAHOO, S.K.; MA, W.; LABHASETWAR V. Efficacy of transferrin-conjugated paclitaxel-loaded nanoparticles in a murine model of prostate cancer. **International Journal of Cancer**, v. 112, n. 2, p. 335–340, 2004.

SANKALIA, M.G.; MASHRU, R.C.; SANKALIA, J.M.; SUTARIYA, V.B. Reversed chitosan–alginate polyelectrolyte complex for stability improvement of alpha-amylase: Optimization and physicochemical characterization. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 65, p. 215–232, 2007.

SANTANDER-ORTEGA, M.J.; LOZANO-LÓPEZ, M.V.; BASTOS-GONZÁLEZ, D.; PEULA-GARCÍA, J.M.; ORTEGA-VINUESA, J.L. Novel core-shell lipid-chitosan and lipid-poloxamer nanocapsules: stability by hydration forces. **Colloid & Polymer Science**, v. 288, p. 159–172, 2010.

SARMENTO, B.; FERREIRA, D.; VEIGA, B.; RIBEIRO, A. Characterization of insulin-loaded alginate nanoparticles produced by ionotropic pre-gelation through DSC and FTIR studies. **Carbohydrate Polymers**, v. 66, p. 1–7, 2006.

SATO, M. O.; GOMARA, F.; PONTAROLO, R.; ANDREAZZA, I. F.; ZARONI, M. Permeação cutânea in vitro do ácido kójico. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 2, p. 195-203, 2007.

SCHAFFER-KORTING, M.; MEHNERT, W.; KORTING, H.C. Lipid nanoparticles for improved topical application of drugs for skin diseases. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, p. 427-443, 2007.

SCHIPPER, N.G.M.; OLSSON, S.; HOOGSTRAATE, J.A.; DEBOER, A.G.; VARUM, K.M.; ARTURSSON, P. Chitosans as absorption enhancers for poorly absorbable drugs: 2. Mechanism of absorption enhancement. **Pharmaceutical Research**, v. 14, p. 923-929, 1997.

SCHMID-WENDTNER, M.H.; KORTING, H.C. **pH and Skin Care**. ABW Wissenschaftsverlag GmbH, Berlin, 2007.

SCHRAMM, G. A. **Practical approach to rheology and rheometry**. 2 ed. Gebrueder HAAKE GmbH, Germany, 2000.

SCHWARZ, S. & CSUK, R. Synthesis and antitumour activity of glycyrrhetic acid derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 18, p. 7458-7474, 2010.

SENYIGIT, S.; SONVICO, F.; BARBIERI, S.; OZER, O.; SANTI, P.; COLOMBO, P. Lecithin-Chitosan Nanoparticles of Clobetasol-17-Propionate Capable of Accumulation in Pig Skin. **Journal of Controlled Release**, v. 142, n. 3, p. 368-373, 2010.

SHANMUGAM, M.; NGUYEN, A.; KUMAR, A.; TAN, B.; SETHI, G. Targeted inhibition of tumor proliferation, survival, and metastasis by pentacyclic triterpenoids: Potential role in prevention and therapy of cancer. **Cancer Letters**, in press, 2012.

SHEN, S.; CHANGA, Z.; LIUA, J.; SUNA, X.; HUA, X.; LIU, H. Separation of glycyrrhizic acid and liquiritin from *Glycyrrhiza uralensis* Fisch extract by three-liquid-phase extraction systems. **Separation and Purification Technology**, v. 53, p. 216-223, 2007.

SHIM, J.; KANG, H.S.; PARK, W.; HAN, S.; KIM, J.; CHANG, I. Transdermal delivery of minoxidil with block copolymer nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, v. 97, p. 477-484, 2004.

SHIN, J. B.; SHIN, K.; LEE, H.; SUH, K.; KIM, H.; KIM, J. Enhance d transdermal delivery by using electrostatically interactive chitosan nanocapsules. **Colloid & Polymer Science**, v. 29, p. 553-559, 2012.

SHIN, J.; SHIN, K.; LEE, H.; NAM, J.B.; JUNG, J.E.; RYU, J.H.; HAN, J.H.; SUH, K.D.; KIM, Y.J.; SHIM, J.; KIM, J.; HAN, S.H.; CHAR, K.; KIM, Y.K.; CHUNG, J.H.; LEE, M.J.; KANG, B.C.; KIM, J.W. Non-invasive transdermal delivery route using electrostatically interactive biocompatible nanocapsules. **Advanced Materials**, v. 22, p. 739–743, 2010.

SHIRAKI, K. & RAPP, F. Effects of caffeine on herpes simplex virus. **Intervirolgy**, v. 29, p. 235–240, 1988.

SHOU, M.; GALINADA, W.; WEI, Y.; TANG, Q.; MARKOVICH, R.J.; RUSTUM, A.M. Development and validation of a stability-indicating HPLC method for simultaneous determination of salicylic acid, betamethasone dipropionate and their related compounds in Diprosalic Lotion®. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 50, p. 356–361, 2009.

SHU, S.J.; SUN, L.; ZHANG, X. Z.; WU, Z. M.; WANG, Z.; LI, C. X. Polysaccharides-based polyelectrolyte nanoparticles as protein drugs delivery system. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 13, p. 3657, 2011.

SHU, X.Z. & ZHU, K.J. A novel approach to prepare tripolyphosphate: chitosan complex beads for controlled release drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 201, p. 51–58, 2000.

SHU, X.Z. & ZHU, K.J. Controlled drug release properties of ionically cross-linked chitosan beads: the influence of anion structure. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 233, p. 217–225, 2002.

SILVA, A. C.; SANTOS, D.; FERREIRA, D. C.; SOUTO, E. B. Minoxidil-loaded nanostructured lipid carriers (NLC): characterization and rheological behaviour of topical formulations. **Die Pharmazie - An International Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 64, n. 3, p. 177-182, 2009.

SILVA, C.; PEREIRA, J.; RAMALHO, A.; PAIS, A.; SOUSA, J.J. Films based on chitosan polyelectrolyte complexes for skin drug delivery: Development and characterization. **Journal of Membrane Science**, v. 320, p. 268–279, 2008.

SIMSEK-EGE, F.A.; BOND, G.M.; STRINGER, J. Polyelectrolyte Complex Formation Between Alginate and Chitosan as a Function of pH. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 88, p. 346–351, 2003.

SINHA, V.R.; SING, A.K.; WADHAWAN, S.; KAUSHIK, R.; KUMRIA, K.; BANSAL, S.; DHAWAN, B. Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 274, p. 1–33, 2004.

SIQUEIRA, N. M.; CONTRI, R. V.; PAESE, K.; BECK, R. C. R.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Innovative Sunscreen Formulation Based on Benzophenone-3-Loaded Chitosan-Coated Polymeric Nanocapsules. **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 24, p. 166-174, 2011.

SITOHY, M.Z.; EL-MASSRY, R.A.; EL-SAADANY, S.S.; LABIB, S.M. Metabolic effect of licorice roots (*Glycyrrhiza glabra*) on lipid distribution pattern, liver and renal functions of albino rats. **Nahrung**, v. 35, p. 799–806, 1991.

SMITH, J.; WOOD, E.; DORNISH, M. Effect of Chitosan on Epithelial Cell Tight Junctions. **Pharmaceutical Research**, v. 21, n. 1, 2004.

SOPPIMATH, K. S.; AMINABHAVI, T. M.; KULKARNI, A. R.; RUDZINSKI, W. E. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **Journal of Controlled Release**, v. 70, p.1-20, 2001.

SOUTO, E. B.; WISSING, S. A.; BARBOSA, B.; MULLER, R. H. Evaluation of the physical stability of SLN and NLC before and after incorporation into hydrogel formulations. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 58, p. 83–90, 2004.

STANIFORTH, V.; CHIU, L.T.; YANG, N.S. Caffeic acid suppresses UVB radiation-induced expression of interleukin-10 and activation of mitogen-activated protein kinases in mouse. **Carcinogenesis**, v. 27, p. 1803–1811, 2006.

SUHONEN, T. M.; BOWSTRA, J. A.; URTTI, A. Chemical enhancement of percutaneous absorption in relation to stratum corneum structural alternations. **Journal of Controlled Release**, v. 59, p. 149-161, 1999.

SUI, X.; WEI, W.; YANG, L.; ZU, Y.; ZHAO, C.; ZHANG, L.; YANG, F.; ZHANG, Z. Preparation, characterization and in vivo assessment of the bioavailability of glycyrrhizic acid microparticles by supercritical anti-solvent process. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 423, p. 471–479, 2012.

SUN, C.; XIE, Y.; TIAN, Q.; LIU, H. Separation of glycyrrhizic acid and liquiritin from licorice root by aqueous nonionic surfactant mediated extraction. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical Engineer Aspects**, v. 305, p. 42–47, 2007.

SUTTON, L.; SWINEHART, J. M.; CATO, A.; KAPLAN, A. S. A clinical study to determine the efficacy and safety of 1% methotrexate/Azone (MAZ) gel applied topically once daily in patients with psoriasis vulgaris. **International Journal of Dermatology**, v. 40, p. 464-7, 2001.

TAKAHASHI, H.; ONISHI, H.; MACHIDA, Y. Glycyrrhetic acid-loaded microparticles: liver-specific delivery and therapeutic potential against carbon tetrachloride-induced hepatitis. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 56, n. 4, p. 437-44, 2004.

TAN, Q.; LIU, W.; GUO, C.; ZHAI, G. Preparation and evaluation of quercetin-loaded lecithin-chitosan nanoparticles for topical delivery. **International Journal of Nanomedicine**, v. 6, p. 1621–1630, 2011.

TAVARES, I. S.; CARONI, C.; DANTAS NETO, A.; PEREIRA, M. R.; FONSECA, J. Surface charging and dimensions of chitosan coacervated nanoparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 90, p. 254 – 258, 2012.

TEELUCKSINGH, S.; MACKIE, A.D.; BURT, D.; MCINTYRE, M.A.; BRETT, L.; EDWARDS, C.R. Potentiation of hydrocortisone activity in skin by glycyrrhetic acid. **The Lancet**, v. 335, p. 1060–3, 1990.

TERROSO, T.; KÜLKAMP, I.; JORNADA, D.; POHLMANN, A.; GUTERRES, S. S. Development of Semi-Solid Cosmetic Formulations Containing Coenzyme Q10-Loaded Nanocapsules. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 28, p. 819-26, 2009.

THONG, H.Y.; ZHAI, H.; MAIBACH, H.I. Percutaneous penetration enhancers: an overview. **Skin Pharmacology and Physiology**, v.20, p. 272-282, 2007.

TIWARI, S. B.; KUMAR, B. C.; UDUPA, N.; BALACHANDRAN, C. Topical methotrexate delivered by iontophoresis in the treatment of recalcitrant psoriasis: a case report. **International Journal of Dermatology**, v. 42, p. 157-9, 2003.

TIYABOONCHAI, W. & LIMPEANCHOB, N. Formulation and characterization of amphotericin B-chitosan-dextran sulfate nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 329, p. 142-149, 2007.

TOLSTOGUZOV, V. Why are polysaccharides necessary? **Food Hydrocolloids**, v. 18, p. 873-877, 2004.

TRIPATHI, M.B.K. & SINGH, P.K. Glycyrrhizic acid modulates t-BHP induced apoptosis in primary rat hepatocytes. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, p. 339-347, 2009.

UM, S.J.; PARK, M.S.; PARK, S.H.; HAN, H.S.; KWON, Y.J.; SIN, H.S. Synthesis of new glycyrrhetic acid (GA) derivatives and their effects on tyrosinase activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 11, p. 5345-52, 2003.

VALENTA, C. & AUNER, B. The use of polymers for dermal and transdermal delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 58, p. 279-289, 2004.

VARGAS, A. & SOUZA J. R. Nanocomposites of poly(L-lactic acid) and maghemite for drug delivery of caffeine. **Ceramic Transactions**, v. 228, p. 95-105, 2011.

VAUTHIER, C.; DUBERNET, C.; CHAUVIERRE, C.; BRIGGER, I.; COUVREUR P. Drug delivery to resistant tumors: the potential of

poly(alkyl cyanoacrylate) nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, v. 93, n. 2, p. 151–160, 2003.

VELASCO, M.V.; TANO, C.T.N.; MACHADO-SANTELLI, G.M.; CONSIGLIERI, V.O.; KANEKO, T.M.; BABY, A.R. Effects of caffeine and siloxanetriol alginate caffeine, as anticellulite agents, on fatty tissue: histological evaluation. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 7, p. 23–29, 2007.

VERHEUL, R. J.; SLÜTTER, B.; BAL, S. M.; BOUWSTRA, J.; JISKOOT, W.; HENNINK, W. Covalently stabilized trimethyl chitosan-hyaluronic acid nanoparticles for nasal and intradermal vaccination. **Journal of Controlled Release**, v. 156, p. 46–52, 2011.

VERMA, D.D.; VERMA, S.; BLUME, G.; FAHR, A. Particle size of liposomes influences dermal delivery of substances into skin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 258, p. 141-151, 2003.

VILA JATO, J. L. (Ed). **Tecnología Farmacêutica: Aspectos Fundamentals de los sistemas farmacéuticos y operaciones básicas**. Madrid: editorial Síntesis S.A., 1997, p. 577-608.

VLLASALIU, D.; EXPOSITO-HARRIS, R.E.; HERAS, A.; CASETTARIA, L.; GARNETTA, M.; ILLUMD, L.; STOLNIK, S. Tight junction modulation by chitosan nanoparticles: Comparison with chitosan solution. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 400, n. 1, p. 183-93, 2010.

WANG, C.; KAO, T.; LO, W.; YEN, G. Glycyrrhizic Acid and 18 β - Glycyrrhetic Acid Modulate Lipopolysaccharide-Induced Inflammatory Response by Suppression of NF- κ B through PI3K p110 δ and p110 γ Inhibitions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 7726–7733, 2011.

WANG, Z.; KUROSAKI, Y.; NAKAYAMA, T.; KIMURA, T. Mechanism of gastrointestinal absorption of glycyrrhizin in rats. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 17, p. 1399–1403, 1994.

WANG, Z.Y. & NIXON, D.W. Licorice and cancer. **Nutrition and Cancer**, v. 39, p. 1–11, 2001.

WARD, P. D.; TIPPIN, T.; THAKKER, D. Enhancing paracellular permeability by modulating epithelial tight junctions. **Pharmaceutical Science & Technology Today**, v. 3, n. 10, 2000.

WEISS-ANGELI, V.; BOURGEOIS, S.; PELLETIER, J.; GUTERRES, S. S.; FESSI, H.; BOLZINGE, M. Development of an original method to study drug release from polymeric nanocapsules in the skin. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 62, p. 35–45, 2010.

WISUITIPROT, W.; SOMSIRI, A.; INKANINAN, K.; WARANUCH, N. In vitro human skin permeation and cutaneous metabolism of catechins from green tea extract and green tea extract–loaded chitosan microparticles. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 33, p. 572–579, 2011.

WOLKERSTORFER A.; KURZ, H.; BACHHOFNER, N.; SZOLAR, O. Glycyrrhizin inhibits influenza A virus uptake into the cell. **Antiviral Research**, v. 83, p. 171–178, 2009.

WU, X.; LANDFESTER, K.; MUSYANOVYCH, A.; GUY, R.H. Disposition of Charged Nanoparticles after Their Topical Application to the Skin. **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 23, p. 117–123, 2010.

WU, L.; ZHANG, J.; WATANABE, W. Physical and chemical stability of drug nanoparticles. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, p. 456–469, 2011.

WU, Y.; YANG, W.; WANG, C.; HU, J.; FU, S. Chitosan nanoparticles as a novel delivery system for ammonium glycyrrhizinate. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 295, p. 235–245, 2005.

YADAV, V.; PRASAD, S.; SUNG, B.; KANNAPPAN, R.; AGGARWAL, B. Targeting Inflammatory Pathways by Triterpenoids for Prevention and Treatment of Cancer. **Toxins**, v. 2, p. 2428–2466, 2010.

YAMAMURA, J.; KOYASU, M.; SATO, H. Topical treatment of cutaneous herpes simplex virus-1 infection in mice with a specially formulated caffeine gel (Cafon). **Journal of Dermatologic Science**, v. 12, p. 50–55, 1996.

YAMAMURA, Y.; SANTA, T.; KOTAKI, H.; UCHINO, K.; SAWADA, Y.; IGA, T. Administration-route dependency of absorption of glycyrrhizin in rats: intraperitoneal administration dramatically enhanced bioavailability. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 18, p. 337–341, 1995.

YANG, J.; XIE, J.; HE, W. Research progress on chemical modification of alginate: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, p. 33–39, 2011.

YENILMEZ, E.; BASARAN, B.; YAZAN, Y. Release characteristics of vitamin E incorporated chitosan microspheres and in vitro–in vivo evaluation for topical application. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, p. 807–811, 2011.

YOGESHKUMAR, G.; VIKRAM, S.; ABHIMANYU, B.; ADHIKRAO, Y. Stability enhancement of aloe-gel by formulating polyelectrolyte complex Beads. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 2, p. 66-69, 2010.

ZHANG, J.; SHAO, H.; XIAO, Y.; ZHU, Z.; LI ANG, S. Preparation and evaluation in vitro of salicylic acid-pachyman nanoparticles. **Journal of Wuhan University of Technology--Materials Science Edition**, v. 26, n. 4, p. 606-610, 2011.

ZHENG, H.; ZHANG, X.; XIONG, F.; ZHU, Z.; LU, B.; YIN, Y.; XU, P.; DU, Y. Preparation, characterization, and tissue distribution in mice of lactosaminated carboxymethyl chitosan nanoparticles. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, p. 1139–1145, 2011.

ZHENG, Y.; WU, Y.; YANG, W.; WANG, C.; FU, S.; SHEN, X. Preparation, Characterization, and Drug Release In Vitro of Chitosan-Glycyrrhetic Acid Nanoparticles. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 95, n. 1, 2006.

ZHOU, X.; LIU, D.; LIU, H.; YAO, K.; WANG, X.; WANG, L.; YANG, X. Effect of Low Molecular Weight Chitosans on Drug Permeation through Mouse Skin: 1. Transdermal Delivery of Baicalin. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, n. 7, 2010.

ZHU, L.Z.; MA, J. W.; JIA, N. Q.; ZHAO, Y.; SHEN, H. B. Chitosan-coated magnetic nanoparticles as carriers of 5-Fluorouracil: Preparation, characterization and cytotoxicity studies. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 68, p. 1, 2009.

CAPÍTULO II

**PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE
NANOPARTÍCULAS OBTIDAS ATRAVÉS DE
COMPLEXAÇÃO ENTRE QUITOSANA E ALGINATO DE
SÓDIO**

1 INTRODUÇÃO

A interação de dois ou mais polieletrólitos com cargas elétricas opostas leva a formação espontânea de nanopartículas. No desenvolvimento de um sistema nanocarreador através desta técnica, muitas variáveis podem interferir na formação e na estabilidade físico-química, destacando-se a concentração de polieletrólitos, a concentração de reticulante, o pH do meio, a ordem de gotejamento, a velocidade de agitação e o tempo de contato (HARTIG et al., 2007; HAMMAM, 2010). É fundamental que exista um equilíbrio entre cargas positivas e negativas de modo que a maior parte dos sítios ativos estejam ligados (DAVIDENKO et al., 2008; DUCCEL et al., 2006).

A escolha dos componentes da formulação e a faixa de concentração inicialmente proposta foram definidas de acordo com dados da literatura. Os complexos de polieletrólitos foram obtidos com o uso de alginato de sódio como polímero aniônico e quitosana como polímero catiônico. O tripolifosfato de sódio foi utilizado como agente reticulante. Os polieletrólitos foram analisados na faixa de concentração de 0,4 a 2,0 mg/mL, com o objetivo de obter partículas de tamanho nanométrico.

A caracterização físico-química do sistema é fundamental para a seleção das condições experimentais ideais. O conjunto de informações fornecidas pela caracterização desses sistemas pode conduzir a modelos descritivos da organização das nanopartículas em nível molecular, que será dependente da composição quali-quantitativa das formulações (GUTERRES; ALVES; POHLMANN, 2007). Inicialmente, foi realizada uma análise visual da suspensão de nanopartículas, onde através do grau de agregação pode ser definida qual é a faixa de concentração mais propícia para formação de partículas. A seguir foram realizadas análises de turbidez, tamanho de partícula, polidispersão, potencial zeta, pH, viscosidade e morfologia.

O preparo e a caracterização de nanopartículas placebo previamente à incorporação de fármacos permite um maior entendimento das variáveis do sistema, com o objetivo de definir uma formulação base. A adição dos fármacos (ácido glicirrízico, ácido salicílico e cafeína) permite avaliar as implicações destes na formulação principalmente através dos resultados de eficiência de encapsulação. Na literatura podem ser encontrados alguns trabalhos sobre micro/nanoencapsulação destes fármacos em diversos sistemas, porém não foram encontrados relatos dos mesmos incorporados em complexos de quitosana e alginato de sódio reticulados com TPP. Será selecionado

para os estudos de formulação o fármaco que apresentar a melhor eficiência de encapsulação.

2 METODOLOGIA

2.1 PREPARAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS PLACEBO (SEM FÁRMACO)

Os complexos de polieletrólitos (CPEs) foram obtidos com o uso de alginato de sódio (**ALG**; 200.000 g/mol; Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha), quitosana (**QUI**; 122.000 g/mol, grau de desacetilação: 85%; Purifarma, São Paulo, Brasil) e tripolifosfato de sódio (**TPP**; Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha).

Inicialmente foram preparadas soluções estoque de QUI (2,0 mg/mL) em ácido acético 1,0 % (V/V), e de ALG (2,0 mg/mL) e TPP (5,0 mg/mL) em água purificada. As soluções foram filtradas à vácuo.

Para avaliar a formação das nanopartículas, foram variados os parâmetros concentração e pH da solução de QUI, concentração de ALG e concentração de TPP (tabela 2). A partir da solução estoque de QUI foram preparadas soluções em água nas concentrações de 0,6; 0,9 e 1,2 mg/mL, com o pH final ajustado para 3,0; 4,0; 5,0; ou 6,0. A solução estoque de ALG foi diluída em água nas concentrações de 0,4; 0,8; 1,2; 1,6 e 2,0 mg/mL. À fase contendo ALG foi adicionado TPP (0,5 ou 1,0 mg/mL) e o pH final ajustado para 5,5. Adicionalmente, a formação de nanopartículas foi testada apenas com TPP, sem a presença de ALG.

O processo de formação das nanopartículas foi realizado a 25 °C, sob agitação magnética (150 RPM) em um único estágio, com metodologia adaptada de Calvo e colaboradores (1997) e Anal e Stevens (2005). A fase contendo ALG e TPP (volume final de 6,0 mL), ou somente TPP (volume final de 1,0 mL), foi gotejada com pipeta Pasteur à fase contendo QUI (24,0 mL). A suspensão de nanopartículas formada foi mantida sob agitação magnética por 1 h, filtrada em papel de filtro, acondicionada em frascos de vidro ambar e submetida à caracterização físico-química.

Tabela 2. Composição e concentrações avaliadas no preparo das nanopartículas placebo.

Fase de preparo	Componente	Concentrações (mg/mL)	Volume (mL)
FASE 1 pH: 5,5	Alginato de sódio TPP	0,4; 0,8; 1,2; 1,6; 2,0 0,5; 1,0	6,0
FASE 2 pH: 3,0; 4,0; 5,0; 6,0	Quitosana	0,6; 0,9; 1,2	24,0

2.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS NANOPARTÍCULAS PLACEBO (SEM FÁRMACO)

As suspensões de nanopartículas foram avaliadas quanto ao grau de agregação, turbidez, tamanho de partícula, polidispersão, potencial zeta, pH, viscosidade e morfologia.

2.2.1 Grau de agregação

A região de formação de nanopartículas foi avaliada através do grau de agregação. Logo após o preparo, as formulações foram visualizadas e o sistema foi classificado como: solução límpida (L), suspensão opalescente (O), ou agregados (A) (CALVO et al., 1997; LIU & GAO, 2009).

2.2.2 Turbidez

A turbidez da suspensão de nanopartículas foi avaliada através de duas técnicas. Primeiramente através da transmitância (%) da amostra em espectrofotômetro UV-vis (Cary 50 BIO, Varian) utilizando cubetas de quartzo. As leituras foram realizadas em 450 nm (KALOTI & BOHIDAR, 2010). Para zerar o equipamento foi utilizada água purificada.

A medida de intensidade do sinal espalhado em contagens por segundo (kcps) foi obtida através da técnica de espalhamento de luz dinâmico em equipamento Zetasizer Nano (Malvern) do Laboratório de Bioenergética e Bioquímica de Macromoléculas do Departamento de Ciências Farmacêuticas – Centro de Ciências da Saúde da UFSC. O instrumento opera com laser de He-Ne, $\lambda = 633$ nm e a detecção é feita em um único ângulo de 173° .

2.2.3 Determinação do tamanho de partícula e distribuição

A determinação do tamanho de partícula foi realizada a 25 °C, através de medidas de espalhamento de luz dinâmico (DLS). A distribuição do tamanho de partícula é obtida pelo índice de polidispersão (IP). O equipamento utilizado (Zetasizer Nano) está descrito no item 2.2.2.

2.2.4 Determinação do potencial zeta

As medidas do potencial zeta médio das nanopartículas foram realizadas a 25 °C, pela técnica de microeletroforese associada à anemometria Doppler de laser, através da submissão da amostra a um campo elétrico no equipamento (Zetasizer Nano) descrito no item 2.2.2.

2.2.5 Determinação do pH

O pH da suspensão de nanopartículas foi determinado por meio de um medidor de pH/mV marca WTW pH 3300i, previamente calibrado com soluções tampão pH 4,0 e 7,0. As medidas foram obtidas em triplicata através da inserção direta do eletrodo nas amostras sem diluição.

2.2.6 Reologia

As características reológicas das suspensões foram avaliadas com o auxílio de um viscosímetro rotacional Brookfield, modelo DVII + Pro LV com software Rheocalc 32 V3.1-1, utilizando sensor SC4-18 e copo SC4-13R(P). O copo foi acoplado a um dispositivo para avaliação de pequenas quantidades de amostra e a um banho de água termostatizado circulante a 25 °C ± 1 °C (TE-2005, Tecnal).

As velocidades de rotação do sensor foram selecionadas com base em determinações preliminares, respeitando os limites nos valores de torque (superiores a 10 % e inferiores a 100 %). Desta forma, a caracterização reológica das amostras foi realizada através de rampas de cisalhamento ascendentes de 0 a 238 s⁻¹, com aumentos graduais de 20 RPM na velocidade e mantendo cada ponto de cisalhamento por 30 s, e descendentes de 238 a 0 s⁻¹. A unidade utilizada para determinação da viscosidade foi o centiPoise (cP, ou seja 0,01 Poise).

As medidas foram realizadas em triplicata. Para descrever o comportamento de fluxo foi utilizado o modelo de Ostwald, através da equação da lei da força:

$$\sigma = k (\dot{\gamma})^n$$

Equação 4

Em que:

σ = tensão de cisalhamento

γ = taxa de cisalhamento

k = constante (índice de consistência)

n = índice de fluxo

Se $n = 1$ o fluido é newtoniano, se $n < 1$, o fluido é pseudoplástico e se $n > 1$ o fluido é dilatante (BEZERRIL et al., 2006; YASAR; TOGRUL; ARSLAN, 2007).

2.2.7 Morfologia

Para a realização das medidas de microscopia eletrônica de transmissão, 5,0 μL de amostra foram depositados em *grids* de cobre de 2 mm e secas por 48 h, a temperatura ambiente. As imagens das amostras foram obtidas em um microscópio eletrônico de transmissão JEM-101 da JEOL (Tóquio, Japão), operando com voltagem de aceleração de 80 kV, no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da UFSC.

2.3 INCORPORAÇÃO DE FÁRMACOS NAS NANOPARTÍCULAS

Após a caracterização físico-química das nanopartículas, as concentrações ideais dos componentes foram estabelecidas e foi realizada a incorporação dos fármacos. Foram testados o ácido glicirrízico (DEG, São Paulo, Brasil), o ácido salicílico (DEG, São Paulo, Brasil) e a cafeína (Valdequímica, São Paulo, Brasil). Para cada fármaco, foi preparada uma solução de 1,0 mg/mL em água, tendo sido gotejados 6,0 mL de cada solução na fase contendo QUI (24,0 mL), sob agitação magnética, seguida do gotejamento da fase contendo ALG e TPP (6,0 mL), ou somente TPP (1,0 ou 2,0 mL). O procedimento foi o mesmo do descrito no item 2.1.

2.3.1 Desenvolvimento e validação dos métodos analíticos (CLAE) utilizados para quantificação dos fármacos

A quantificação dos fármacos nas nanopartículas desenvolvidas foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando um cromatógrafo Shimadzu LC-10A (Kyoto, Japão), equipado com bombas LC-10AD, detector UV/VIS SPD-10AV_{VP}, unidade de controle SCL-10A_{VP} e auto-injetor Jasco AS-2055 Plus.

2.3.1.1 Desenvolvimento do método para quantificação do ácido glicirrízico

Para quantificação do ácido glicirrízico (AG) foi utilizada uma coluna de fase reversa C₁₈ Phenomenex Luna (250 mm x 4,6 mm, 5 µm) e o sistema mantido à temperatura de 25 ± 1 °C. Uma pré-coluna (4,0 mm x 3,0 mm) foi utilizada para proteger a coluna analítica.

A fase móvel consistiu numa mistura de metanol:tampão fosfato de potássio 0,025 M (60:40 v/v) adicionada de 5 mM de tetrabutilamônio de sódio. As análises foram realizadas em modo isocrático, com fluxo de 1,2 mL/min, detecção UV a 254 nm e volume de injeção de 20 µL. As áreas dos picos foram integradas automaticamente através do *software* Shimadzu Class VP® V 6.14.

2.3.1.2 Desenvolvimento do método de quantificação do ácido salicílico

Para quantificação do ácido salicílico (AS) foi utilizada uma coluna de fase reversa C₁₈ Phenomenex Luna (250 mm x 4,6 mm, 5 µm) e o sistema mantido a temperatura de 25 ± 1 °C. Uma pré-coluna (4,0 mm x 3,0 mm) foi utilizada para proteger a coluna analítica.

A fase móvel consistiu numa mistura de metanol:água (70:30 v/v) ajustada a pH 2,6. As análises foram realizadas em modo isocrático, com fluxo de 1,0 mL/min, detecção UV a 237 nm e volume de injeção de 20 µL. As áreas dos picos foram integradas automaticamente através do *software* Shimadzu Class VP® V 6.14.

2.3.1.3 Desenvolvimento do método de quantificação da cafeína

Para quantificação da cafeína (CF) foi utilizada uma coluna de fase reversa C₈ Perkin-Elmer (150 mm x 4,6 mm, 5 µm) e o sistema mantido a temperatura de 25 ± 1 °C. A fase móvel consistiu numa mistura de H₃PO₄ 0,01 M (ajustado a pH 2,8 com trietilamina):acetonitrila (90:10 v/v). As análises foram realizadas em modo isocrático, com fluxo de 1,0 mL/min, detecção UV a 262 nm e volume de injeção de 20 µL. As áreas dos picos foram integradas automaticamente através do *software* Shimadzu Class VP® V 6.14.

2.3.1.4 Conformidade do sistema

Previamente aos ensaios das amostras por CLAE, foi verificada a conformidade do sistema através da injeção de 6 replicatas de uma solução de cada fármaco com sua respectiva metodologia analítica. Este teste visa verificar a validação do instrumento e da metodologia

analítica, simultaneamente. Foram avaliadas a repetibilidade das áreas dos picos, tempo de retenção, assimetria e número de pratos teóricos.

2.3.1.5 Validação dos métodos

O processo de validação foi realizado para cada método analítico desenvolvido através dos seguintes parâmetros, de acordo com a ICH (2005): especificidade, linearidade, exatidão, precisão, robustez e limites de quantificação e detecção.

Para os parâmetros especificidade, exatidão, precisão e robustez foram utilizadas suspensões de nanopartícula sem fármaco (placebo), que foram contaminadas ou não com concentrações conhecidas de cada fármaco, dependendo do parâmetro avaliado. A formulação contendo quitosana 0,9 mg/mL e alginato 1,2 mg/mL foi a escolhida para validação dos métodos, pois apresenta concentrações intermediárias de cada polímero e pode demonstrar possíveis interferências dos excipientes na quantificação de cada fármaco.

2.3.1.5.1 Especificidade

Para confirmar a especificidade do método, foi visualizada a ausência de interferências pelos excipientes que fazem parte das nanopartículas (quitosana, alginato e TPP). Foram preparadas nanopartículas sem o fármaco (placebo) e analisadas nas mesmas circunstâncias experimentais das amostras na presença do fármaco.

Além disso, a pureza do pico cromatográfico de cada fármaco foi obtida com auxílio de um detector de arranjo de fotodiodos (SPD-M10A_{VP} Perkin-Elmer). Todas as medidas foram realizadas em triplicata.

2.3.1.5.2 Linearidade, e Limites de Detecção (LD) e Quantificação (LQ)

A linearidade corresponde à capacidade do método em demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração da substância analisada, dentro de um dado intervalo. A linearidade foi determinada através da construção de três curvas de calibração para cada fármaco, em três dias diferentes. Para a construção de cada curva de calibração seis concentrações de cada fármaco (5,0; 10,0; 25,0; 50,0; 75,0 e 100,0 µg/mL) foram preparadas nas suas respectivas fases móveis. Foram realizadas três injeções de 20 µL de cada solução para verificar a repetibilidade da resposta do detector em cada concentração. As áreas de pico dos cromatogramas foram plotadas *versus* as concentrações padrão para obter as curvas de calibração. As áreas obtidas de cada concentração foram submetidas à análise de

regressão pelo método dos mínimos quadrados para calcular a equação da reta e o coeficiente de correlação.

O limite de detecção (LD) corresponde à menor concentração presente na amostra que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada. O limite de quantificação (LQ) corresponde à menor concentração que pode se determinada quantitativamente com aceitável precisão e exatidão. O LD e LQ foram calculados a partir da inclinação e do desvio padrão do intercepto da média de três curvas de calibração, conforme preconizado pela ICH (2005). O LD e LQ foram confirmados em uma análise experimental.

2.3.1.5.3 Exatidão

A exatidão do método foi avaliada por meio da contaminação de amostras de suspensões de nanopartículas placebo com soluções de concentração conhecida de cada fármaco, correspondendo a concentrações finais de 40,0; 50,0 e 60,0 µg/mL. A recuperação foi determinada como sendo a diferença percentual entre a concentração experimental média e a concentração teórica em cada nível. Cada concentração foi analisada em triplicata.

2.3.1.5.4 Precisão

A precisão foi determinada por meio da repetibilidade (intra-dia) e precisão intermediária (inter-dia). A repetibilidade foi avaliada analisando 6 amostras de nanopartículas placebo contaminadas com soluções de cada fármaco, correspondendo a concentração final de 50,0 µg/mL, no mesmo dia, nas mesmas condições experimentais. Na precisão intermediária as análises foram realizadas em três dias diferentes. As áreas dos picos obtidas foram comparadas e a precisão foi expressa em porcentagem como desvio padrão relativo (DPR %). De maneira geral, para análises de formas farmacêuticas, DPR entre 1,0 e 2,0 % normalmente é considerado satisfatório (SHABIR, 2003).

2.3.1.5.5 Robustez

A robustez do método foi determinada através da análise de uma mesma amostra de nanopartículas placebo contaminadas com soluções de cada fármaco (50,0 µg/mL), modificando os seguintes parâmetros do método: temperatura do forno, fluxo e composição da fase móvel.

2.3.2 Determinação da eficiência de encapsulação e do teor de fármaco nas suspensões de nanopartículas

A determinação da concentração total de ativo associado às nanopartículas foi realizada pela técnica de ultrafiltração/centrifugação utilizando os métodos cromatográficos desenvolvidos e validados, na qual o ativo livre foi determinado no ultrafiltrado, enquanto o ativo total foi quantificado após completa dissolução das nanopartículas (BOONSONGRIT; MITREVEJ; MUELLER, 2006; GAN & WANG, 2007; SUN et al., 2008).

Para obter o ultrafiltrado, 0,5 mL de suspensão de nanopartículas foram centrifugadas a 6.000 RPM durante 20 minutos em unidades de centrifugação Amicon Ultra-0,5 (Ultracel[®]-100K 100000 MW; Millipore, Irlanda). Para a determinação da concentração total de fármaco na suspensão de nanopartículas, 1,0 mL de suspensão foi mantida em contato com 1,0 mL de metanol durante 24 h para completa dissolução do complexo, seguido da diluição com a fase móvel correspondente para cada fármaco até volume de 10,0 mL. A partir da concentração total foi estabelecido o teor de fármaco nas suspensões, expresso em µg/mL.

A eficiência de encapsulação (EE %) foi estimada de acordo com a equação 5.

$$EE (\%) = \frac{C_T - C_{UF}}{C_T} * 100 \quad \text{Equação 5}$$

Em que

C_T = concentração total de fármaco encontrada na suspensão após dissolução das nanopartículas;

C_{UF} = concentração de fármaco encontrada no ultrafiltrado.

Para verificar a recuperação do fármaco adicionado, primeiramente o teor (µg/mL) foi multiplicado pelo volume final de suspensão a fim de estabelecer a quantidade total (g) de fármaco presente. A seguir, a taxa de recuperação (%) foi calculada como sendo a diferença percentual entre a quantidade de fármaco inicialmente adicionada (6,0 g) e aquela encontrada nas suspensões.

2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os experimentos foram realizados com três repetições independentes e os resultados foram expressos como média ± desvio

padrão ou desvio padrão relativo. Para comparações entre grupos foi utilizada análise de variância (ANOVA), incluindo testes de comparações múltiplas (Tukey). Diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando $p \leq 0,05$.

3 RESULTADOS

Complexos de polieletrólitos são formados através da mistura de soluções aquosas de dois polímeros com cargas opostas (BECHERÁN-MARÓN; PENICHE; ARGUELLES-MONAL, 2004; GAZORI et al., 2009). Geralmente a formação destes complexos pode ser controlada via pH e concentração de polieletrólitos (BARCK & BUTLER, 2005). Na literatura são descritos estudos em que a complexação entre quitosana e alginato de sódio foi investigada variando o pH da solução em uma faixa de 3,0 a 7,0. Dentro desta faixa os grupos carboxila do alginato e os grupos amino da quitosana estarão ionizados, em maior ou menor grau, permitindo a formação de complexos através da interação eletrostática (BOONSONGRIT; MITREVEJ; MUELLER, 2006; DOUGLAS & TABRIZIAN, 2005). Entretanto, em valores de pH acima de 5,0, a formação de complexos tende a diminuir, principalmente devido a fenômenos associados a molécula de quitosana. Como a quitosana possui pKa entre 5,9 e 6,7, seu grau de ionização e solubilidade diminui, geralmente ocorrendo precipitação em pH próximo a 7,0 (ESPINOSA-ANREWS et al., 2007).

O estudo realizado preliminarmente à adição de fármacos teve por objetivo encontrar as condições necessárias para ocorrer a interação, buscando através da caracterização físico-química as concentrações de polímeros e valores de pH ideais.

Foram utilizadas soluções diluídas dos polímeros quitosana (QUI) e alginato de sódio (ALG), de forma que a QUI estivesse em excesso para interação. A solução de QUI foi testada com valores de pH variando entre 3,0 a 6,0, faixa em que estará ionizada em maior ou menor grau, apresentando carga positiva.

O tripolifosfato de sódio (TPP) foi utilizado em duas concentrações (0,5 e 1,0 mg/mL) como agente reticulante, com o objetivo de reforçar a interação. O TPP foi adicionado à fase do ALG, sendo que o pH final foi ajustado para 5,5. Neste pH tanto o ALG quanto o TPP apresentam carga superficial negativa disponível para interação (SIMSEK-EGE; BOND; STRINGER, 2003). Com o uso de dois componentes com carga negativa é esperado que o processo de

gelificação iônica causado pelo TPP ocorra concomitantemente à complexação da QUI com os grupamentos COO^- do ALG (ANAL & STEVENS, 2005; GOYCOOLEA et al., 2009).

3.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS NANOPARTÍCULAS PLACEBO (SEM FÁRMACO)

3.1.1 Grau de agregação

O grau de agregação é uma análise preliminar utilizada para estabelecer a faixa de concentração que será empregada no preparo das nanopartículas.

Quando sistemas de alta massa molar são colocados em contato e ocorre a formação de nanopartículas, a suspensão final é opalescente devido à nova estrutura formada. Por outro lado, um sistema límpido pode indicar que a interação entre os polieletrólitos foi fraca devido à baixa concentração utilizada, ao contrário de um sistema contendo agregados, onde provavelmente os polieletrólitos foram adicionados em excesso causando precipitação. Desta forma, a condição ideal para a formação de nanopartículas a partir de polieletrólitos da alta massa molar é a que apresenta uma suspensão opalescente (CALVO et al., 1997; LIU & GAO; 2009; SHU et al., 2009).

Logo após o preparo das suspensões de nanopartículas, as mesmas foram avaliadas visualmente e três sistemas diferentes foram identificados: solução límpida (L), suspensão opalescente (O) e agregados (A) (tabela 3).

Tabela 3. Avaliação visual do grau de agregação dos sistemas formados

Quitosana ^a (mg/mL)	Alginato de sódio (mg/mL)					
	0,0 ^b	0,4	0,8	1,2	1,6	2,0
0,6	L	L	O	O	O	A
0,9	L	L	O	O	O	A
1,2	L	L	O	O	O	A

^a soluções de quitosana com pH ajustado para 3,0; 4,0; 5,0 e 6,0.

^b fase 1 somente com TPP, sem alginato de sódio.

L: solução límpida; O: suspensão opalescente; A: agregados.

De acordo com a tabela 3, para todas as concentrações de QUI testadas, as formulações sem a presença de ALG e com ALG na concentração de 0,4 mg/mL apresentaram-se límpidas, indicando que o sistema possui uma menor concentração de partículas, insuficiente para gerar uma suspensão opalescente.

Por outro lado, ao utilizar ALG na concentração de 2,0 mg/mL ocorreu a agregação e precipitação da suspensão, provavelmente devido à um excesso de polímero não complexado. Desta forma, estas formulações foram descartadas dos estudos subsequentes. Além disso, todas as formulações preparadas com solução de QUI em pH 6,0 foram descartadas do estudo, pois ocorreu a formação de agregados. Neste pH, a QUI está menos protonada, apresentando menos sítios ionizados para interação, pois o valor de pH é próximo ao seu pK_a (entre 5,9 e 6,7). Assim, a interação eletrostática ocorreu em menor grau, levando a um excesso de polímeros dispersos no meio formando agregados, fato já relatado na literatura (SAETHER et al., 2008; SIMSEK-EGE; BOND; STRINGER, 2003).

A região de formação de uma suspensão opalescente, que corresponde a maior concentração de partículas coloidais, foi obtida com as concentrações de ALG de 0,8; 1,2; e 1,6 mg/mL e com solução de QUI com pHs ajustados para 3,0; 4,0; e 5,0.

3.1.2 Turbidez

A turbidimetria avalia a propriedade que determinadas dispersões apresentam de espalharem luz. Medidas de espalhamento de luz são de grande valor para estimar o tamanho das partículas, sua forma e suas interações, particularmente em materiais macromoleculares. Desta forma, a medida da turbidez pode ser utilizada como forma de acompanhar a formação do complexo. As soluções com maior turbidez possuem uma maior quantidade de macromoléculas do que soluções translúcidas (ESPINOSA-ANREWS 2007; HARTIG et al., 2007; KALOTI & BOHIDAR, 2010; TIYABOONCHAI & LIMPEANCHOB, 2007; VASCONCELOS et al., 2006).

Existem duas técnicas que podem ser utilizadas para esta determinação: espectrofotometria de absorção UV-vis e espalhamento de luz dinâmico. De uma forma prática, na análise utilizando espectrofotometria UV-vis, quanto maior for a absorbância da amostra, maior é o número de partículas presentes e menor será a transmitância. O comprimento de onda de 450 nm foi escolhido para a análise, uma vez que a QUI e o ALG não absorvem luz neste comprimento, fazendo com que o número e/ou o tamanho das partículas sejam responsáveis pela interferência na absorção/transmitância da luz incidente (SAETHER et al., 2008; VASCONCELOS et al., 2006).

Por outro lado, uma vez que a maioria dos sistemas coloidais apresenta turbidez bastante baixa, torna-se mais conveniente e preciso medir a luz espalhada a um ângulo relativo ao feixe incidente

(AULTON, 2005). Para isto foi empregada a técnica de espalhamento de luz dinâmico, onde além de poder avaliar o tamanho de partícula e sua distribuição, foi possível observar a intensidade de luz espalhada, medida em contagens por segundo (kcps), que reflete a medida da concentração de partículas na amostra (BAO et al., 2008; DROGOZ et al., 2007; SUN et al., 2008).

Os dados de turbidez da fase de equilíbrio dos complexos QUI-ALG obtidos com as técnicas de espectroscopia UV-vis (transmitância %) e espalhamento de luz dinâmico (kcps) podem ser visualizados nas tabelas 3 e 4. Os dados foram organizados de acordo com a concentração de QUI testada (0,6; 0,9 e 1,2 mg/mL), a fim de avaliar a influência da concentração de ALG (0,8; 1,2 e 1,6 mg/mL) e de TPP (0,5 e 1,0 mg/mL), além do pH da solução de QUI (3,0; 4,0 e 5,0) na turbidez das suspensões de nanopartículas.

Na tabela 4 estão agrupados os dados obtidos com as soluções de QUI 0,6 e 0,9 mg/mL.

Tabela 4. Turbidez das suspensões de nanopartículas avaliada pela transmitância (T %) e contagens por segundo (kcps).

		Turbidez ^a						
		pH 3,0		pH 4,0		pH 5,0		
	ALG (mg/mL)	TPP (mg/mL)	T (%)	kcps	T (%)	kcps	T (%)	kcps
QUI 0,6 mg/mL	0,8	0,5	80,8	158,1	75,2	204,0	74,1	243,5
		1,0	74,7	202,7	69,6	249,8	52,7	283,9
	1,2	0,5	99,7	122,0	67,8	196,4	65,1	265,3
		1,0	64,7	235,8	62,3	314,5	56,5	315,1
	1,6	0,5	99,1	90,0	97,2	131,0	76,2	153,1
		1,0	77,9	160,6	66,5	300,0	53,1	333,2
QUI 0,9 mg/mL	0,8	0,5	80,3	137,1	79,2	182,0	78,1	208,1
		1,0	78,0	176,3	76,0	216,1	72,7	274,6
	1,2	0,5	72,8	163,7	66,7	227,2	64,2	285,9
		1,0	68,7	214,1	60,0	292,7	56,8	292,9
	1,6	0,5	81,0	103,0	65,9	231,5	60,3	310,2
		1,0	78,6	155,4	52,4	310,7	48,1	451,9

^a média de três determinações

Primeiramente, pode ser observado que os valores de transmitância (%) e intensidade do espalhamento de luz (kcps) são inversamente proporcionais. Através de análise de variância, constatou-

se que os dados de kcps são mais discriminatórios do que os dados de transmitância, apresentando maiores diferenças entre os resultados ($p \leq 0,05$), provavelmente por ser um método de análise mais sensível e informativo, o que também foi observado por Donati e colaboradores (1997). As formulações foram analisadas em triplicata e todos os resultados apresentaram desvio padrão relativo $< 3\%$.

A obtenção de uma alta concentração de complexos na suspensão é visualizada quanto menor for o valor de T (%) e maior o valor de kcps (maior turbidez) (COOK et al., 2011; ZHENG et al., 2007). A formulação que melhor atendeu a estes requisitos foi a formulada com QUI 0,9 mg/mL (pH 5,0), ALG 1,6 mg/mL, e TPP 1,0 mg/mL, apresentando 48 % de transmitância, e 451,9 kcps.

Além disso, observando os dados das formulações preparadas com QUI 0,6 e 0,9 mg/mL (tabela 4), verifica-se que a maior concentração de TPP e o aumento do pH da solução de QUI foram responsáveis em aumentar a turbidez das suspensões, mostrando uma diferença significativa tanto para os valores de T % quanto para kcps ($p \leq 0,05$). Isto sugere que são parâmetros importantes para uma maior interação eletrostática.

As formulações preparadas com QUI 1,2 mg/mL (tabela 5) apontaram resultados discrepantes, possivelmente pelo excesso de QUI adicionado para interação. As formulações foram analisadas em triplicata e todos os resultados apresentaram desvio padrão relativo $< 5\%$.

Tabela 5. Turbidez das suspensões de nanopartículas avaliada pela transmitância (T %) e contagens por segundo (kcps).

		Turbidez ^a						
		pH 3,0		pH 4,0		pH 5,0		
	ALG (mg/mL)	TPP (mg/mL)	T (%)	kcps	T (%)	kcps	T (%)	kcps
QUI 1,2 mg/mL	0,8	0,5	80,7	92,0	77,9	170,7	77,3	190,6
		1,0	77,9	153,5	73,5	212,5	73,3	231,4
	1,2	0,5	73,8	181,1	70,4	257,1	69,2	175,7
		1,0	67,2	395,4	67,1	439,0	62,1	261,6
1,6	0,5	85,6	115,0	86,4	105,9	70,4	126	
	1,0	71,3	352,8	80,1	145,3	82,3	211,3	

^a média de três determinações

Através dos resultados de turbidez foi verificado que os dados obtidos com concentração de ALG de 1,2 mg/mL e pH da QUI de 4,0

apresentaram valores intermediários aos valores mínimos e máximos. Assim, estes parâmetros foram excluídos dos próximos estudos.

3.1.3 Determinação do tamanho de partícula e distribuição

Através da técnica de complexação de polieletrólitos podem ser obtidas partículas com ampla faixa de tamanho, de nanômetros até milímetros (GAZORI et al., 2009; LUCINDA-SILVA; SALGADO; EVANGELISTA, 2010; TAKKA & GUREL, 2010). Geralmente, os fatores que determinam o tamanho são a concentração de polieletrólitos e o grau de complexação, sendo que este último depende do pH do meio e do grau de ionização dos polieletrólitos.

De acordo com a literatura, partículas menores e mais compactas são resultado de um maior entrelaçamento das cadeias dos polieletrólitos, causado por uma maior interação eletrostática (AELENEI et al., 2009; AVADI et al., 2010).

Os resultados de tamanho de partícula obtidos para as formulações desenvolvidas podem ser visualizados nas figuras 12 e 13. Na figura 12 estão os resultados das formulações desenvolvidas com ALG 0,8 mg/mL, enquanto que na figura 13 os resultados obtidos com ALG 1,6 mg/mL.

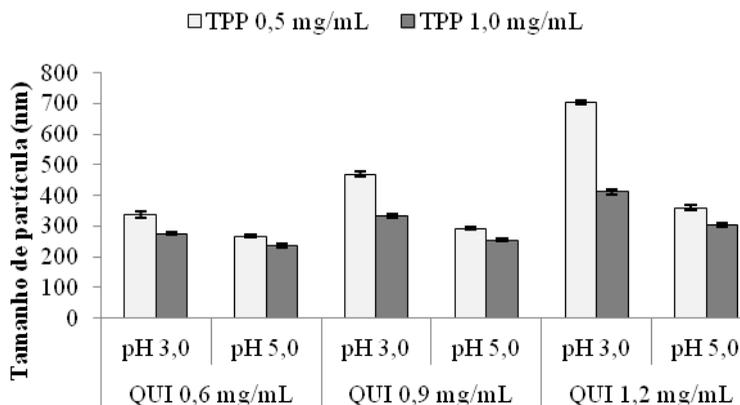


Figura 12. Valores de tamanho de partícula médio das nanopartículas placebo obtidas com ALG 0,8 mg/mL.

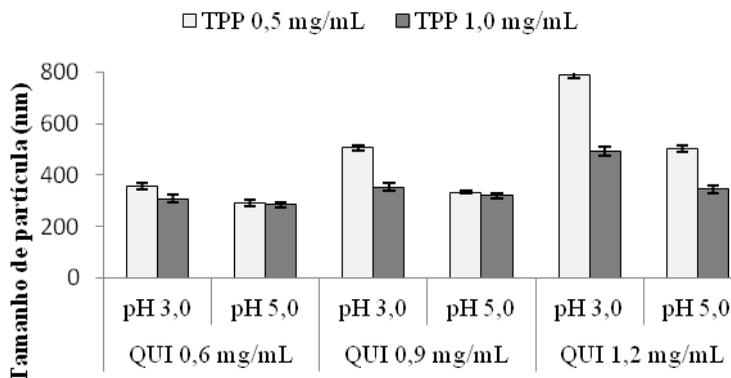


Figura 13. Valores de tamanho de partícula médio das nanopartículas placebo obtidas com ALG 1,6 mg/mL.

Podem ser observados nas figuras 12 e 13 que o aumento das concentrações de QUI e ALG ocasionou um aumento do tamanho de partícula. Isto se justifica porque a maior concentração em solução significa maior número de cadeias poliméricas por volume, sendo que a adição de outro polímero resulta na formação de partículas maiores (BAO et al., 2008). Este fato foi relatado por outros autores utilizando QUI complexada com diferentes polieletrólitos (CHUAH et al., 2008; KALOTI & BOHIDAR, 2010; TSAI et al., 2010).

De acordo com Boonsongrit, Mitrevej, e Mueller (2006) e Pan e colaboradores (2002), o aumento na concentração de QUI e TPP leva a um aumento do tamanho de partícula e polidispersão. Entretanto, com relação ao TPP, os estudos anteriores contradizem os resultados obtidos neste trabalho, onde o aumento na concentração de TPP causou uma diminuição do tamanho, provavelmente devido à reticulação das cadeias poliméricas, levando a uma maior compactação da partícula. Este efeito do TPP também foi observado por Gan e colaboradores (2005) e por Liu e Gao (2008), o que parece ser uma explicação mais aceitável para o fenômeno.

Ao analisar a influência do pH final das suspensões no tamanho, foi observado que em pH 5,0 as partículas obtidas foram significativamente menores que em pH 3,0 ($p \leq 0,05$). Um dos principais fatores que levaram a este resultado é que em meio ácido a QUI está altamente ionizada e a repulsão mútua entre os grupos amino livres proporciona uma estrutura mais alongada, formando complexos mais expandidos com o ALG carregado negativamente. Com o aumento

do pH para 5,0, esta força de repulsão entre os grupos amino livres diminui e facilita a formação de partículas compactas e menores (SINSEK-EGE; BOND; STRINGER, 2003; SUN et al., 2008; TSAI et al., 2010). Outro fator que contribui para a obtenção de partículas maiores em pH 3,0 é a proximidade deste pH com os valores de pK_a do ALG (3,38 e 3,65), acarretando na precipitação e agregação de uma parte da molécula do ALG, contribuindo para o aumento no tamanho e polidispersão (SARMENTO et al., 2006).

A polidispersão é um fator importante que determina a homogeneidade da dispersão. Valores menores que 0,5 indicam uma dispersão relativamente homogênea em se tratando de nanopartículas contendo polímeros naturais (AVADI et al., 2010). Ao avaliar este parâmetro neste estudo, foram obtidos valores entre 0,18 e 0,29 para as nanopartículas desenvolvidas em pH 5,0, e de 0,30 a 0,72 para as nanopartículas desenvolvidas em pH 3,0. Este efeito do pH sobre a polidispersão comprova a teoria de que o pH da solução de QUI impacta na formação das partículas, já que uma maior homogeneidade na dispersão das partículas pode significar que o entrelaçamento das cadeias ocorreu com maior eficiência.

3.1.3.1 Correlação entre tamanho de partícula e turbidez

Apesar de alguns autores relacionarem o aumento da turbidez com o aumento do tamanho de partícula (SHU et al., 2009), neste trabalho isto não foi observado. A fim de exemplificar, na figura 14 podem ser visualizados os resultados de tamanho de partícula e turbidez das formulações preparadas com alginato 1,6 mg/mL e TPP 1,0 mg/mL.

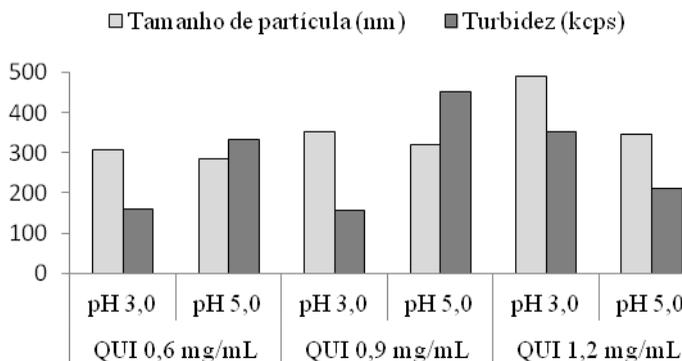


Figura 14. Análise do tamanho de partícula e turbidez das formulações preparadas com alginato 1,6 mg/mL e TPP 1,0 mg/mL.

Na figura 14 pode ser observado que a formulação que apresenta maior turbidez não corresponde ao maior tamanho de partícula. Este comportamento também foi constatado nas demais formulações. De acordo com Shovsky e colaboradores (2009), a turbidez pode estar relacionada com uma maior concentração de CPEs ou com um maior tamanho das partículas de CPEs, ou ambos os casos. Sun e colaboradores (2008) encontraram resultado similar analisando CPEs formados com QUI e enoxaparina. Os autores correlacionaram o tamanho de partícula (nm) com a turbidez (kcps) a fim de encontrar a melhor razão estequiométrica entre os dois polieletrólitos, onde verificaram que o tamanho de partícula diminui até um platô acompanhado de um aumento no valor de kcps que, segundo os autores, está relacionado à formação de maior número de partículas. Similarmente, Espinosa-Andrews e colaboradores (2007) afirmam que soluções mais turvas possuem uma maior quantidade de macromoléculas do que soluções translúcidas.

Provavelmente, o aumento da turbidez observado nas formulações está relacionado ao aumento da concentração de partículas formadas, devido a uma maior eficiência na complexação e não ao tamanho das partículas individualmente.

3.1.4 Determinação do Potencial zeta

A estabilidade de um sistema coloidal está diretamente relacionada à magnitude do seu potencial zeta, que indica a carga superficial das nanopartículas (GAZORI et al., 2009). Um potencial zeta elevado (± 30 mV) indica estabilidade eletrocinética da formulação, pois mantém a espessura da dupla camada elétrica, prevenindo a agregação devido às fortes forças repulsivas entre as partículas (AVADI et al., 2010; PARVEEN et al., 2010; SAETHER et al., 2008).

A carga é controlada pela ionização de grupos da superfície. A QUI e o ALG adquirem a sua carga principalmente por meio da ionização de grupos amina e carboxila, resultando em íons NH_3^+ e COO^- . A ionização destes grupos e, portanto, a carga molecular líquida dependem do pH do sistema.

Em um estudo recente foi determinado que o potencial zeta de uma solução de QUI (1,0 mg/mL) é zero em pH 7,5 (SAETHER et al., 2008). Em pH 6,5 (próximo ao pK_a da QUI) somente 50 % dos grupos funcionais da QUI estão ionizados, resultando em uma baixa densidade de carga. Assim, é esperado um aumento na densidade de carga com a diminuição do pH para valores abaixo do pK_a da QUI, causado pela

protonação dos grupos amino (BODDOHI & KIPPER, 2010; MARTINS; MANO; ALVES, 2010).

A carga superficial das soluções estoque de polieletrólitos foi avaliada antes da complexação e está descrita na tabela 6.

Tabela 6. Potencial zeta médio obtido das soluções estoque antes da complexação.

Soluções estoque	pH	Potencial Zeta^a (mV) ± DPR^b (%)
QUI 2,0 mg/mL	3,0	+ 65,7 ± 0,51
QUI 2,0 mg/mL	5,0	+ 37,5 ± 0,92
TPP 5,0 mg/mL	5,5	- 6,5 ± 0,42
ALG 2,0 mg/mL	5,5	- 63,9 ± 0,45

^amédia de três determinações; ^bdesvio padrão relativo

Os resultados estão de acordo com o descrito na literatura, pois a QUI apresentou densidade de carga positiva maior em pH 3,0 do que em pH 5,0, e a solução de ALG apresentou alta densidade de carga negativa em pH 5,5.

Neste trabalho a QUI foi o polímero utilizado em excesso, conseqüentemente, as nanopartículas desenvolvidas apresentaram carga superficial positiva (tabela 7) proveniente dos grupos amino residuais não neutralizados pelos grupos carboxila do ALG (DROGOZ et al., 2007; PARVEEN et al., 2010).

Tabela 7. Potencial zeta médio das nanopartículas placebo.

	ALG (mg/mL)	TPP (mg/mL)	Potencial Zeta^a (mV)	
			pH 3,0	pH 5,0
QUI 0,6 mg/mL	0,8	0,5	+ 51,0	+ 33,6
		1,0	+ 41,3	+ 25,0
	1,6	0,5	+ 46,5	+ 29,4
		1,0	+ 30,9	+ 22,1
QUI 0,9 mg/mL	0,8	0,5	+ 52,0	+ 34,2
		1,0	+ 43,9	+ 30,0
	1,6	0,5	+ 49,5	+ 32,0
		1,0	+ 40,8	+ 28,0
QUI 1,2 mg/mL	0,8	0,5	+ 57,0	+ 35,0
		1,0	+ 48,9	+ 32,0
	1,6	0,5	+ 54,7	+ 33,0
		1,0	+ 45,8	+ 29,0

^a média de três determinações

Este potencial de superfície positivo é considerado uma vantagem do ponto de vista biofarmacêutico, pois favorece a bioadesão das nanopartículas à superfície celular e às junções da pele carregadas negativamente (COPPI & IANNUCELLI 2009; GOYCOOLEA et al., 2009; YENILMEZ; BASARAN; YAZAN, 2010).

Para realizar uma comparação entre os resultados foram plotados gráficos contendo a média dos valores de potencial zeta obtidos utilizando ALG 0,8 mg/mL (figura 15) e ALG 1,6 mg/mL (figura 16).

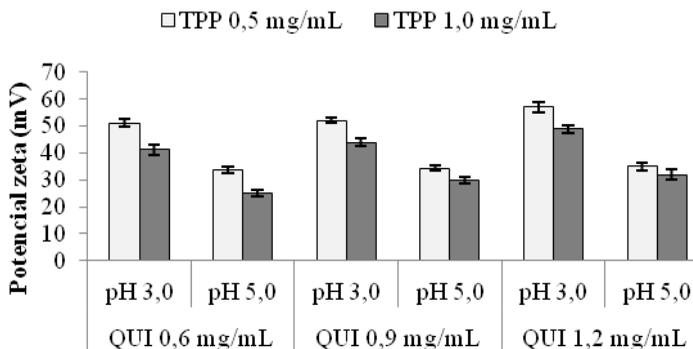


Figura 15. Potencial zeta médio das nanopartículas placebo obtidas com ALG 0,8 mg/mL.

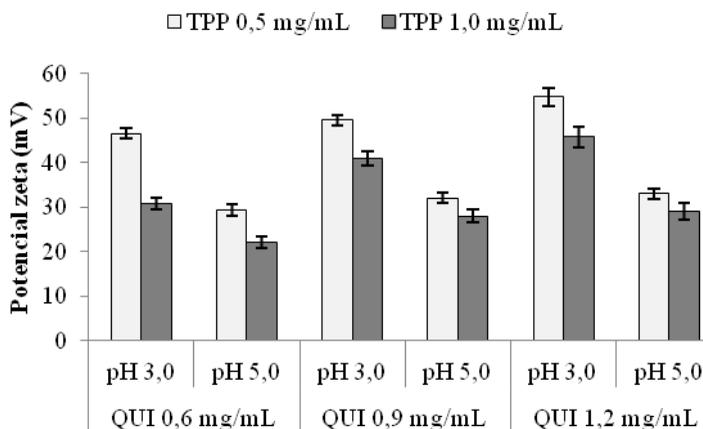


Figura 16. Potencial zeta médio das nanopartículas placebo obtidas com ALG 1,6 mg/mL.

Primeiramente, pode ser observado na maior parte das formulações que com o aumento da concentração de QUI ocorre um aumento no potencial zeta das nanopartículas, devido à presença de maior número de sítios positivos. Já o aumento da concentração de ALG e do TPP reduziu o potencial zeta, indicando que a presença de mais moléculas com carga negativa na suspensão levou a uma maior complexação com os sítios da QUI, restando menos grupos positivos e assim modificando a carga superficial das partículas (XU et al., 2003).

Avaliando o efeito do pH pode ser visualizado que em pH 5,0 o potencial zeta foi significativamente menor do que em pH 3,0 em todas as concentrações testadas, uma vez que a carga superficial é dependente do pH. Desta forma, em valores de pH próximos ao pKa da QUI existem menos grupos amino protonados disponíveis para interação e, conseqüentemente, o valor da carga superficial das partículas é menor.

3.1.5 Determinação do pH

A análise do pH das suspensões de nanopartículas apresentou valores de acordo com o pH da solução de QUI utilizada (3,0 ou 5,0), com variação não significativa em todos os casos ($p \geq 0,05$) e desvio padrão relativo entre as medidas $< 1\%$. Isto se deve ao fato que a fase contendo a QUI está presente em excesso na formulação, determinando o valor final de pH.

3.1.6 Reologia

A viscosidade de um sistema coloidal varia com a velocidade de cisalhamento aplicada, característica de um fluido não-newtoniano. Se uma taxa de cisalhamento crescente for aplicada a um fluido e a tensão de cisalhamento for registrada, podem ser obtidas curvas de fluxo ou reogramas, que fornecem informações sobre o comportamento de fluxo das amostras (ALVES; POHLMANN; GUTERRES, 2005; BRICEÑO, 2000). Assim, as suspensões de nanopartículas foram submetidas à velocidade de cisalhamento crescente, o que provocou uma destruição da estrutura do sistema. Este sistema, uma vez desorganizado, tende a se reorganizar ao sofrer velocidades decrescentes de tensão de cisalhamento.

As formulações obtidas com QUI na concentração de 0,6 mg/mL foram descartadas deste estudo, pois devido à baixa viscosidade das amostras o equipamento não foi capaz de realizar as medidas.

Para as demais formulações analisadas com o aumento da taxa de cisalhamento ocorreu um aumento da viscosidade em maior ou menor grau, sendo que com a diminuição da taxa de cisalhamento as

suspensões voltaram a sua viscosidade inicial devido à característica de fluido não-newtoniano dilatante. Este tipo de comportamento pode ser exibido por dispersões que contém uma alta concentração de partículas pequenas. Sob condições de cisalhamento nulo, as partículas estarão densamente empacotadas e os espaços vazios entre as partículas estarão reduzidos a um mínimo que o veículo preencherá. À medida que a velocidade de cisalhamento é aumentada, as partículas serão deslocadas de suas posições de distribuição homogênea e os agregados que são produzidos resultam na criação de espaços vazios maiores, nos quais flui o veículo, de forma que a resistência ao fluxo é aumentada e a viscosidade cresce (AULTON, 2005).

Para descrever o comportamento de fluxo dilatante foi utilizada a equação da lei da força, onde foi verificado que o valor de n (índice de fluxo) é maior que 1 (tabela 8) e aumenta a medida que a dilatância aumentar (LACHMAN; LIEBERMAN; KANIG, 2001).

Tabela 8. Valores de n obtidos das suspensões de nanopartículas placebo.

	ALG (mg/mL)	TPP (mg/mL)	$n^a \pm \text{DPR}^b$ (%)	
			pH 3,0	pH 5,0
QUI 0,9 mg/mL	0,8	0,5	1,02 ± 0,23	1,04 ± 0,34
		1,0	1,03 ± 0,31	1,06 ± 0,23
	1,6	0,5	1,08 ± 0,25	1,11 ± 0,12
		1,0	1,08 ± 0,23	1,18 ± 0,32
QUI 1,2 mg/mL	0,8	0,5	1,08 ± 0,13	1,12 ± 0,38
		1,0	1,09 ± 0,41	1,13 ± 0,31
	1,6	0,5	1,14 ± 0,12	1,16 ± 0,27
		1,0	1,20 ± 0,19	1,26 ± 0,16

^amédia de três determinações; ^bdesvio padrão relativo

Através da tabela 8 pode ser observado que o valor de n aumentou com o incremento da concentração de polieletrólitos e do pH da solução de QUI. Isto ocorre em função da formação de complexos insolúveis, o que ocasiona menor mobilidade às cadeias individuais e o comportamento não-newtoniano é mais pronunciado, com maior valor de n (CHO, 2006; HWANG & SHIN, 2000).

Além disso, o valor de viscosidade obtido no ponto de máximo cisalhamento (238 s^{-1}) foi utilizado como forma de atribuir um valor médio de viscosidade aparente para cada formulação. Na figura 17 podem ser visualizados os valores médios de viscosidade aparente (cP)

das suspensões de nanopartículas formuladas com soluções de QUI nas concentrações de 0,9 e 1,2 mg/mL em pH 3,0 e 5,0; TPP nas concentrações de 0,5 e 1,0 mg/mL e ALG na concentração de 0,8 mg/mL, enquanto que na figura 18 estão os resultados das formulações obtidas com ALG 1,6 mg/mL.

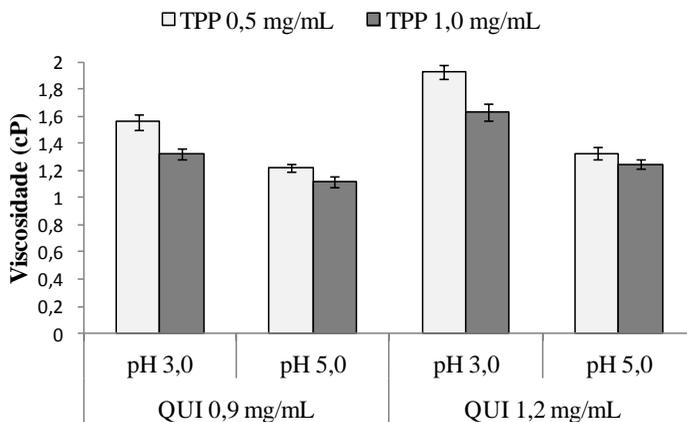


Figura 17. Viscosidade aparente (238 s^{-1}) das suspensões de nanopartículas placebo obtidas com ALG 0,8 mg/mL.

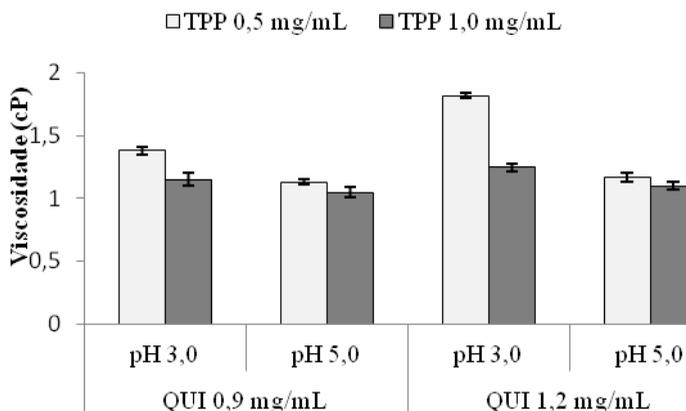


Figura 18. Viscosidade aparente (238 s^{-1}) das suspensões de nanopartículas placebo obtidas com ALG 1,6 mg/mL.

De acordo com as figuras 17 e 18, o aumento da concentração de QUI resultou em um aumento na viscosidade, como já observado por Mucha (1997) e Sui, Jaber, Schlenoff (2006).

Por outro lado, foi observada uma diminuição significativa da viscosidade das suspensões de nanopartículas ($p \leq 0,05$), causada por três fatores:

1. aumento da concentração de TPP
2. aumento da concentração de ALG
3. aumento do pH da solução de QUI

Este resultado está relacionado ao efeito “eletroviscoso” de polieletrólitos diluídos, que resulta da expansão espacial do volume hidrodinâmico das moléculas de polieletrólitos. Esta expansão ocorre devido a repulsão eletrostática causada pelos segmentos carregados subsequente a diluição da camada de contra-íons que envolve as moléculas. Nestas condições a adição de um polieletrólito com carga contrária diminui a repulsão intramolecular, ocasionando uma estrutura mais compacta. Este fenômeno pode ser visualizado através da diminuição da viscosidade da suspensão contendo o complexo de polieletrólitos (BURCKBUCHLER et al., 2006; COPPI & IANNUCELLI 2009; FERNANDES et al., 2005; LEE; PARK; HA, 1997; VOETS; KEIZER; STUART, 2009; ZHONG et al., 2010). O efeito “eletroviscoso” também observado por Rossi e colaboradores (2000) que, estudando a complexação entre QUI e mucina, concluíram que o menor valor de viscosidade foi indicativo de uma interação quase completa entre os polieletrólitos. Ao aumentar a concentração de mucina os autores observaram um aumento na viscosidade devido a um excesso de mucina não complexada.

Desta forma, como já descrito nos resultados anteriores, o uso de maiores concentrações de TPP e ALG, assim como o uso da QUI em pH 5,0, proporcionaram uma maior complexação entre os polieletrólitos, visualizada através de uma diminuição da viscosidade e aumento na dilatância (valor de n).

3.1.7 Morfologia

Finalizando a caracterização das nanopartículas sem fármaco (placebo), foi selecionada a formulação obtida com QUI (0,9 mg/mL) em pH 5,0, ALG (1,6 mg/mL) e TPP (1,0 mg/mL) para realização da análise morfológica. Na figura 19 pode ser visualizada a fotomicrografia da nanopartícula, obtida por microscopia eletrônica de transmissão (MET).

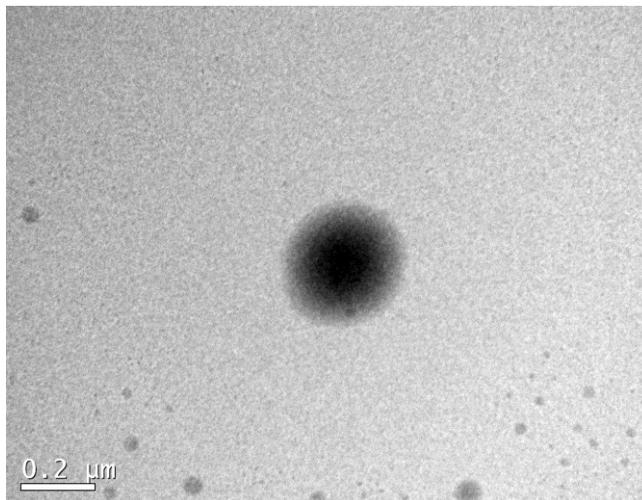


Figura 19. Fotomicrografia obtida por MET de nanopartículas de QUI-ALG-TPP placebo.

A nanopartícula visualizada é esférica, caracterizada por um núcleo compacto cercado por uma coroa com coloração menos intensa, provavelmente devido à menor densidade da superfície da partícula.

O tamanho da partícula observado por MET é menor do que o obtido na análise por espalhamento de luz. Isto foi observado por outros autores e pode estar relacionado a uma contração da partícula durante o processo de secagem na *grid* de análise (CHUAH et al., 2009).

3.2 INCORPORAÇÃO DE FÁRMACOS NAS NANOPARTÍCULAS

Através da caracterização físico-química das nanopartículas sem fármaco (placebo) foi possível estabelecer as concentrações ideais de cada componente para formação de complexos de polieletrólitos. A formulação preparada com 0,9 mg/mL de QUI, 1,6 mg/mL de ALG e 1,0 mg/mL de TPP foi a que apresentou melhores resultados. Entretanto, a adição de fármacos ao sistema resulta em novas formas de interações, pois os próprios fármacos, quando ionizados, contêm cargas superficiais que podem interferir na formação do complexo.

Teoricamente, fármacos contendo grupamentos COO^- podem interagir com os grupamentos NH_3^+ da QUI formando complexos, sendo que a presença de outros polieletrólitos poderia competir pelos sítios disponíveis da QUI, diminuindo a eficiência de encapsulação (XU et al.,

2003). Por outro lado, de acordo com Yu e colaboradores (2009), a interação do fármaco com a QUI pode ser reforçada através da adição de outros polieletrólitos, como alginato ou pectina. Para avaliar se existe uma competição entre os fármacos e o ALG pelos sítios N^+ da QUI, nesta etapa do trabalho as formulações foram testadas com ALG e TPP ou somente com TPP.

Os fármacos (ácido glicirrízico, ácido salicílico e cafeína) foram adicionados às soluções de QUI sob agitação, sendo em seguida adicionada a fase contendo somente TPP ou TPP e ALG, dependendo da formulação. Esta metodologia de preparo foi escolhida após testes preliminares e extensa revisão de literatura. De acordo com Avadi e colaboradores (2010), esta técnica permite a rápida formação de nanopartículas e o fármaco é aprisionado por uma rede polimérica, evitando sua difusão para o meio.

Primeiramente foi analisado o grau de agregação das nanopartículas formadas, tendo sido observado que o uso de 1,6 mg/mL de ALG ocasionou a agregação e precipitação em todas as formulações. Isto pode estar relacionado com a presença de fármaco no sistema ocupando os sítios N^+ da QUI, levando a um excesso de ALG não complexado. Assim, a concentração de ALG foi reduzida para 1,2 mg/mL onde foram obtidas suspensões opalescentes.

A seguir foi realizado o desenvolvimento e a validação dos métodos analíticos utilizados para quantificar os fármacos e determinar a eficiência de encapsulação, o teor de fármaco e a recuperação nas suspensões de nanopartículas.

3.2.1 Desenvolvimento e validação dos métodos analíticos (CLAE) utilizados para quantificação dos fármacos

3.2.1.1 Desenvolvimento do método para quantificação do ácido glicirrízico

O ácido glicirrízico (AG) é um ácido fraco com três valores de pK_a ($pK_{a1} = 2,7$; $pK_{a2} = 2,8$; $pK_{a3} = 4,7$) (SHEN, et al., 2007; SUN et al., 2007). Assim, é um composto altamente ionizável que tende a apresentar caudas pronunciadas, coeluição e ser pouco retido em fase reversa, pois a forma ionizada tem maior afinidade pela fase móvel (mais polar). Desta forma, várias condições cromatográficas foram propostas para que apenas uma das formas da substância estivesse presente no momento da análise, na tentativa de obter uma melhor assimetria e pureza do pico. Isto foi alcançado através da cromatografia com formação de pares de íons, onde o analito foi mantido na forma

iónica, e um contra-íon (tetrabutilamônio) foi adicionado à fase móvel. A melhor assimetria foi obtida com uma fase móvel contendo metanol, tampão fosfato de potássio 25,0 mM (pH 5,8) e tetrabutil amônio 5,0 mM.

Nas condições otimizadas, o tempo de retenção do AG foi cerca de 20,0 min, e um cromatograma típico obtido pelo método pode ser visualizado na figura 20 (a).

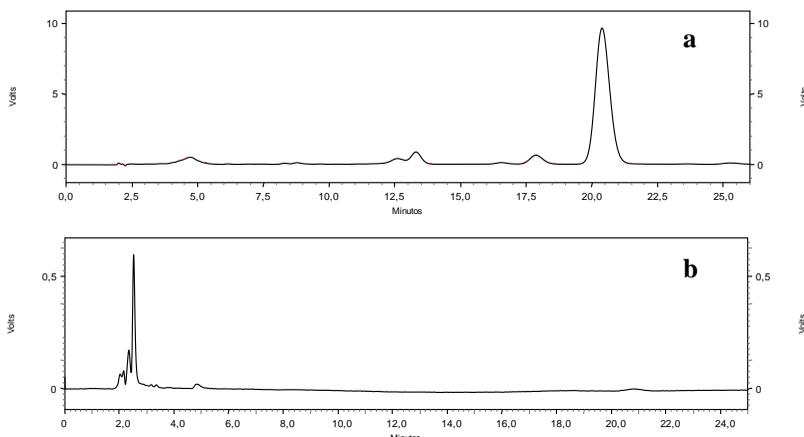


Figura 20. Cromatogramas obtidos utilizando fase móvel constituída por metanol:tampão fosfato de potássio 25,0 mM (60:40 v/v) adicionada de 5,0 mM de tetrabutilamônio de sódio sob fluxo de 1,2 mL/min e detecção UV a 254 nm. **(a)** Suspensão de nanopartículas de ácido glicirrízico; **(b)** Suspensão de nanopartículas placebo.

Os resultados da conformidade do sistema estão descritos na tabela 9 e mostram que o sistema e o procedimento são capazes de gerar dados confiáveis.

Tabela 9. Resultados do teste de conformidade do sistema

<i>Parâmetro</i>	<i>Mínimo</i>	<i>Máximo</i>	<i>DPR^a</i> (%)	Resultado
Assimetria	1,14	1,15	0,11	Conforme
Pratos teóricos	6080	6409	2,11	Conforme
Tempo de retenção	19,085	19,840	1,56	Conforme
Área	558007	561031	0,21	Conforme

3.2.1.1.1 Validação do método

3.2.1.1.1.1 Especificidade

Os cromatogramas da solução amostra **(a)** da solução placebo **(b)** estão apresentados na figura 20 e mostram que não houve interferência ou sobreposição dos excipientes com o pico do AG. Adicionalmente, a especificidade foi confirmada através detector de arranjo de fotiodos, que demonstrou que o pico do AG não possui coeluição de nenhum pico adicional, com valor de pureza do pico de 1,4 %.

3.2.1.1.1.2 Linearidade, e Limites de Detecção (LD) e Quantificação (LQ)

A linearidade da resposta do detector foi calculada para várias soluções padrão na faixa de 5,0 – 100,0 µg/mL. A equação obtida a partir da reta foi $y = 7511,6x - 6284,8$ e o coeficiente de correlação (R^2) igual a 1,0, indicando a linearidade da curva de calibração (figura 21). A validade do ensaio foi confirmada por análise de variância, ANOVA ($F_{\text{calculado}} = 210433 > F_{\text{crítico}} = 1,3 \times 10^{-10}$; $p \leq 0,05$).

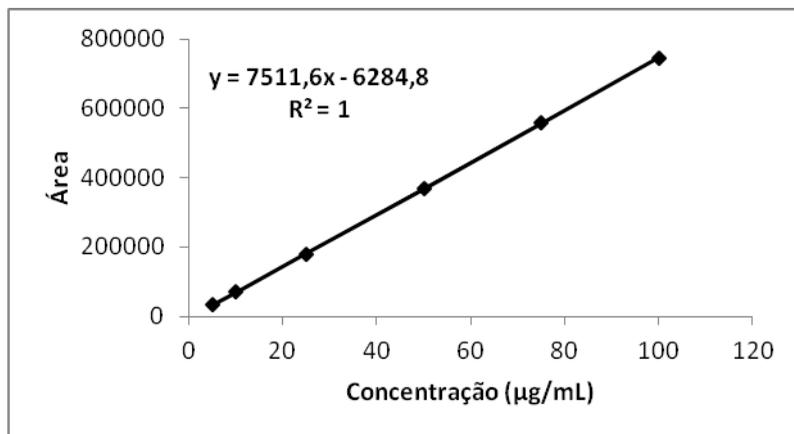


Figura 21. Curva de calibração média do ácido glicirrízico obtida por CLAE, com sua respectiva equação da reta e coeficiente de correlação (R^2).

Considerando-se que o coeficiente de correlação pode não ser suficiente para garantir a adequação do ajuste linear à curva de calibração, outras estratégias podem ser utilizadas, como a análise dos resíduos, definida como a diferença entre os valores das áreas dos picos calculados e os encontrados experimentalmente. Um gráfico de

concentração versus resíduo deve apresentar pontos que variam em torno do eixo das abscissas para descartar a presença de tendência dos resultados.

O gráfico de resíduos apresentou uma distribuição adequada e homogênea dos pontos em torno do eixo das abscissas (figura 22) provando que a metodologia de CLAE utilizada mostrou-se satisfatória na faixa de concentração analisada.

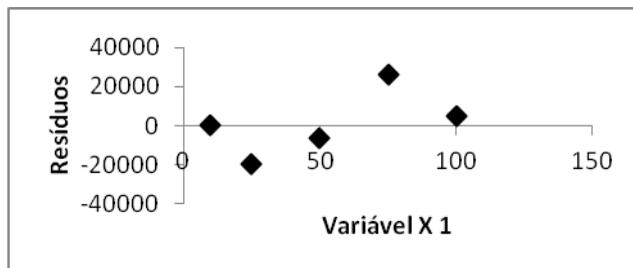


Figura 22. Análise dos resíduos da curva de calibração do ácido glicirrízico obtida por CLAE.

O LQ e LD calculados a partir das curvas obtidas foram 1,18 $\mu\text{g/mL}$ e 0,39 $\mu\text{g/mL}$, os quais foram confirmados experimentalmente (dados não mostrados), indicando a alta sensibilidade do método.

3.2.1.1.1.3 Exatidão e Precisão

A exatidão foi calculada a partir da determinação de três replicatas de três diferentes suspensões de nanopartículas placebo contaminadas com AG. Não foram observadas diferenças significativas entre a quantidade de AG adicionado e a quantidade encontrada ($p \leq 0,05$). Os valores obtidos estão dentro da faixa de 98,25 – 101,87 % (tabela 2), satisfazendo os critérios do estudo.

Os resultados da precisão intra-dia e inter-dia estão descritos na tabela 10. O teor de AG encontrado nos três diferentes dias foi equivalente ($p \leq 0,05$), e o desvio padrão relativo está dentro do critério de aceitação de 2 %.

Tabela 10. Resultados dos ensaios de precisão e exatidão do método de quantificação de ácido glicirrízico.

Precisão Inter-dia	% Recuperado	DPR^a (%)
Dia 1 (n = 6)	99,82	0,92
Dia 2 (n = 6)	98,19	0,52
Dia 3 (n = 6)	98,93	0,65
Precisão Intra-dia (n = 18)	98,96	1,78
Exatidão (n = 3)		
Concentração adicionada (µg/mL)	Concentração média encontrada (µg/mL)	Recuperação (%) (DPR %)^a
40,0	40,75	101,87 (1,21)
50,0	49,22	98,44 (0,62)
60,0	58,95	98,25 (0,59)

^a Desvio padrão relativo

3.2.1.1.1.4 Robustez

Os resultados e a faixa experimental das variáveis estudadas estão descritos na tabela 11. Não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas nos teores de AG nas condições testadas ($p \leq 0,05$) e o desvio padrão relativo está dentro do critério de aceitação de 2 %. As variações na fase móvel resultaram em mudanças no tempo de retenção sem nenhum efeito na quantificação do fármaco.

Tabela 11. Condições cromatográficas e faixa investigada durante o teste de robustez do método do ácido glicirrízico.

Variável	Faixa investigada	Teor AG^a (%)	DPR^b (%)
Fluxo (mL/min)	1,1	100,90	1,30
	1,2	101,43	1,23
	1,3	98,31	1,91
Temperatura da coluna (°C)	20	101,70	0,86
	25	100,12	0,75
	30	99,68	0,90
% metanol	58	99,91	1,98
	60	102,14	1,33
	62	101,90	1,51

^a Média de três replicatas

^b Desvio padrão relativo de cada variável

3.2.1.2 Desenvolvimento do método para quantificação do ácido salicílico

O ácido salicílico (AS) é um ácido fraco com valor de pK_a próximo a 3,0 sendo necessário uma análise cuidadosa das condições cromatográficas de forma que no momento da análise ele esteja em sua forma não-ionizada (SHOU et al., 2009). O ajuste do pH da fase móvel para 2,6 foi suficiente para a obtenção de uma boa assimetria de pico, com um tempo de retenção de cerca de 5,1 min. Na figura 23 pode ser visualizado um cromatograma típico obtido pelo método desenvolvido.

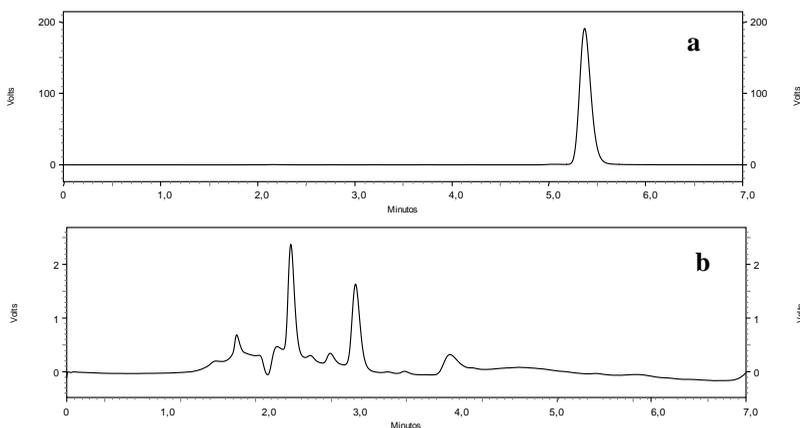


Figura 23. Cromatogramas obtidos utilizando fase móvel constituída por metanol:água (70:30 v/v) pH 2,6 sob fluxo de 1,0 mL/min e detecção UV a 237 nm. **(a)** Suspensão de nanopartículas de ácido salicílico; **(b)** Suspensão de nanopartículas placebo.

Os resultados da conformidade do sistema estão descritos na tabela 12 e mostram que o sistema e o procedimento são capazes de gerar dados confiáveis.

Tabela 12. Resultados do teste de conformidade do sistema

<i>Parâmetro</i>	<i>Mínimo</i>	<i>Máximo</i>	<i>DPR^a</i> (%)	Resultado
Assimetria	1,23	1,23	0,09	Conforme
Pratos teóricos	38535	39753	1,32	Conforme
Tempo de retenção	5,368	5,374	0,06	Conforme
Área	1567745	1584838	0,46	Conforme

3.2.1.2.1 Validação do método

3.2.1.2.1.1 Especificidade

Os cromatogramas da solução amostra **(a)** da solução placebo **(b)** estão apresentados na figura 23 e mostram que não houve interferência ou sobreposição dos excipientes com o pico do AS. Adicionalmente, a especificidade foi confirmada através detector de arranjo de fotodiodos, que demonstrou que o pico do AS não possui coeluição de nenhum pico adicional, com valor de pureza do pico de 1,1 %.

3.2.1.2.1.2 Linearidade, e Limites de Detecção (LD) e Quantificação (LQ)

A linearidade da resposta do detector foi calculada para várias soluções padrão na faixa de 5,0 – 100,0 µg/mL. A equação obtida a partir da reta foi $y = 67628x - 43533$ e o coeficiente de correlação (R^2) igual a 0,9999, indicando a linearidade da curva de calibração (figura 24). A validade do ensaio foi confirmada por análise de variância, ANOVA ($F_{\text{calculado}} = 36724 > F_{\text{crítico}} = 4,4 \times 10^{-9}; p \leq 0,05$).

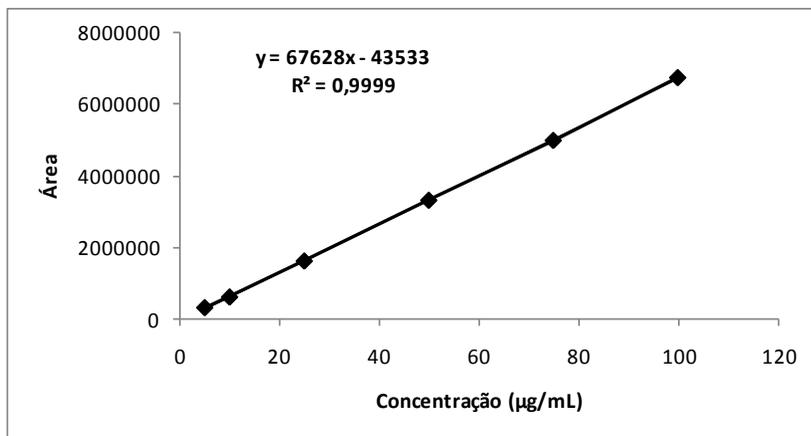


Figura 24. Curva de calibração média do ácido salicílico obtida por CLAE, com sua respectiva equação da reta e coeficiente de correlação (R^2).

A análise de resíduos apresentou uma distribuição adequada e homogênea para os níveis de concentrações utilizados (figura 25).

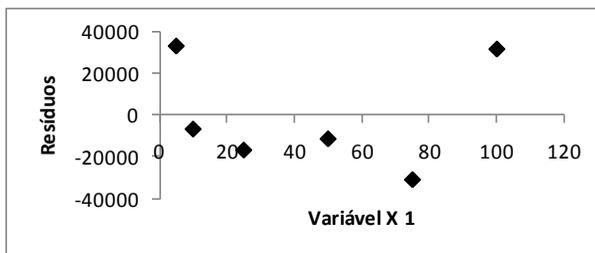


Figura 25. Análise dos resíduos da curva de calibração do ácido salicílico obtida por CLAE.

O LQ e LD calculados a partir das curvas obtidas foram 4,03 $\mu\text{g/mL}$ e 1,33 $\mu\text{g/mL}$, os quais foram confirmados experimentalmente (dados não mostrados), indicando a alta sensibilidade do método.

3.2.1.2.1.3 Exatidão e Precisão

A exatidão foi calculada a partir da determinação de três replicatas de três diferentes suspensões de nanopartículas placebo contaminadas com AS. Não foram observadas diferenças significativas entre a quantidade de AS adicionado e a quantidade encontrada ($p \leq 0,05$). Os valores obtidos estão dentro da faixa de 101,07 – 102,0 % (tabela 5), satisfazendo os critérios do estudo.

Os resultados da precisão intra-dia e inter-dia estão descritos na tabela 13. O teor de AS encontrado nos três diferentes dias foi equivalente ($p \leq 0,05$) e o desvio padrão relativo está dentro do critério de aceitação de 2 %.

Tabela 13. Resultados dos ensaios de precisão e exatidão do método de quantificação de ácido salicílico.

<i>Precisão Inter-dia</i>	<i>% Recuperado</i>	<i>DPR^a (%)</i>
Dia 1 ($n = 6$)	98,53	0,92
Dia 2 ($n = 6$)	99,32	0,35
Dia 3 ($n = 6$)	100,24	0,37
Precisão Intra-dia ($n = 18$)	100,14	1,45
Exatidão ($n = 3$)		
Concentração adicionada ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração média encontrada ($\mu\text{g/mL}$)	Recuperação (%) (DPR %)^a
40,0	40,43	101,07 (0,72)
50,0	51,0	102,0 (0,64)
60,0	60,72	101,2 (0,57)

^a Desvio padrão relativo

3.2.1.2.1.4 Robustez

Os resultados e a faixa experimental das variáveis estudadas estão descritos na tabela 14. Não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas nos teores de AS encontrados nas condições testadas ($p \leq 0,05$) e o desvio padrão relativo está dentro do critério de aceitação de 2 %. As variações na fase móvel resultaram em mudanças no tempo de retenção sem nenhum efeito na quantificação do fármaco.

Tabela 14. Condições cromatográficas e faixa investigada durante o teste de robustez do método do ácido salicílico.

Variável	Faixa investigada	Teor AS ^a (%)	DPR ^b (%)
Fluxo (mL/min)	0,8	101,20	1,23
	1,0	101,46	1,02
	1,2	100,41	1,32
Temperatura da coluna (°C)	20	99,80	0,39
	25	100,97	0,45
	30	98,9	0,21
% metanol	68	97,83	0,44
	70	101,24	0,73
	72	100,55	0,76

^a Média de três replicatas

^b Desvio padrão relativo

3.2.1.3 Desenvolvimento do método para quantificação da cafeína

A cafeína (CF) é uma base fraca que apresenta valor de pK_a próximo de 8,5. Inicialmente o método foi desenvolvido com uma coluna C_{18} e a fase móvel foi ajustada para vários valores de pH. Entretanto, o pico do fármaco apresentou uma cauda em todas as proporções de solventes e pHs da fase móvel testados. De acordo com Barbas e colaboradores (2000), por ser uma base fraca, a cafeína pode apresentar uma interação com os grupamentos silanóis residuais da superfície da sílica da fase estacionária, levando à formação de cauda. Algumas alternativas para evitar que isto ocorra são reduzir a ionização dos grupamentos silanóis utilizando fase móvel com $pH < 4,0$, ou diminuir a ionização do analito básico através do aumento do pH da fase móvel. Por outro lado, podem ser adicionados à fase móvel os chamados “bloqueadores de silanol” como, por exemplo, a trietilamina. Além disso, o uso de uma coluna de fase reversa C_8 acarreta menor atividade

dos grupamentos silanóis. Desta forma, as condições cromatográficas inicialmente propostas foram otimizadas utilizando uma coluna C_8 e trietilamina para o ajuste do pH da fase aquosa em 2,8. Nestas condições a cafeína encontra-se na forma não-ionizada e os grupamentos silanóis estão bloqueados, eliminando a cauda do pico. O tempo de retenção obtido para a cafeína foi de 4,4 min. Na figura 26 pode ser visualizado um cromatograma típico obtido pelo método desenvolvido.

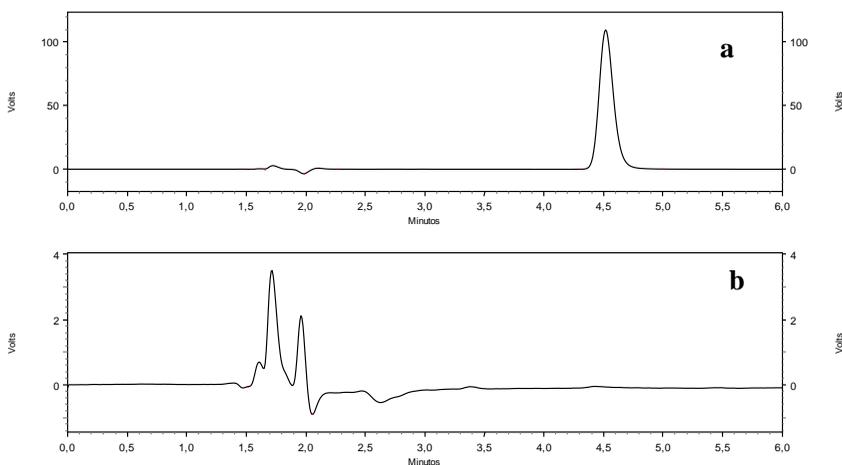


Figura 26. Cromatogramas obtidos utilizando fase móvel constituída por H_3PO_4 0,01 M (ajustado a pH 2,8 com trietilamina):acetonitrila (90:10 v/v) sob fluxo de 1,0 mL/min e detecção UV a 262 nm. **(a)** Suspensão de nanopartículas de cafeína; **(b)** Suspensão de nanopartículas placebo.

Os resultados da conformidade do sistema estão descritos na tabela 15 e mostram que o sistema e o procedimento são capazes de gerar dados confiáveis.

Tabela 15. Resultados do teste de conformidade do sistema

<i>Parâmetro</i>	<i>Mínimo</i>	<i>Máximo</i>	<i>DPR^a</i> (%)	Resultado
Assimetria	1,21	1,21	0,11	Conforme
Pratos teóricos	6469	6571	0,56	Conforme
Tempo de retenção	4,478	4,498	0,19	Conforme
Área	910543	937612	1,10	Conforme

3.2.1.3.1 Validação do método

3.2.1.3.1.1 Especificidade

Os cromatogramas da solução amostra **(a)** da solução placebo **(b)** estão apresentados na figura 26 e mostram que não houve interferência ou sobreposição dos excipientes com o pico da CF. Adicionalmente, a especificidade foi confirmada através detector de arranjo de fotodiodos, que demonstrou que o pico da CF não possui coeluição de nenhum pico adicional, com valor de pureza do pico de 1,1 %.

3.2.1.3.1.2 Linearidade, e Limites de Detecção (LD) e Quantificação (LQ)

A linearidade da resposta do detector foi calculada para várias soluções padrão na faixa de 5,0 – 100,0 µg/mL. A equação obtida a partir da reta foi $y = 37788x + 23000$ e o coeficiente de correlação (R^2) igual a 0,9999, indicando a linearidade da curva de calibração (figura 27). A validade do ensaio foi confirmada por análise de variância, ANOVA ($F_{\text{calculado}} = 29163 > F_{\text{crítico}} = 7,05 \times 10^{-7}; p \leq 0,05$).

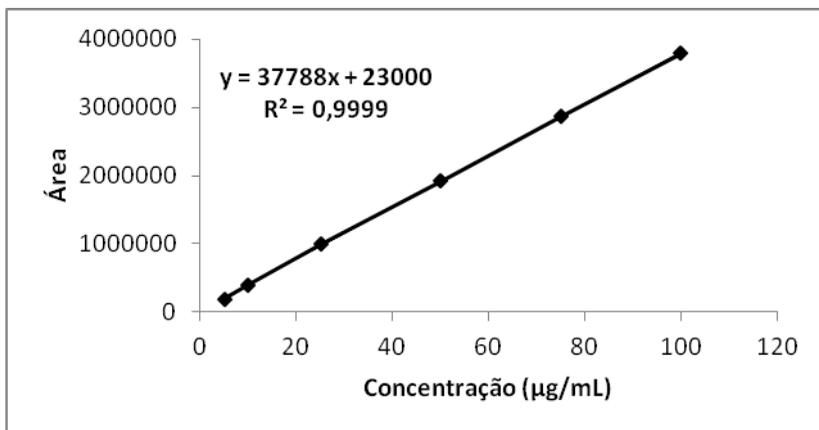


Figura 27. Curva de calibração média da cafeína obtida por CLAE, com sua respectiva equação da reta e coeficiente de correlação (R^2).

A análise de resíduos apresentou uma distribuição adequada e homogênea para os níveis de concentrações utilizados (figura 28).

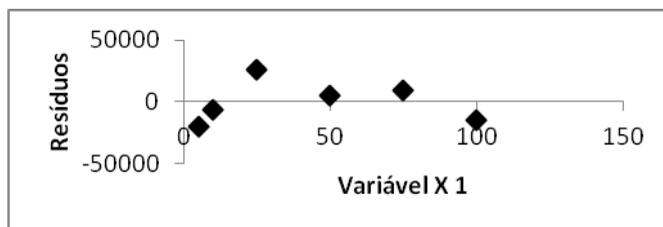


Figura 28. Análise dos resíduos da curva de calibração da cafeína obtida por CLAE.

O LQ e LD calculados a partir das curvas obtidas foram 0,21 $\mu\text{g/mL}$ e 0,07 $\mu\text{g/mL}$, os quais foram confirmados experimentalmente (dados não mostrados), indicando a alta sensibilidade do método.

3.2.1.3.1.3 Exatidão e Precisão

A exatidão foi calculada a partir da determinação de três replicatas de três diferentes suspensões de nanopartículas placebo contaminadas com CF. Não foram observadas diferenças significativas entre a quantidade de CF adicionada e a quantidade encontrada ($p < 0,05$). Os valores obtidos estão dentro da faixa de 100,50 – 101,60 % (tabela 8), satisfazendo os critérios do estudo.

Os resultados da precisão intra-dia e inter-dia estão descritos na tabela 16. O teor de CF encontrado nos três diferentes dias foi equivalente ($p \leq 0,05$) e o desvio padrão relativo está dentro do critério de aceitação de 2 %.

Tabela 16. Resultados dos ensaios de precisão e exatidão do método de quantificação de cafeína.

Precisão Inter-dia	% Recuperado	DPR^a (%)
Dia 1 ($n = 6$)	101,90	1,15
Dia 2 ($n = 6$)	99,91	1,07
Dia 3 ($n = 6$)	99,42	1,20
Precisão Intra-dia ($n = 18$)	101,83	1,90
Exatidão ($n = 3$)	Concentração média encontrada ($\mu\text{g/mL}$)	Recuperação (%) (DPR %)^a
Concentração adicionada ($\mu\text{g/mL}$)		
40,0	40,20	100,50 (1,24)
50,0	50,59	101,18 (0,91)
60,0	60,98	101,60 (0,43)

^a Desvio padrão relativo

3.2.1.3.1.4 Robustez

Os resultados e a faixa experimental das variáveis estudadas estão descritos na tabela 17. Não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas nos teores da CF encontrados nas condições testadas ($p \leq 0,05$) e o desvio padrão relativo está dentro do critério de aceitação de 2 %. As variações na fase móvel resultaram em mudanças no tempo de retenção sem nenhum efeito na quantificação do fármaco.

Tabela 17. Condições cromatográficas e faixa investigada durante o teste de robustez do método da cafeína.

Variável	Faixa investigada	Teor CF ^a (%)	DPR ^b (%)
Fluxo (mL/min)	0,8	100,40	0,73
	1,0	100,75	0,82
	1,2	101,21	0,42
Temperatura da coluna (°C)	20	100,91	0,18
	25	101,02	0,16
	30	100,80	0,25
% acetonitrila	08	99,95	0,63
	10	100,14	0,41
	12	100,40	0,65

^a Média de três replicatas

^b Desvio padrão relativo

3.2.2 Determinação da eficiência de encapsulação e do teor de fármaco nas suspensões de nanopartículas

Para avaliar a eficiência de encapsulação (EE %) e a necessidade de incorporar outro polieletrólito (ALG) ou reticulante (TPP) para complementar a formação de complexos, foram desenvolvidas diferentes formulações de acordo com o peso molecular e a densidade de cargas superficiais de cada fármaco. A influência do pH foi analisada utilizando soluções de QUI (0,9 mg/mL) com valores de pH ajustados para 3,0 e 5,0.

3.2.2.1 Determinação da eficiência de encapsulação e do teor de ácido glicirrízico

O ácido glicirrízico (AG) possui alta massa molar e alta densidade de carga negativa. A análise em triplicata de uma solução de

AG (1,0 mg/mL) resultou em um valor de potencial zeta médio de $-66 \text{ mV} \pm 2,2 \%$.

Neste estudo foram desenvolvidas um total de 6 formulações contendo AG (1,0 mg/mL), variando a presença de TPP e ALG, a concentração de TPP e o pH da solução de QUI, conforme descrito na tabela 18.

Tabela 18. Composição das formulações de suspensões de nanopartículas contendo ácido glicirrízico.

Formulação ^a	TPP (mg/mL)	ALG (mg/mL)	Volume final (mL)
AG 1 _{pH 3,0; pH 5,0}	---	---	30,0
AG 2 _{pH 3,0; pH 5,0}	5,0	---	31,0
AG 3 _{pH 3,0; pH 5,0}	1,0	1,2	36,0

^aFormulações preparadas em triplicata com AG (1,0 mg/mL)

_{pH 3,0}: Formulação preparada com solução de QUI (0,9 mg/mL) em pH 3,0

_{pH 5,0}: Formulação preparada com solução de QUI (0,9 mg/mL) em pH 5,0

As formulações foram preparadas conforme metodologia descrita no item 2.1 e submetidas à análise por cromatografia líquida de alta eficiência utilizando método validado descrito no item 2.3.1.1 para determinação da eficiência de encapsulação, teor e recuperação (tabela 19).

Tabela 19. Resultados de eficiência de encapsulação (EE %), teor ($\mu\text{g/mL}$) e recuperação (%) obtidos com as formulações contendo ácido glicirrízico.

		Formulação		
		AG 1	AG 2	AG 3
EE ^a (%) \pm	pH 3,0	1,3 \pm 9,5	70,2 \pm 2,8	71,0 \pm 3,1
DPR ^b (%)	pH 5,0	43,1 \pm 5,1	81,4 \pm 2,6	96,4 \pm 1,7
Teor ^a ($\mu\text{g/mL}$)	pH 3,0	60,0 \pm 6,4	106,4 \pm 3,2	94,4 \pm 4,1
\pm DPR ^b (%)	pH 5,0	73,3 \pm 3,6	100,0 \pm 2,7	113,4 \pm 2,9
Recuperação ^a	pH 3,0	30,0 \pm 3,9	55,0 \pm 2,9	56,6 \pm 2,4
(%) \pm DPR ^b (%)	pH 5,0	36,6 \pm 3,8	51,6 \pm 2,8	68,1 \pm 2,5

^amédia de três determinações; ^bdesvio padrão relativo

As formulações preparadas em pH 5,0 apresentaram maior EE do que em pH 3,0. Em pH 5,0 ocorreu uma maior interação dos grupos COO^- do AG com os grupos N^+ da QUI. O AG apresenta três valores de pKa ($\text{pKa}1 = 2,7$; $\text{pKa}2 = 2,8$; $\text{pKa}3 = 4,7$) e, ao ser dissolvido em água no preparo da solução de 1,0 mg/mL estará ionizado. No momento da

adição à solução de QUI em pH 5,0 grande parte dos seus grupamentos carboxílicos continuará ionizado, favorecendo a interação com a QUI, o que pode explicar esta maior EE. Por outro lado, o mesmo não ocorre quando é adicionado à solução de QUI em pH 3,0, pois o pH próximo a dois valores de pK_a do AG diminui a ionização das suas cargas superficiais, diminuindo a interação e, conseqüentemente, a EE. Liu e Gao (2009) observaram este efeito do pH utilizando ciprofloxacino como fármaco modelo. O ciprofloxacino possui um grupo ácido carboxílico em sua molécula, que é gradualmente deprotonado com o aumento do pH, resultando em maior EE em pH 5,5.

Independentemente do pH, a ausência de ALG e TPP nas formulações (AG 1) levou a uma menor EE, o que indica que o fármaco não foi capaz de interagir satisfatoriamente com os sítios da QUI, contrariando estudos anteriores que obtiveram alta taxa de EE somente com a interação eletrostática entre AG e QUI (ZHENG et al., 2006). A formulação AG 2_{pH 5,0} que contém apenas TPP apresentou uma EE de 81,4 %, indicando que a adição de TPP resulta em uma reticulação das cadeias de QUI, encapsulando o fármaco de forma mais eficiente. Já a formulação AG 3_{pH 5,0}, que contém TPP e ALG, apresentou maior EE (96,4 %). Este resultado elimina a hipótese de que o ALG poderia competir com o fármaco pelos sítios positivos da QUI, pois o AG é adicionado primeiramente à solução de QUI, ligando-se aos sítios N^+ . Posteriormente, a adição de ALG ocupa os sítios restantes, aprisionando o fármaco dentro da partícula devido à formação de uma rede que é fortificada pela adição de TPP. Isto demonstra que além da interação eletrostática que ocorre entre o AG e a QUI, a encapsulação física causada pelo ALG e TPP possui um papel relevante na EE. Xu e colaboradores (2003) e Yu e colaboradores (2009) também observaram a encapsulação física provocada pelo ALG na formação de complexos com a QUI, comprovando a importância deste polieletrólito na formação das nanopartículas.

A taxa de recuperação indica quanto de fármaco adicionado na formulação foi recuperado após a formação do complexo. As formulações AG 2 e AG 3 apresentaram taxas de recuperação de fármaco entre 51,6 e 68,3 %, indicando que uma parte do que foi adicionado inicialmente não foi encontrado na suspensão final. Uma hipótese para esta baixa recuperação é que o AG em água está altamente ionizado, onde uma porção do fármaco pode ter precipitado ao ser adicionado à fase contendo QUI em pH mais baixo.

3.2.2.2 Determinação da eficiência de encapsulação e do teor de ácido salicílico

O ácido salicílico (AS) possui pequena massa molar e baixa densidade de carga superficial negativa. A análise em triplicata de uma solução de AS (1,0 mg/mL) resultou em um valor de potencial zeta médio de $-4,2 \text{ mV} \pm 3,1 \%$.

Neste trabalho foram desenvolvidas um total de 6 formulações contendo AS (1,0 mg/mL). Entretanto, não foram utilizadas as mesmas concentrações dos sistemas contendo AG. Como o AS possui menor peso molecular e apenas um grupo carboxílico em sua molécula, a possibilidade de ocorrer uma interação com a QUI sem a presença de TPP ou ALG é pequena. As formulações foram desenvolvidas de acordo com a tabela 20, utilizando soluções de QUI em pH 3,0 ou 5,0.

Tabela 20. Composição das formulações de suspensões de nanopartículas contendo ácido salicílico.

Formulação ^a	TPP (mg/mL)	ALG (mg/mL)	Volume final (mL)
AS 1 _{pH 3,0; pH 5,0}	5,0	---	31,0
AS 2 _{pH 3,0; pH 5,0}	10,0	---	32,0
AS 3 _{pH 3,0; pH 5,0}	1,0	1,2	36,0

^aFormulações preparadas em triplicata com AS (1,0 mg/mL)

pH 3,0: Formulação preparada com solução de QUI (0,9 mg/mL) em pH 3,0

pH 5,0: Formulação preparada com solução de QUI (0,9 mg/mL) em pH 5,0

As formulações foram preparadas conforme metodologia descrita no item 2.1 e submetidas à análise por cromatografia líquida de alta eficiência utilizando método validado descrito no item 2.3.1.2 para determinação da eficiência de encapsulação, teor e recuperação (tabela 21).

Tabela 21. Resultados de eficiência de encapsulação (EE %), teor ($\mu\text{g/mL}$) e recuperação (%) obtidos com as formulações contendo ácido salicílico.

		Formulação		
		AS 1	AS 2	AS 3
EE ^a (%) \pm DPR ^b (%)	pH 3,0	12,0 \pm 7,2	15,0 \pm 4,1	16,0 \pm 5,4
	pH 5,0	5,0 \pm 6,3	3,0 \pm 6,7	4,0 \pm 5,8
Teor ^a ($\mu\text{g/mL}$) \pm DPR ^b (%)	pH 3,0	183,9 \pm 6,3	181,2 \pm 3,6	161,1 \pm 4,8
	pH 5,0	187,1 \pm 5,4	184,3 \pm 4,7	163,9 \pm 4,6
Recuperação ^a (%) \pm DPR ^b (%)	pH 3,0	95,0 \pm 3,9	96,6 \pm 2,2	96,6 \pm 2,9
	pH 5,0	96,6 \pm 2,1	98,3 \pm 3,8	98,3 \pm 3,1

^amédia de três determinações; ^bdesvio padrão relativo

Apesar de possuir grupos carboxílicos disponíveis para interação, o AS apresentou baixa EE em todas as formulações testadas. Entretanto, as formulações mostraram um alto teor de fármaco, provavelmente porque o AS está dissolvido no meio e não está associado às nanopartículas.

Arica e colaboradores (2002) e Yu e colaboradores (2008) estudando a encapsulação de 5-fluoruracil em micropartículas de ALG/QUI/CaCl₂ concluíram que o peso molecular é fator determinante para EE. De acordo com os autores, a EE de fármacos com baixo peso molecular é menor devido à rápida difusão que pode ocorrer durante o processo de encapsulação. Outro fator determinante da EE foi o número de sítios carregados negativamente disponíveis para interação. O AS possui apenas um grupamento carboxílico em sua molécula, o que reflete em seu baixo valor de potencial zeta médio (-4,2 mV) antes da complexação. Consequentemente, a interação do AS com a QUI é mais fraca do que a do AG, que possui maior densidade de carga negativa.

Um fato interessante a ser analisado é que, diferentemente do AG, o AS apresentou maior EE em pH 3,0 do que em pH 5,0. Este resultado não era esperado, já que o AS possui pKa de 2,8, o que indica que está fracamente ionizado em pH 3,0. Boonsongrit, Mitrevej, e Mueller (2006) chegaram a um resultado semelhante em estudo utilizando AS e outros fármacos para um sistema de QUI e TPP. A EE de AS aumentou de 23 % para 77 % com a diminuição do pH de QUI. Segundo os autores, a interação iônica não foi a responsável pela formação de partículas, sendo a encapsulação física considerada como um possível mecanismo. Esta é causada pelo entrelaçamento das cadeias dos polieletrólitos, que podem aprisionar o fármaco fisicamente evitando a sua liberação imediata do sistema.

3.2.2.3 Determinação da eficiência de encapsulação e do teor de cafeína

A cafeína é uma base fraca com pequena massa molar e apresenta pKa de 8,3. Quando ionizada apresenta densidade de carga superficial positiva. A análise em triplicata de uma solução de CF (1,0 mg/mL) resultou em um valor de potencial zeta médio de +5,2 mV ± 3,1 %.

Na literatura são descritos trabalhos sobre a encapsulação de fármacos com carga superficial positiva em nanopartículas de QUI, como por exemplo, doxorubicina e carboplatina. Apesar dos fármacos não conseguirem complexar com a QUI através de interação eletrostática, devido à repulsão entre as cargas positivas de ambos, foram obtidas EE de até 30 %. Nestes casos, o principal mecanismo

envolvido foi a encapsulação física (JANES et al., 2001; PARVEEN et al., 2010).

Foram desenvolvidas um total de 4 formulações contendo CF (1,0 mg/mL). Como a CF apresenta carga superficial positiva, as formulações foram adaptadas buscando compreender o processo de encapsulação de um fármaco com estas características. As formulações foram desenvolvidas de acordo com a tabela 22, utilizando soluções de QUI em pH 3,0 ou 5,0.

Tabela 22. Composição das formulações de suspensões de nanopartículas contendo cafeína

Formulação^a	TPP (mg/mL)	ALG (mg/mL)	Volume final (mL)
CF 1_{pH 3,0; pH 5,0}	10,0	---	32,0
CF 2_{pH 3,0; pH 5,0}	5,0	1,2	36,0

^aFormulações preparadas em triplicata com CF (1,0 mg/mL)

_{pH 3,0}: Formulação preparada com solução de QUI (0,9 mg/mL) em pH 3,0

_{pH 5,0}: Formulação preparada com solução de QUI (0,9 mg/mL) em pH 5,0

As formulações foram preparadas conforme metodologia descrita no item 2.1 e submetidas à análise por cromatografia líquida de alta eficiência utilizando método validado descrito no item 2.3.1.3 para determinação da eficiência de encapsulação, teor e recuperação (tabela 23).

Tabela 23. Resultados de eficiência de encapsulação (EE %), teor ($\mu\text{g/mL}$) e recuperação (%) obtidos com as formulações contendo cafeína.

		Formulação	
		CF 1	CF 2
EE^a (%) \pm DPR^b (%)	pH 3,0	5,0 \pm 6,4	7,0 \pm 7,9
	pH 5,0	2,5 \pm 7,1	3,0 \pm 6,3
Teor^a ($\mu\text{g/mL}$) \pm DPR^b (%)	pH 3,0	181,2 \pm 5,2	161,1 \pm 5,8
	pH 5,0	178,1 \pm 6,1	163,9 \pm 5,3
Recuperação^a (%) \pm DPR^b (%)	pH 3,0	96,6 \pm 4,3	96,6 \pm 3,7
	pH 5,0	95,0 \pm 3,7	98,3 \pm 4,0

^amédia de três determinações; ^bdesvio padrão relativo

Neste trabalho todas as formulações testadas apresentaram EE menor que 10%, demonstrando que o sistema não foi capaz de encapsular fisicamente a CF. O fato de a CF ser solúvel em ácidos

diluídos sugere que ela possa estar solubilizada na fase externa do sistema, limitando a sua encapsulação.

4 CONCLUSÕES

A formulação contendo QUI 0,9 mg/mL (pH 5,0), ALG 1,6 mg/mL, e TPP 1,0 mg/mL, apresentou maior turbidez, com 48 % de transmitância e 451,9 kcps. Foi verificado que o tamanho das partículas depende da concentração de QUI, ALG e TPP, e do pH da solução de QUI. Partículas maiores foram obtidas com o aumento da concentração de polieletrólitos e em pH 3,0. Além disso, as nanopartículas preparadas em pH 3,0 apresentaram maior polidispersão, indicando que o pH 5,0 resulta em partículas mais homogêneas. O potencial zeta foi positivo, variando com a concentração e o pH. O aumento da concentração de QUI ocasiona um aumento do potencial zeta, enquanto o contrário ocorre ao aumentar a concentração de ALG e TPP. As suspensões de nanopartículas apresentaram características de fluido não-newtoniano dilatante. Ocorreu uma diminuição da viscosidade e aumento na dilatância com o uso de maiores concentrações de TPP e ALG, assim como o uso da QUI em pH 5,0. As nanopartículas são esféricas, caracterizadas por um núcleo compacto cercado por uma coroa com coloração menos intensa. Os métodos analíticos para quantificação dos fármacos nas nanopartículas foram desenvolvidos e validados com sucesso. O AS e a CF não foram eficientemente encapsulados nas nanopartículas. Por outro lado, o AG apresentou os melhores resultados de EE, teor, e recuperação, sendo o fármaco selecionado para os próximos estudos.

5 REFERÊNCIAS

AELENEI, N.; POPA, M. I.; NOVAC, O.; LISA, G.; BALAITA, L. Tannic acid incorporation in chitosan-based microparticles and in vitro controlled release. **Journal of Material Science: Materia Medica**, v. 20, p.1095–1102, 2009.

ALVES, P. M.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S. Semisolid topical formulations containing nimesulide-loaded nanocapsules, nanospheres or nanoemulsion: development and rheological characterization. **Pharmazie**, v. 60, n. 12, p. 900-4, 2005.

ANAL, A. K. & STEVENS, W. F. Chitosan–alginate multilayer beads for controlled release of ampicillin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 290, p. 45–54, 2005.

ARICA, B.; ALIS, S.; KAS, H.; SARGON, M.; HINCAL, A.A. 5-Fluorouracil encapsulated alginate beads for the treatment of breast cancer. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 242, p. 267–269, 2002.

AULTON, M.E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2 ed., São Paulo: Artmed, 2005. 677 p.

AVADI, M.R.; SADEGHI, A.M.; MOHAMMADPOUR, N.; ABEDIN, S.; ATYABI, F.; DINARVAND, R.; RAFIEE-TEHRANI, M. Preparation and characterization of insulin nanoparticles using chitosan and Arabic gum with ionic gelation method. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 6, p. 58–63, 2010.

BAO, H.; LIN, A.; LI, G.; ZHANG, H. Influence of cetyltrimethylammonium bromide on physicochemical properties and microstructures of chitosan–TPP nanoparticles in aqueous solutions. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 328, p. 270–277, 2008.

BARCK, K. & BUTLER, M. Comparison of Morphology and Properties of Polyelectrolyte Complex Particles Formed from Chitosan and Polyanionic Biopolymers. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 98, p. 1581–1593, 2005.

BECHERÁN-MARÓN, L.; PENICHE, C.; ARGÜELLES-MONAL, W. Study of the interpolyelectrolyte reaction between chitosan and alginate: influence of alginate composition and chitosan molecular weight. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 34, p. 127–133, 2004.

BEZERRIL, L. M.; VASCONCELOS, C. L.; DANTAS, T. N. C.; PEREIRA, M. R.; FONSECA, J. L. Rheology of chitosan-kaolin dispersions. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical Engineering Aspects**, v. 287, p. 24–28, 2006.

BODDOHI, S. & KIPPER, M. J. Engineering Nanoassemblies of Polysaccharides. **Advanced Materials**, v. 22, p. 2998–3016, 2010.

BOONSONGRIT, Y.; MITREVEJ, A.; MUELLER, B. Chitosan drug binding by ionic interaction. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 62, p. 267–274, 2006.

BRICEÑO, M.I. Rheology of suspensions and emulsions In: Nielloud F.; Marti-Mestres G (ed). **Pharmaceutical Emulsions and Suspensions**, New York, 2000, 854 p.

BURCKBUCHLER, V.; BOUTANT, V.; WINTGENS, V.; AMIEL, C. Macromolecular Assemblies Based on Coupled Inclusion Complex and Electrostatic Interactions. **Biomacromolecules**, v. 7, p. 2890–2900, 2006.

CALVO, P., REMUÑÁN-LÓPEZ, C., VILA-JATO, J.L., ALONSO, M.J. Development of positively charged colloidal drug carriers: Chitosan coated polyester nanocapsules and submicron-emulsions. **Colloidal Polymers Science**, v. 275, p. 46–53, 1997.

CHO, J.; HEUZEY, M.; BEGIN, A.; CARREAU, P.J. Viscoelastic properties of chitosan solutions: Effect of concentration and ionic strength. **Journal of Food Engineering**, v. 74, p. 500–515, 2006.

CHUAH, A.M.; KUROIWA, T.; ICHIKAWA, S.; KOBAYASHI, H.; NAKAJIMA, M. Formation of Biocompatible Nanoparticles via the Self-Assembly of Chitosan and Modified Lecithin. **Journal of Food Science**, v. 74, n. 1, p. 1–8, 2009.

COOK, M.T.; TZORTZIS, G.; CHARALAMPOPOULOS, D.; KHUTORYANSKIY, V.V. Production and Evaluation of Dry Alginate – Chitosan Microcapsules as an Enteric Delivery Vehicle for Probiotic Bacteria. **Biomacromolecules**, v. 12, n. 7, p. 2834-40, 2011.

COPPI, G. & IANNUCELLI, V. Alginate/chitosan microparticles for tamoxifen delivery to the lymphatic system. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 367, p. 127–132, 2009.

DAVIDENKO, N.; BLANCO, M.; PENICHE, C.; BECHERAN, L.; GUERRERO, S.; TEIJON, J. Effects of Different Parameters on the Characteristics of Chitosan–Poly(acrylic acid) Nanoparticles Obtained by the Method of Coacervation. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 111, p. 2362–2371, 2009.

DONATI, I.; BORGOGNA, M.; TURELLO, E.; CESARO, A.; PAOLETTI, S. Tuning Supramolecular Structuring at the Nanoscale Level: Nonstoichiometric Soluble Complexes in Dilute Mixed Solutions of Alginate and Lactose-Modified Chitosan (Chitlac). **Biomacromolecules**, v. 8, p. 1471-1479, 2007.

DOUGLAS, K.L.; CIRIACO, A.; PICCIRILLO, P.; TABRIZIAN, M. Effects of alginate inclusion on the vector properties of chitosan-based nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, v. 115, p. 354–361, 2006.

DROGOZ, A.; DAVID, L.; ROCHAS, C.; DOMARD, A.; DELAIR, T. Polyelectrolyte Complexes from Polysaccharides: Formation and Stoichiometry Monitoring. **Langmuir**, v. 23, p. 10950-10958, 2007.

DUCEL, V.; RICHARD, J.; SAULNIERA, P.; POPINEAUC, Y.; BOURY, F. Evidence and Characterization of Complex Coacervates Containing Plant Proteins: Application to the Microencapsulation of Oil Droplets. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 232, p. 239-247, 2006.

ESPINOSA-ANDREWS, H.; BAEZ-GONZA, J.; LEZ, CRUZ-SOSA, F.; VERNON-CARTER, J. Gum Arabic-Chitosan Complex Coacervation. **Biomacromolecules**, v. 8, p. 1313-1318, 2007.

FERNANDES, A. L. P.; MORAIS, W. A.; SANTOS, A. I. B.; DE ARAÚJO, A. M. L.; DOS SANTOS, D. E. S.; DOS SANTOS, D. S.; PAVINATTO, F. J.; OLIVEIRA, O. N.; DANTAS, T. N. C.; PEREIRA, M. R. The influence of oxidative degradation on the preparation of chitosan nanoparticles. **Colloid & Polymer Science**, v. 284, n. 1, p. 1-9, 2005.

GAN, Q. & WANG, T. Chitosan nanoparticle as protein delivery carrier—Systematic examination of fabrication conditions for efficient loading and release. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 59, p. 24–34, 2007.

GAN, Q.; WANG, T.; COCHRANE, C.; ALLEN, S.; MCCARRON, P. Modulation of surface charge , particle size and morphological properties of chitosan-TPP nanoparticles intended for gene delivery. **Journal of Colloid and Interface Science: B**, v. 44, p. 65–73, 2005.

GAZORI, T.; KHOSHAYAND, M.; AZIZI, I.; YAZDIZADE, P.; NOMANI, A.; HARIRIAN, I. Evaluation of Alginate/Chitosan nanoparticles as antisense delivery vector: Formulation, optimization and in vitro characterization. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, p. 599–606, 2009.

GOYCOOLEA, F.M.; LOLLO, G.; REMUNAN-LOPEZ, C.; QUAGLIA, F.; ALONSO, M.J. Chitosan-Alginate Blended Nanoparticles as Carriers for the Transmucosal Delivery of Macromolecules. **Biomacromolecules**, v. 10, p. 1736–1743, 2009.

GUTERRES, S.S.; ALVES, M.P.; POHLMANN, A.R. Polymeric nanoparticles, nanospheres and nanocapsules for cutaneous applications. **Drug Target Insights**, v. 2, p. 147–157, 2007.

HAMMAN, J. H. Chitosan Based Polyelectrolyte Complexes as Potential Carrier Materials in Drug Delivery Systems. **Marine Drugs**, v. 8, p. 1305-1322, 2010.

HARTIG, S. M.; GREENE, R. R.; DIKOV, M. M.; PROKOP, A.; DAVIDSON, J. M. Multifunctional Nanoparticulate Polyelectrolyte Complexes. **Pharmaceutical Research**, v. 24, n. 12, 2007.

HWANG, J.K. & SHIN, H.H. Rheological properties of chitosan solutions. **Korea-Australia Rheology Journal**, v. 12, n. 3/4, p. 175-179, 2000.

JANES, K.A.; FRESNEAU, M.P.; MARAZUELA, A.; FABRA, A.; ALONSO, M.J. Chitosan nanoparticles as delivery systems for doxorubicin. **Journal of Controlled Release**, v. 73, p. 243-255, 2001.

KALOTI, M. & BOHIDAR, H.B. Kinetics of coacervation transition versus nanoparticle formation in chitosan–sodium tripolyphosphate solutions. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 81, n. 1, p.165-73, 2010.

LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H. A.; KANIG, J. L. **Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica**. vol. 2. Lisboa: Fundação Calouste Gulbekian, 2001.

LEE, K. Y.; PARK, W.; HA, W. S. Polyelectrolyte Complexes of Sodium Alginate with Chitosan or Its Derivatives for Microcapsules. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 63, p. 425–432, 1997.

LIU, H. & GAO, C. Preparation and properties of ionically cross-linked chitosan nanoparticles. **Polymers for Advanced Technologies**, v. 20, p. 613–619, 2009.

LUCINDA-SILVA, R.M.; SALGADO, H.N.; EVANGELISTA, R.C. Alginate–chitosan systems: In vitro controlled release of triamcinolone and in vivo gastrointestinal transit. **Carbohydrate Polymers**, v. 81, p. 260–268, 2010.

MARTINS, G.V.; MANO, J.F.; ALVES, N.M. Nanostructured self-assembled films containing chitosan fabricated at neutral pH. **Carbohydrate Polymers**, v. 80, p. 570–573, 2010.

MUCHA, M. Rheological characteristics of semi-dilute chitosan solutions. **Macromolecular Chemistry and Physics**, v. 198, p. 471–484, 1997.

PAN, Y.; LI, Y. J.; ZHAO, H. Y.; HAO, J. S.; ZHENG, J. M. Formulation of Insulin-loaded Chitosan Nanoparticles: Influence of

Factors on Entrapment Efficiency. **Journal Chinese of Pharmaceutical Science**, v. 11, n. 3, p. 97–100, 2002.

PARVEEN, S.; MITRA, M.; KRISHNAKUMAR, S.; SAHOO, S.K. Enhanced antiproliferative activity of carboplatin-loaded chitosan–alginate nanoparticles in a retinoblastoma cell line. **Acta Biomaterialia**, v. 6, p. 3120–3131, 2010.

ROSSI, S.; FERRARI, F.; BONFERONI, M.C.; CARAMELLA, C. Characterization of chitosan hydrochloride–mucin interaction by means of viscosimetric and turbidimetric measurements. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 10, p. 251–257, 2000.

SAETHER, H.V.; HOLME, H.K.; MAURSTAD, G.; SMIDSRØD, O.; BJØRN, T.; STOKKE, H. Polyelectrolyte complex formation using alginate and chitosan. **Carbohydrate Polymers**, v. 74, p. 813–821, 2008.

SARMENTO, B.; FERREIRA, D.; VEIGA, B.; RIBEIRO, A. Characterization of insulin-loaded alginate nanoparticles produced by ionotropic pre-gelation through DSC and FTIR studies. **Carbohydrate Polymers**, v. 66, p. 1–7, 2006.

SHOVSKY, A.; VARGA, I.; MAKUSKA, R.; CLAEISSON, P. Formation and Stability of Water-Soluble, Molecular Polyelectrolyte Complexes: Effects of Charge Density, Mixing Ratio, and Polyelectrolyte Concentration. **Langmuir**, v. 25, p. 6113–6121, 2009.

SHU, S.; ZHANG, X.; TENG, D.; WANG, Z.; LI, C. Polyelectrolyte nanoparticles based on water-soluble chitosan–poly (L-aspartic acid)–polyethylene glycol for controlled protein release. **Carbohydrate Research**, v. 344, p. 1197–1204, 2009.

SIMSEK-EGE, F.A.; BOND, G.M.; STRINGER, J. Polyelectrolyte Complex Formation Between Alginate and Chitosan as a Function of pH. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 88, p. 346–351, 2003.

SUI, Z.; JABER, J.; SCHLENOFF, J.B. Polyelectrolyte Complexes with pH-Tunable Solubility. **Macromolecules**, v. 39, p. 8145–8152, 2006.

SUN, W.; MAO, S.; MEI, D.; KISSEL, T. Self-assembled polyelectrolyte nanocomplexes between chitosan derivatives and

enoxaparin. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 69, p. 417–425, 2008.

TAKKA, S. & GÜREL, A. Evaluation of Chitosan/Alginate Beads Using Experimental Design: Formulation and In Vitro Characterization. **AAPS PharmSciTech**, v. 11, n. 1, p. 460-466, 2010.

TIYABOONCHAI, W. & LIMPEANCHOB, N. Formulation and characterization of amphotericin B–chitosan–dextran sulfate nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 329, p. 142–149, 2007.

TSAI, M.; CHEN, R.; BAI, S.; CHEN, W. The storage stability of chitosan/tripolyphosphate nanoparticles in a phosphate buffer. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, p. 756-761, 2011.

VASCONCELOS, C.L.; BEZERRIL, P.M.; SANTOS, D.E.; DANTAS, T.N.; PEREIRA, M.R.; FONSECA, J.L. Effect of Molecular Weight and Ionic Strength on the Formation of Polyelectrolyte Complexes Based on Poly(methacrylic acid) and Chitosan. **Biomacromolecules**, v. 7, p. 1245-1252, 2006.

VOETS, I. K.; KEIZER, A.; STUART, M. C. Complex coacervate core micelles. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 147, p. 300–318, 2009.

XU, Y.; DU, Y.; HUANG, R.; GAO, L. Preparation and modification of *N*-(2-hydroxyl) propyl-3-trimethyl ammonium chitosan chloride nanoparticle as a protein carrier. **Biomaterials**, v. 24, n. 27, p.5015-5022, 2003.

YASAR, F.; TOGRUL, H.; ARSLAN, N. Flow properties of cellulose and carboxymethyl cellulose from orange peel. **Journal of Food Engineering**, v. 81, p. 187–199, 2007.

YENILMEZ, E.; BASARAN, B.; YAZAN, Y. Release characteristics of vitamin E incorporated chitosan microspheres and in vitro–in vivo evaluation for topical application. **Carbohydrate Polymers**, *in press*, 2010.

YU, C.; YIN, B.; ZHANG, W.; CHENG, S.; ZHANG, X.; ZHUO, R. Composite microparticle drug delivery systems based on chitosan, alginate and pectin with improved pH-sensitive drug release property. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 68, p. 245–249, 2009.

ZHENG, Y.; WU, Y.; YANG, W.; WANG, C.; FU, S.; SHEN, X. Preparation, Characterization, and Drug Release In Vitro of Chitosan-Glycyrrhetic Acid Nanoparticles. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 95, n. 1, 2006.

ZHENG, Y.; YANG, W.; WANG, C.; HU, J.; FU, S.; DONG, L.; WU, L.; SHEN, X. Nanoparticles based on the complex of chitosan and polyaspartic acid sodium salt: preparation, characterization and the use for 5-fluorouracil delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 67, n. 3, p. 621-31, 2007.

ZHONG, D.; HUANG, X.; YANG, Y.; CHENG, R. New insights into viscosity abnormality of sodium alginate aqueous solution. **Carbohydrate Polymers**, v. 81, p. 948–952, 2010.

CAPÍTULO III

ÁCIDO GLICIRRÍZICO: PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS E INCORPORAÇÃO EM GEL TÓPICO

1 INTRODUÇÃO

O ácido glicirrízico (AG) foi o fármaco de escolha para o sistema nanoparticulado desenvolvido. A partir disso, o objetivo deste capítulo foi realizar todas as etapas do desenvolvimento e caracterização de uma formulação para aplicação tópica contendo nanopartículas de AG.

A etapa inicial foi avaliar como a incorporação do AG na formulação poderia interferir na complexação entre os polieletrólitos. O AG possui grupamentos carboxílicos em sua estrutura, fator pelo qual se espera a ocorrência de uma interação eletrostática com os grupamentos amino da quitosana (QUI), além da que ocorre entre QUI e alginato de sódio (ALG). Primeiramente a concentração de AG foi mantida fixa, tendo sido preparadas seis formulações diferentes utilizando soluções de QUI com pH 3,0 e 5,0, que foram caracterizadas quanto à turbidez, tamanho de partícula, potencial zeta, viscosidade, pH, eficiência de encapsulação, teor e recuperação de fármaco.

Após avaliação dos resultados, foram estabelecidas as concentrações ideais de polieletrólitos, que foram mantidas fixas para o próximo estudo. Em um sistema nanoparticulado formado através de interação eletrostática, o número de sítios ativos disponíveis para interação é limitado e depende principalmente da concentração e do grau de ionização de cada componente. Para definir a concentração de fármaco que o sistema é capaz de encapsular, foram desenvolvidas formulações com concentrações crescentes de fármaco, que foram avaliadas quanto às suas características físico-químicas.

Na próxima etapa as concentrações de polieletrólitos e de fármaco foram fixadas, sendo que a suspensão de nanopartículas foi submetida às análises de espectroscopia de infravermelho, calorimetria exploratória diferencial, termogravimetria e morfologia.

Paralelamente foi realizado um estudo de estabilidade acelerado, analisando a suspensão de nanopartículas durante 90 dias a fim de garantir sua estabilidade físico-química durante o desenvolvimento da base semissólida.

Para o objetivo final do capítulo, um gel não-iônico foi escolhido como veículo para incorporação das nanopartículas, onde foi realizada a caracterização físico-química, avaliando parâmetros como caracteres organolépticos, pH, teor de fármaco, tamanho de partícula, potencial zeta, morfologia e viscosidade.

2 METODOLOGIA

2.1 PREPARAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE AG

Inicialmente foi obtida uma solução estoque de QUI (2,0 mg/mL) em ácido acético (1,0 % V/V) com pH ajustado à 3,0 ou 5,0. Esta solução foi diluída em água purificada a fim de obter a concentração final (0,9 mg/mL). As soluções de ALG (1,2 mg/mL) e TPP (0,5 ou 1,0 mg/mL) foram preparadas em água purificada com pH ajustado para 5,5. O AG foi diluído em água purificada (1,0 mg/mL).

Foram desenvolvidas três formulações contendo AG, de acordo com a tabela 24.

Tabela 24. Composição das formulações de suspensões de nanopartículas contendo ácido glicirrízico.

Formulação ^a	TPP (mg/mL)	ALG (mg/mL)	Volume final (mL)
AG 1 _{pH 3,0; pH 5,0}	---	---	30,0
AG 2 _{pH 3,0; pH 5,0}	5,0	---	31,0
AG 3 _{pH 3,0; pH 5,0}	1,0	1,2	36,0

^aFormulações preparadas em triplicata com AG (1,0 mg/mL)

pH 3,0: Formulação preparada com solução de QUI (0,9 mg/mL) em pH 3,0

pH 5,0: Formulação preparada com solução de QUI (0,9 mg/mL) em pH 5,0

Para o preparo das nanopartículas, 6,0 mL da solução aquosa de AG (1,0 mg/mL) foram gotejados sob 24 mL da solução de QUI (0,9 mg/mL) sob agitação magnética. Em seguida, 6,0 mL da solução contendo ALG (1,2 mg/mL) e TPP (1,0 mg/mL), ou somente 1,0 mL da solução de TPP (5,0 mg/mL), foram gotejadas à solução anterior e a agitação foi mantida por 1 h. As suspensões de nanopartículas formadas foram filtradas em papel de filtro e submetidas à caracterização físico-química.

2.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS NANOPARTÍCULAS DE AG

As formulações AG 1_{pH 3,0; pH 5,0}, AG 2_{pH 3,0; pH 5,0}, e AG 3_{pH 3,0; pH 5,0} foram analisadas quanto à turbidez, pH, tamanho de partícula e distribuição, potencial zeta, viscosidade, eficiência de encapsulação, teor e recuperação de fármaco. Os métodos utilizados já foram previamente descritos no capítulo II.

A partir destes resultados, a formulação mais adequada foi selecionada, tendo sido avaliado o efeito da concentração de fármaco nas características físico-químicas das nanopartículas. Para isto as concentrações de polímeros foram fixadas e a concentração de AG foi utilizada na faixa de 0,5 a 3,0 mg/mL. Ao fim destas análises, a concentração de AG foi fixada, sendo que a formulação final foi submetida à caracterização morfológica conforme já descrito anteriormente (capítulo II), além das análises de espectroscopia de infravermelho, calorimetria exploratória diferencial e termogravimetria, conforme descrito a seguir.

2.2.1 Espectroscopia de Infravermelho

Os espectros de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FIT-IR) foram obtidos usando um equipamento Shimadzu (IR Prestige 21; Kyoto, Japão) utilizando resolução de 4 cm^{-1} . Foram realizadas análises dos compostos puros, da mistura física dos compostos, das nanopartículas placebo e das nanopartículas contendo AG. As suspensões de nanopartículas foram previamente liofilizadas utilizando glicina (0,05 %) como crioprotetor. As amostras foram trituradas com brometo de potássio (KBr) e submetidas à análise entre $400\text{ a }4000\text{ cm}^{-1}$.

2.2.2 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e Termogravimetria (TG)

O comportamento térmico da QUI, ALG, AG, mistura física e nanopartículas placebo e contendo AG foi analisado por DSC e TG. As suspensões de nanopartículas foram previamente liofilizadas utilizando glicina (0,05 %) como crioprotetor.

As análises de DSC foram realizadas em equipamento DSC-60 Shimadzu (Kyoto, Japão). Cerca de 2,0 mg de amostra foram pesados em cadinhos de alumínio, os quais foram selados e submetidos ao aquecimento numa razão de $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$, sob atmosfera dinâmica de nitrogênio com fluxo de $50\text{ mL}/\text{min}$. A análise foi realizada através de 2 ciclos de aquecimento. O primeiro ciclo de aquecimento foi obtido na faixa de $30\text{ a }250\text{ }^{\circ}\text{C}$, dependendo da amostra. Após resfriamento, foi realizado o segundo ciclo de aquecimento de $30\text{ a }450\text{ ou }500\text{ }^{\circ}\text{C}$. Um cadinho de alumínio vazio selado foi utilizado como referência.

As análises de termogravimetria (TG) e termogravimetria derivada (DTG) foram realizadas em uma termobalança TGA-50 Shimadzu (Kyoto, Japão). Cerca de 4,0 mg de amostra foram pesados em cadinho de platina e submetidos a uma razão de aquecimento de 10

°C/min até 700 °C, sob atmosfera dinâmica de nitrogênio com fluxo de 50 mL/min.

2.3 ESTUDO DE ESTABILIDADE PRELIMINAR

A suspensão de nanopartículas contendo AG selecionada foi submetida a um estudo de estabilidade preliminar. As formulações foram mantidas em temperatura ambiente e protegidas da luz acondicionadas em frascos de vidro âmbar. Amostras foram retiradas após 1, 2, 7, 14, 21, 28, 60, e 90 dias e analisadas quanto a turbidez, tamanho de partícula, potencial zeta, pH, eficiência de encapsulação, teor e recuperação de fármaco, conforme metodologias descritas no capítulo II.

2.4 PREPARAÇÃO DO GEL CONTENDO AS NANOPARTÍCULAS DE AG

Após a caracterização físico-química e estudo de estabilidade das suspensões de nanopartículas contendo AG, a formulação selecionada foi utilizada para o preparo de um gel tópico. Primeiramente o metilparabeno (0,05 %; p/v), utilizado como conservante, foi adicionado à suspensão de nanopartículas. A seguir, o natrosol[®] (0,05 %; p/v) foi incorporado lentamente sob agitação magnética. As formulações, preparadas em triplicata, foram mantidas sob agitação durante 4 h, seguido de repouso por 12 h para completa gelificação do natrosol[®]. Um gel controle (placebo) foi preparado da mesma forma, porém a suspensão de nanopartículas foi substituída por água purificada.

2.5 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO GEL CONTENDO NANOPARTÍCULAS DE AG

2.5.1 Características organolépticas

As características organolépticas foram determinadas quanto ao sabor, o odor e a aparência das formulações.

2.5.2 Determinação do pH do gel

O pH do gel contendo nanopartículas foi determinado em triplicata conforme método descrito no capítulo II.

2.5.3 Determinação do teor de AG no gel

Uma alíquota de gel (1,0 mL) foi transferida para balão volumétrico contendo 1,0 mL de metanol. Esta solução foi submetida à agitação em vórtex até dispersão e mantida em contato por 24 h para completa dissolução das nanopartículas e do gel. A solução foi diluída com fase móvel até volume de 10,0 mL e filtrada em papel de filtro. A quantificação de AG foi realizada em triplicata por cromatografia líquida de alta eficiência, conforme método descrito no capítulo II.

2.5.4 Determinação do tamanho de partícula no gel

O tamanho das nanopartículas após a formação do gel foi determinado através de medidas de espalhamento de luz dinâmico (DLS) conforme método descrito no capítulo II. Para a análise, o gel foi diluído em água destilada (1:10), submetido à agitação em vórtex até completa dispersão e filtrado à vácuo em filtro de papel.

2.5.5 Determinação do potencial zeta das nanopartículas no gel

As medidas do potencial zeta das nanopartículas após a formação do gel foram realizadas pela técnica de microeletroforese associada à anemometria Doppler de laser, conforme método descrito no capítulo II.

Para a análise, o gel foi diluído em água destilada (1:10), submetido à agitação em vórtex até completa dispersão e filtrado à vácuo em filtro de papel.

2.5.6 Reologia do gel contendo nanopartículas de AG

As características reológicas do gel contendo nanopartículas foram avaliadas com o auxílio de um viscosímetro rotacional Brookfield, conforme metodologia descrita no capítulo II.

As velocidades de rotação do sensor foram selecionadas com base em determinações preliminares, respeitando os limites nos valores de torque (superiores a 10 % e inferiores a 100 %). Desta forma, a caracterização reológica das amostras foi realizada através de rampas de cisalhamento ascendentes de 0 a 37 s⁻¹, com aumentos graduais de 4,0 RPM na velocidade e mantendo cada ponto de cisalhamento por 30 s, e descendentes de 37 a 0 s⁻¹. A unidade utilizada para determinação da viscosidade foi o centiPoise (cP, ou seja 0,01 poise). As medidas foram realizadas em triplicata.

2.5.7 Morfologia das nanopartículas no gel

A morfologia das nanopartículas foi avaliada por microscopia eletrônica de transmissão, conforme método descrito no capítulo II. O

gel foi previamente diluído com água destilada (1:100) e depositado em *grids* de cobre de 2 mm que foram secas por 48 horas, a temperatura ambiente.

2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os experimentos foram realizados com três repetições independentes e os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão ou desvio padrão relativo. Para comparações entre grupos foi utilizada análise de variância (ANOVA), incluindo testes de comparações múltiplas (Tukey). Diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando $p \leq 0,05$.

3 RESULTADOS

3.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS NANOPARTÍCULAS CONTENDO ÁCIDO GLICIRRÍZICO

3.1.1 Turbidez

Na tabela 25 estão descritos os resultados de turbidez das suspensões de nanopartículas expressos em transmitância (T %) e contagens por segundo (kcps).

Tabela 25. Turbidez das suspensões de nanopartículas contendo ácido glicirrízico avaliada pela transmitância (T %) e contagens por segundo (kcps).

Formulação	Turbidez ^a \pm DPR ^b (%)			
	T (%)		kcps	
	pH 3,0	pH 5,0	pH 3,0	pH 5,0
AG 1	91,6 \pm 2,3	94,2 \pm 1,5	139,2 \pm 1,4	129,0 \pm 2,0
AG 2	81,9 \pm 2,2	79,2 \pm 2,8	173,7 \pm 1,8	195,0 \pm 1,9
AG 3	60,5 \pm 2,5	37,5 \pm 2,1	261,3 \pm 2,1	307,9 \pm 1,4

^a média de três determinações; ^b desvio padrão relativo

A formulação AG 3_{pH 5,0} apresentou menor valor de T % e maior valor de kcps, o que significa maior turbidez da suspensão de nanopartículas. Este resultado confirma que, para uma melhor eficiência na complexação, é necessário o uso de ALG e TPP. Comparando esta formulação com a AG 3_{pH 3,0} pode ser observado que em pH 3,0 a suspensão apresentou menor turbidez, confirmando que o pH da solução de QUI é de fundamental importância no processo de complexação.

Como a formulação AG 3 apresentou maior turbidez, foi realizada uma comparação das formulações preparadas em pH 3,0 e 5,0 com suas respectivas formulações placebo (PL 3_{pH 3,0} e PL 3_{pH 5,0}) (tabela 26).

Tabela 26. Turbidez das suspensões de nanopartículas placebo e com ácido glicirrízico avaliada pela transmitância (T %) e contagens por segundo (kcps).

	Formulações			
	PL 3 _{pH 3,0}	AG 3 _{pH 3,0}	PL 3 _{pH 5,0}	AG 3 _{pH 5,0}
Turbidez ^a ± DPR ^b (%)	T (%) 68,7 ± 2,2	60,5 ± 2,5	56,8 ± 2,1	37,5 ± 2,1
(%)	kcps 214,1 ± 1,6	261,3 ± 2,1	292,9 ± 1,5	307,9 ± 1,4

^a média de três determinações; ^b desvio padrão relativo

Pode ser observado que as formulações contendo AG apresentaram maior turbidez (menor T % e maior kcps) do que as respectivas formulações placebo, indicando que a adição de fármaco confere ao sistema uma maior concentração de complexos insolúveis ($p \leq 0,05$).

3.1.2 Determinação do tamanho de partícula e distribuição

O tamanho das nanopartículas é um parâmetro importante a ser determinado, já que pode influenciar sua interação *in vivo* assim como na liberação do fármaco (MORRIS et al., 2011).

Os resultados de tamanho de partícula obtidos para as formulações desenvolvidas podem ser visualizados na figura 29.

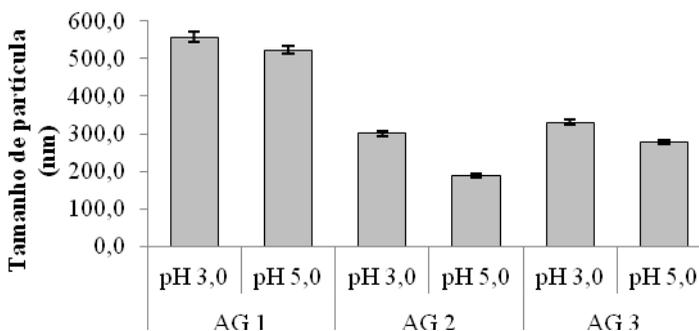


Figura 29. Tamanho de partícula médio obtido das suspensões de nanopartículas contendo ácido glicirrízico.

As formulações preparadas em pH 3,0 apresentaram tamanho de partícula médio significativamente superior ao das formulações preparadas em pH 5,0 ($p \leq 0,05$). Este efeito do pH da solução de QUI também foi observado na caracterização das nanopartículas placebo e está relacionado à maior ionização da QUI em pH 3,0, causando a repulsão mútua entre os grupos amino livres e provocando o alongamento da estrutura.

Por outro lado, ao analisar cada grupo de formulações (AG 1 - AG 2 - AG 3) algumas considerações podem ser feitas, independente do pH em que foram preparadas. A interação eletrostática entre o AG e a QUI (AG 1) resulta em partículas maiores que 500 nm e com maior polidispersão (0,53 a 0,76). Ao adicionar o TPP ao sistema (AG 2), o tamanho de partícula diminui significativamente, provavelmente devido aos grupamentos negativos do TPP que fazem com que ocorra um entrelaçamento cruzado possibilitando uma aproximação entre duas moléculas de QUI, levando a uma compactação do complexo formado. Entretanto, a polidispersão permanece elevada (0,42 a 0,59) nestes sistemas, demonstrando que esta reticulação não é homogênea em todas as partículas. Somente com a adição de um polieletrólito com carga negativa (ALG) ocorre a diminuição da polidispersão (0,21 a 0,35), apesar de ocorrer um aumento no tamanho de partícula devido à maior estrutura formada (AG 3).

Através destes resultados é possível estabelecer a importância do ALG na formação de nanopartículas com tamanho e polidispersão adequados.

Os resultados de tamanho de partícula das formulações AG $3_{\text{pH } 3,0}$ e AG $3_{\text{pH } 5,0}$ foram comparados com os obtidos com as respectivas formulações placebo (PL $3_{\text{pH } 3,0}$ e PL $3_{\text{pH } 5,0}$), a fim de avaliar o efeito do fármaco no tamanho das nanopartículas (tabela 27).

Tabela 27. Tamanho de partícula médio das nanopartículas placebo e com ácido glicirrízico.

	Formulações			
	PL $3_{\text{pH } 3,0}$	AG $3_{\text{pH } 3,0}$	PL $3_{\text{pH } 5,0}$	AG $3_{\text{pH } 5,0}$
Tamanho de partícula ^a (nm)	346,5 ±	330,3 ±	311,6 ±	270,3 ±
± DPR ^b (%)	2,2	2,1	2,1	1,9

^a média de três determinações; ^b desvio padrão relativo

De acordo com a tabela 27, a presença de AG reduziu significativamente o tamanho de partícula, provavelmente devido a

interação do fármaco com a QUI, aumentando o entrelaçamento das cadeias e provocando uma maior compactação ($p \leq 0,05$).

Aelenei e colaboradores (2009) observaram uma forte interação entre ácido tânico e QUI que resultou em partículas com menor diâmetro. Caffagi e colaboradores (2007) obtiveram resultado semelhante estudando a interação de cisplatina e ALG.

3.1.3 Determinação do potencial zeta

Todas as formulações apresentaram potencial zeta positivo, resultante do excesso de cargas positivas não neutralizadas da QUI (figura 30).

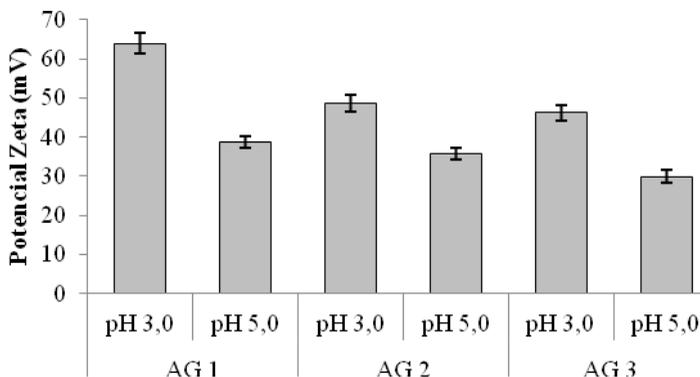


Figura 30. Potencial zeta médio obtido das suspensões de nanopartículas contendo ácido glicirrízico.

Como já esperado devido aos estudos preliminares, o pH da solução de QUI tem efeito significativo no valor de potencial zeta, pois a carga superficial é dependente do pH. Desta forma, as formulações preparadas em pH 5,0 apresentaram valores de potencial zeta significativamente menores do que em pH 3,0 ($p \leq 0,05$).

Em ambos os valores de pH, a adição de TPP e ALG reduziu o potencial zeta, pois os grupos amino protonados residuais da QUI interagiram com as cargas negativas adicionadas, reduzindo a carga superficial final das nanopartículas.

Os resultados de potencial zeta da formulação AG 3 preparada em pH 3,0 e 5,0 foram comparados com os obtidos com as respectivas formulações placebo (PL_{3pH 3,0} e PL_{3pH 5,0}), a fim de avaliar o efeito do AG (tabela 28).

Tabela 28. Potencial zeta médio das nanopartículas placebo e com ácido glicirrízico.

	Formulações			
	PL 3 _{pH 3,0}	AG 3 _{pH 3,0}	PL 3 _{pH 5,0}	AG 3 _{pH 5,0}
Potencial zeta^a (mV) ± DPR^b (%)	+ 44,3 ± 4,9	+ 46,2 ± 4,4	+ 31,9 ± 5,1	+ 29,9 ± 4,9

^a média de três determinações; ^b desvio padrão relativo

Foi observado um aumento do potencial zeta na formulação AG 3_{pH 3,0} quando comparada com sua formulação placebo. Como o AG possui valores de pKa próximos ao valor do pH da formulação, seus grupos carboxílicos estarão pouco ionizados, não interferindo na carga superficial das partículas.

Por outro lado, a formulação AG 3_{pH 5,0} apresentou valor de potencial zeta significativamente menor do que sua formulação placebo ($p \leq 0,05$), pois em pH 5,0 o AG possui maior grau de ionização. Neste caso, o próprio AG possui cargas negativas que também interagem com os sítios positivos da QUI, diminuindo o número de sítios residuais responsáveis pelo potencial de superfície. Porém, esta adição de cargas contrárias não é suficiente para neutralizar todos os sítios N⁺ da QUI, restando uma alta proporção de grupos amino livres que formam uma capa protetora proporcionando estabilidade eletrocinética às nanopartículas, como também observado por outros autores (BOONSONGRIT; MITREVEJ; MUELLER, 2006; GAN & WANG, 2007; NAM et al., 2010; SAETHER et al., 2008). Entretanto, de acordo com a análise estatística a variação é pequena e pode estar relacionada à margem de erro do equipamento.

3.1.4 Determinação do pH

A análise do pH das suspensões de nanopartículas apresentou valores de acordo com o pH da solução de QUI utilizada (3,0 ou 5,0), com variação não significativa em todos os casos ($p \geq 0,05$) e desvio padrão relativo entre as medidas < 1 %. Isto se deve ao fato que a fase contendo QUI está presente em excesso na formulação, determinando o valor final de pH.

3.1.5 Reologia

As formulações contendo AG apresentaram o mesmo comportamento de fluido não-newtoniano dilatante demonstrado pelas

formulações placebo, ou seja, com o aumento da taxa de cisalhamento ocorreu um aumento da viscosidade, sendo que com a diminuição da taxa de cisalhamento as suspensões voltaram a sua viscosidade inicial. O valor médio de viscosidade aparente obtido no ponto de máximo cisalhamento (238 s^{-1}) para cada formulação está descrito na tabela 19. Além disso, para descrever o comportamento de fluxo dilatante foi utilizada a equação da lei da força (equação 4 – capítulo II), onde foi verificado que o valor de n (índice de fluxo) é maior que 1 (tabela 29).

Tabela 29. Viscosidade e valor de n (índice de fluxo) obtidos das suspensões de nanopartículas contendo ácido glicirrízico.

Formulação	Viscosidade ^a (cP) ±		$n^a \pm \text{DPR}^b$ (%)	
	DPR ^b (%)		pH 3,0	pH 5,0
	pH 3,0	pH 5,0		
AG 1	2,18 ± 1,54	1,23 ± 1,13	1,05 ± 0,51	1,08 ± 0,66
AG 2	1,47 ± 1,15	1,03 ± 0,79	1,11 ± 1,12	1,18 ± 0,91
AG 3	1,15 ± 0,91	1,03 ± 0,75	1,15 ± 1,23	1,23 ± 1,10

^a média de três determinações; ^b desvio padrão relativo

As suspensões de nanopartículas preparadas em pH 5,0 apresentaram menor viscosidade que suas formulações correspondentes preparadas em pH 3,0. Por outro lado, o efeito do TPP e do ALG na redução da viscosidade das suspensões é comum para ambos os valores de pH. Estes fatos corroboram as teses de que em pH 5,0 existe uma menor repulsão eletrostática e que a adição de polieletrólitos de carga contrária à QUI ocasiona uma maior interação eletrostática. O resultado destes fatores é uma estrutura mais compacta e, conseqüentemente, menos viscosa.

Os maiores valores de n foram observados com as formulações AG 2 e AG 3 preparadas em pH 5,0, estes relacionados a formação de complexos insolúveis que possuem menor mobilidade, resultando em um comportamento não-newtoniano mais pronunciado.

Os resultados de viscosidade da formulação AG 3 preparada em pH 3,0 e 5,0 foram comparados com os obtidos com as respectivas formulações placebo (PL $3_{\text{pH } 3,0}$ e PL $3_{\text{pH } 5,0}$), a fim de avaliar o efeito do AG na viscosidade das suspensões (tabela 30).

Tabela 30. Viscosidade média das suspensões de nanopartículas placebo e com ácido glicirrízico.

	Formulações			
	PL 3 _{pH 3,0}	AG 3 _{pH 3,0}	PL 3 _{pH 5,0}	AG3 _{pH 5,0}
Viscosidade ^a (cP) ± DPR ^b (%)	1,23 ± 1,24	1,15 ± 1,62	1,10 ± 1,16	1,03 ± 1,21

^a média de três determinações; ^b desvio padrão relativo

As formulações contendo AG resultaram em menores valores de viscosidade em comparação com suas respectivas formulações placebo, o que confirma a ocorrência de interação eletrostática do AG com a QUI na formação do complexo.

Este efeito da complexação de polieletrólitos na viscosidade do meio foi observado por Coppi e Iannuccelli (2009). Os autores adicionaram um fármaco catiônico (tamoxifeno) a soluções de ALG, onde observaram uma redução da viscosidade devido à interação eletrostática.

3.2 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE AG

Conforme resultados apresentados até o momento, a formulação AG 3_{pH5,0} (preparada com AG 1,0 mg/mL; QUI 0,9 mg/mL; ALG 1,2 mg/mL; e TPP 1,0 mg/mL) foi a que apresentou características físico-químicas mais adequadas. Consequentemente, as demais formulações foram excluídas dos próximos estudos. A formulação AG 3_{pH 5,0} é preparada com AG na concentração de 1,0 mg/mL. Para avaliar o efeito da concentração de AG nas características físico-químicas da suspensão de nanopartículas, novas formulações foram preparadas com concentrações crescentes de fármaco (0,5 a 3,0 mg/mL), enquanto que a concentração de QUI, ALG e TPP foi mantida fixa.

A variação da concentração de AG não interferiu significativamente nos valores de pH e viscosidade da suspensão (dados não mostrados) ($p \geq 0,05$).

3.2.1 Turbidez

Na figura 31 podem ser visualizados os resultados de turbidez das suspensões de nanopartículas com concentrações crescentes de fármaco expressos em transmitância (T %) e contagens por segundo (kcps).

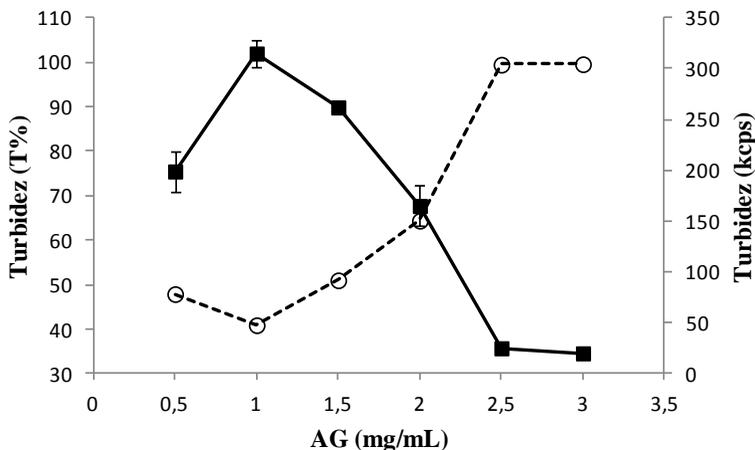


Figura 31. Turbidez das suspensões de nanopartículas contendo ácido glicirrízico avaliada pela transmitância (--○--) e contagens por segundo (--■--).

A turbidez máxima foi alcançada com a concentração de AG de 1,0 mg/mL. Com o aumento da concentração de fármaco ocorreu uma diminuição gradativa da turbidez das suspensões, indicando menor concentração de complexos. Nas suspensões preparadas com 2,5 e 3,0 mg/mL de AG ocorreu precipitação, provavelmente devido a um excesso de fármaco resultando em uma turbidez mínima, pois o precipitado formado sedimentou tornando a suspensão límpida. Estas concentrações foram excluídas dos próximos estudos.

3.2.2 Determinação do tamanho de partícula e potencial zeta

Os resultados de tamanho de partícula e potencial zeta obtidos com AG (0,5 – 2,0 mg/mL) podem ser visualizados na figura 32.

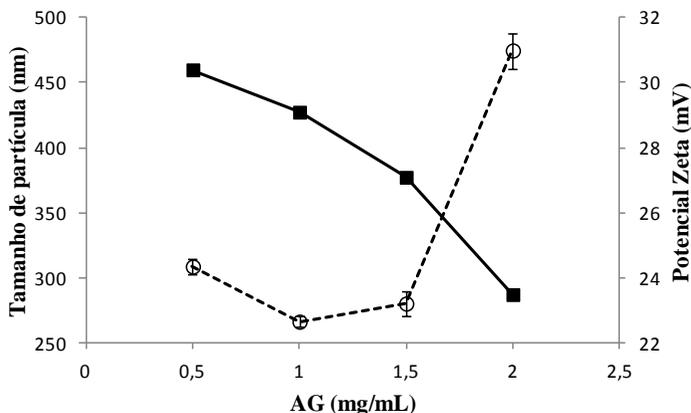


Figura 32. Tamanho de partícula (---○---) e potencial zeta (---■---) das suspensões de nanopartículas contendo ácido glicirrízico.

O menor tamanho de partícula foi obtido utilizando 1,0 mg/mL de AG, o que evidencia uma maior interação eletrostática entre o AG e os polieletrólitos, resultando em maior compactação das nanopartículas. Com o aumento da concentração de AG ocorre um aumento no tamanho de partícula e da polidispersão, indicando uma desestabilização do sistema. Por outro lado, o potencial zeta diminui à medida que a concentração de AG aumenta, confirmando que uma parte do fármaco está adsorvida na superfície interagindo com os sítios positivos da QUI, resultando em uma menor carga superficial.

3.2.3 Determinação da eficiência de encapsulação, recuperação e teor de AG

Na tabela 31 estão descritos os resultados de eficiência de encapsulação, recuperação e teor obtidos com concentrações crescentes de fármaco.

Tabela 31. Resultados de eficiência de encapsulação (EE %), teor ($\mu\text{g/mL}$) e recuperação (%) obtidos com as formulações contendo ácido glicirrízico.

AG (mg/mL)	EE ^a (%) \pm DPR ^b (%)	Teor ^a ($\mu\text{g/mL}$) \pm DPR ^b (%)	Rec ^a (%) \pm DPR ^b (%)
0,5	98,2 \pm 1,4	57,5 \pm 2,2	61,3 \pm 1,1
1,0	98,0 \pm 1,3	114,6 \pm 0,8	61,1 \pm 0,9
1,5	96,7 \pm 2,4	138,3 \pm 0,6	49,2 \pm 0,8
2,0	88,9 \pm 4,1	93,0 \pm 1,5	24,8 \pm 2,1

^a média de três determinações; ^b desvio padrão relativo

Os resultados demonstram que em todas as concentrações testadas a EE foi superior a 88,9 %. Entretanto, ocorreram diferenças significativas na recuperação do fármaco adicionado ($p \leq 0,05$). As formulações contendo 0,5 e 1,0 mg/mL de AG apresentaram recuperação acima de 60 %, o que é considerado satisfatório. Ao aumentar a concentração de fármaco, a recuperação diminuiu, chegando a 24,8 % com 2,0 mg/mL. Este resultado provavelmente está relacionado com uma possível precipitação causada por um excesso de fármaco adicionado ao sistema.

A partir destes resultados pode ser observado que o sistema possui uma limitação quanto à quantidade de fármaco capaz de ser eficientemente encapsulada. Para os próximos estudos a concentração de AG será fixada em 1,0 mg/mL.

Na tabela 32 pode ser visualizada a formulação selecionada após a caracterização físico-química. Nesta formulação, a dose final de fármaco é de 0,02 %.

Tabela 32. Formulação selecionada após caracterização físico-química.

Fase de preparo	Componente	Concentração (mg/mL)	Volume (mL)
1	Ácido glicirrízico	1,0	6,0
2 (pH 5,0)	Quitosana	0,9	24,0
3 (pH 5,5)	Alginato de sódio TPP	1,2 1,0	6,0

3.3 MORFOLOGIA

Na figura 33 podem ser visualizadas fotomicrografias agrupadas que foram obtidas a partir da suspensão de nanopartículas de AG selecionada, através da técnica de microscopia eletrônica de varredura (MET).

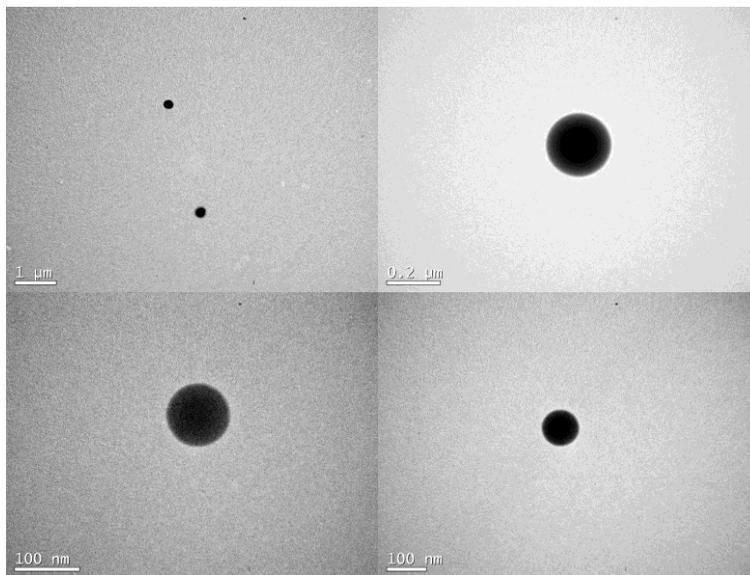


Figura 33. Fotomicrografias obtidas por MET de nanopartículas contendo AG.

As nanopartículas visualizadas são esféricas e compactas, com uma superfície mais densa do que foi observado previamente nas nanopartículas placebo (capítulo II). Este fato comprova o que foi previamente observado na análise do potencial zeta, de que uma parte do fármaco está adsorvida na superfície das nanopartículas.

3.4 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO

A espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier é frequentemente utilizada na caracterização de sistemas nanoparticulados, com o objetivo de verificar as possíveis interações existentes entre os materiais a nível molecular durante o processo de complexação (AELENEI et al., 2009; ANITHA et al., 2011).

Na figura 34 podem ser visualizados os espectros de infravermelho da QUI, ALG, TPP, nanopartículas placebo, AG, nanopartículas contendo AG e mistura física.

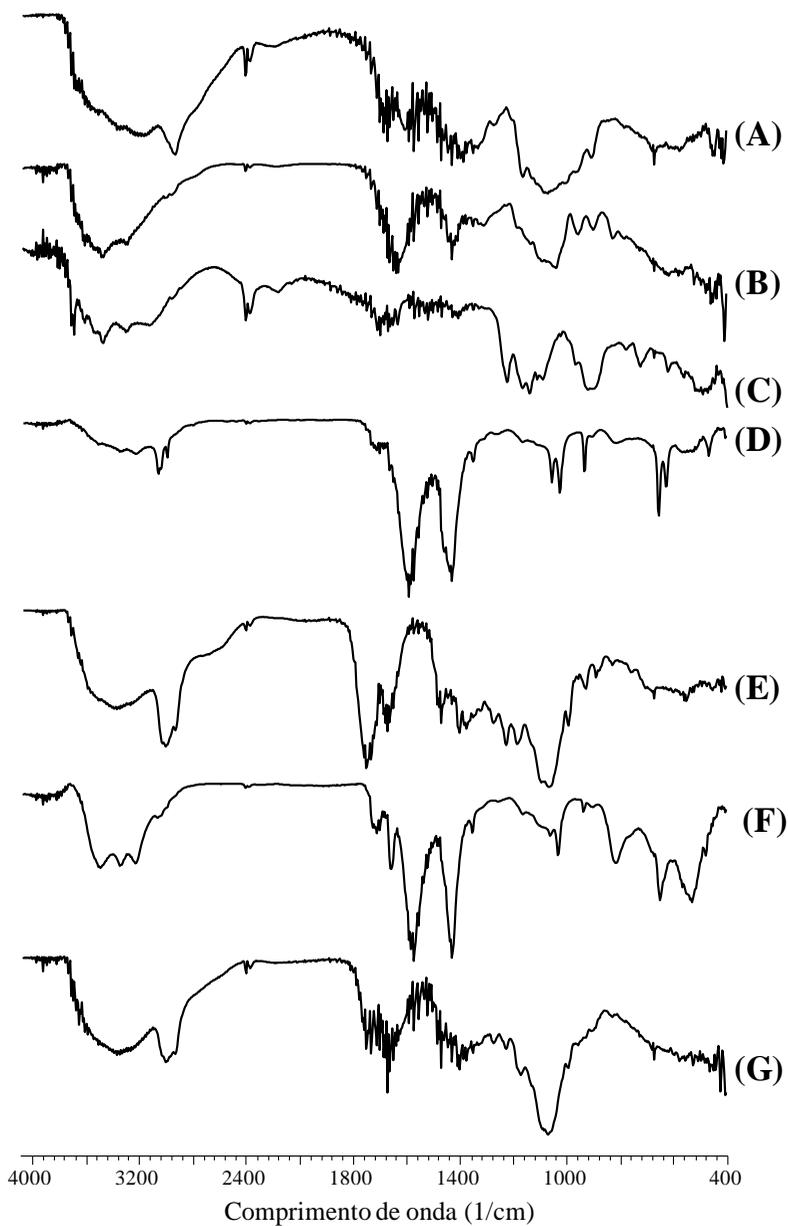


Figura 34. Espectro de infravermelho da QUI (A); ALG (B); TPP (C); nanopartículas placebo (D), AG (E); nanopartículas contendo AG (F); e mistura física (G).

A QUI apresenta grupos amino protonados (NH_3^+) em solução ácida. No espectro de infravermelho da QUI (figura 34 A) observa-se absorção em 3200 cm^{-1} , referente ao estiramento da ligação $-\text{OH}$ e em 2880 cm^{-1} , atribuída ao estiramento C-H. As absorções em 1650 cm^{-1} e 1556 cm^{-1} referem-se ao estiramento $>\text{C}=\text{O}$ de amida e as vibrações de deformação N-H de amina primária, respectivamente (AELENEI et al., 2009). A absorção em 1388 cm^{-1} refere-se à pequena vibração C-H do grupo CH_3 , relativa ao grupo acetamido ainda presente em pequena proporção na cadeia polimérica, proveniente da quitina, e em 1080 cm^{-1} estiramento da ligação C-O.

Os grupamentos carboxílicos do ALG (estiramento COO^-) (figura 34 B) apresentam uma absorção assimétrica em 1614 cm^{-1} e uma absorção simétrica menos intensa em 1415 cm^{-1} (DAS; KASOJU; BORA, 2010). Uma absorção alargada pode ser observada em 1028 cm^{-1} , a qual é atribuída ao estiramento COH (ABREU et al., 2008).

O TPP (figura 34 C) apresenta uma absorção em 1100 cm^{-1} referente ao seu principal grupo funcional ($\text{P}=\text{O}$) (BHUMKAR & POKHARKAR, 2006).

A interação entre polieletrólitos pode ser visualizada através de modificações dos modos vibracionais dos seus principais grupamentos. A formação do complexo entre QUI, ALG e TPP (figura 34 D) é evidenciada pelo aumento da intensidade e estreitamento da absorção na região de 1600 cm^{-1} devido aos grupamentos COO^- do ALG (WANG; KHOR; LIM, 2001). Além disso, a absorção referente ao grupamento amina da QUI em 1556 cm^{-1} desapareceu, sendo substituída por uma banda intensa em 1415 cm^{-1} (HO et al., 2009; PARVEEN et al., 2010). Também foi observado um deslocamento da absorção do grupamento fosfato do TPP de 1100 cm^{-1} para 1044 cm^{-1} .

No espectro de infravermelho do AG (figura 34 E) os eventos de absorção característicos aparecem em 1730 cm^{-1} (COOH), 1643 cm^{-1} ($\text{C}=\text{O}$), e 1454 cm^{-1} (COO^-) (ZHENG et al., 2006).

As nanopartículas contendo AG (figura 34 F) apresentaram as mesmas absorções das nanopartículas placebo na região de 1600 cm^{-1} e 1415 cm^{-1} , com pequenos deslocamentos, representando os grupamentos COO^- do ALG complexado com a QUI. A presença do AG nas nanopartículas é evidenciada por um deslocamento da absorção do grupamento C-O do AG de 1643 cm^{-1} para 1639 cm^{-1} . Além disso, a absorção do grupamento COOH em 1730 cm^{-1} é deslocada para 1697 cm^{-1} , tornando-se mais fraca, demonstrando que uma parte do grupamento COOH está dissociado e também está complexado com os grupamentos amina da QUI através de interação eletrostática. Esta

evidência é confirmada pelo deslocamento da absorção referente ao grupamento COO^- do AG de 1454 cm^{-1} para 1415 cm^{-1} , tornando-se mais intensa e fina do que banda correspondente na nanopartícula placebo. Isto demonstra que não somente os grupamentos COO^- do ALG, mas também do AG estão complexados com os grupamentos amina da QUI.

O espectro de infravermelho da mistura física dos componentes individuais (figura 34 G) apresenta absorções menos intensas e menos definidas. Entretanto, é possível visualizar os principais eventos de absorção de cada componente, indicando que a mistura física não é capaz de causar a uma interação a nível molecular (SANKALIA et al., 2007).

3.5 CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC) E TERMOGRAVIMETRIA (TG)

Na figura 35 estão agrupadas as curvas DSC obtidas no primeiro ciclo de aquecimento, que variou de 30 a 250 °C conforme a amostra analisada. Esta primeira análise foi realizada a fim de visualizar os eventos de perda de água.

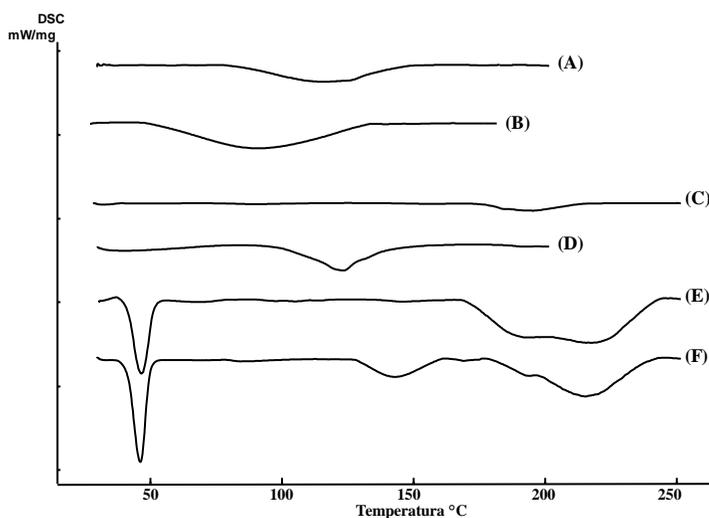


Figura 35. Curvas DSC no primeiro ciclo de aquecimento: QUI (A); ALG (B); AG (C); mistura física (D); nanopartículas placebo (E); nanopartículas contendo AG (F).

A QUI (figura 35 A) e o ALG (figura 35 B) apresentam um primeiro evento endotérmico que inicia em 80 °C e em 48 °C, respectivamente, atribuído à evaporação de água adsorvida.

O AG (figura 35 C), por ser um fármaco amorfo, não apresenta evento endotérmico característico de fusão, conforme já observado por outros autores (SUI et al., 2012). Entretanto, uma pequena variação da linha base pode ser visualizada em 180 °C, que pode estar relacionada à perda de água internamente ligada à molécula.

A curva DSC da mistura física (figura 35 D), comparada às curvas dos componentes individuais, apresentou um deslocamento no início do evento de evaporação de água para 91,4 °C.

As amostras de nanopartículas placebo e nanopartículas contendo AG (figuras 35 E e F, respectivamente) apresentaram novos eventos endotérmicos. O primeiro evento visualizado nas duas amostras iniciando em 46 °C é atribuído à perda de água residual da etapa de liofilização e à presença de ácido acético do processo de preparação das nanopartículas. O segundo evento iniciando em 144 °C, visualizado somente nas nanopartículas contendo AG, pode estar relacionado a um deslocamento do evento de perda de água internamente ligada do fármaco. O evento alargado que inicia em 170 °C para ambas as amostras pode ser atribuído à perda de água internamente ligada através de ligações de H. A perda de água nesta faixa de temperatura é interpretada por vários autores como uma confirmação da ocorrência de interação iônica, pois a rede formada pelos polieletrólitos seria capaz de aprisionar a água e retardar sua eliminação. Piyakulawat e colaboradores (2007) estudando a interação entre QUI e glutaraldeído também observaram um novo evento endotérmico em 170 °C e relacionaram com a ocorrência de uma forte interação química. Um evento similar em 217 °C foi visualizado por Singh e colaboradores (2012) avaliando a interação entre EDTA e QUI. Os autores atribuíram o evento à interação entre os grupamentos COO^- do EDTA e NH_3 da QUI. Yapar e colaboradores (2009) confirmaram a formação de complexos de QUI e ácido algínico através do aparecimento de evento endotérmico em 180 °C.

Na segunda etapa de análise, as amostras foram resfriadas até a temperatura ambiente e submetidas a um novo ciclo aquecimento (30 a 450 ou 500 °C) (figura 36). Esta análise é realizada com o objetivo de eliminar a água das amostras e visualizar possíveis eventos de transição vítrea. A transição vítrea pode ser observada através de uma inflexão na linha base causada pela variação de calor específico das amostras. Geralmente é mais claramente observada na segunda corrida, pois a

água residual que poderia mascarar o evento é eliminada no primeiro ciclo (QUIJADA-GARRIDO et al., 2007).

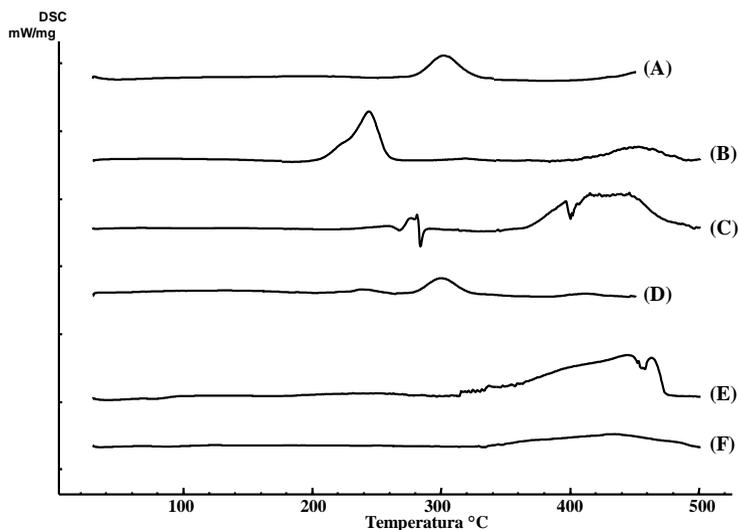


Figura 36. Curvas DSC no segundo ciclo de aquecimento: QUI (A); ALG (B); AG (C); mistura física (D); nanopartículas placebo (E); nanopartículas contendo AG (F).

Pode ser observado em todas as curvas DSC que os eventos endotérmicos visualizados no primeiro ciclo de aquecimento não são mais observados no segundo ciclo, indicando que eles correspondem à perda de água residual ou internamente ligada às moléculas e não a um possível evento de transição vítrea.

O início da degradação da QUI, ALG e mistura física é evidenciado por um evento exotérmico que inicia em 270, 200 e 278 °C, respectivamente. O AG apresenta um pequeno evento exotérmico iniciando em 267 °C, seguido de um grande evento em 350 °C. Nas curvas das nanopartículas placebo e contendo AG os eventos exotérmicos característicos dos polímeros desaparecem, onde um largo evento iniciando em 314 °C pode ser visualizado. O desaparecimento dos eventos de degradação exotérmicos característicos dos polímeros indica que ocorreu uma modificação da estrutura molecular das nanopartículas, causada pela formação de um complexo

(CRCAREVSKA; DODOV; GORACINOVA, 2008; PIYAKULAWAT et al., 2007; ZOHRI et al., 2010).

As curvas termogravimétricas obtidas a partir dos componentes individuais, da mistura física, das nanopartículas placebo e contendo AG estão apresentadas na figura 37.

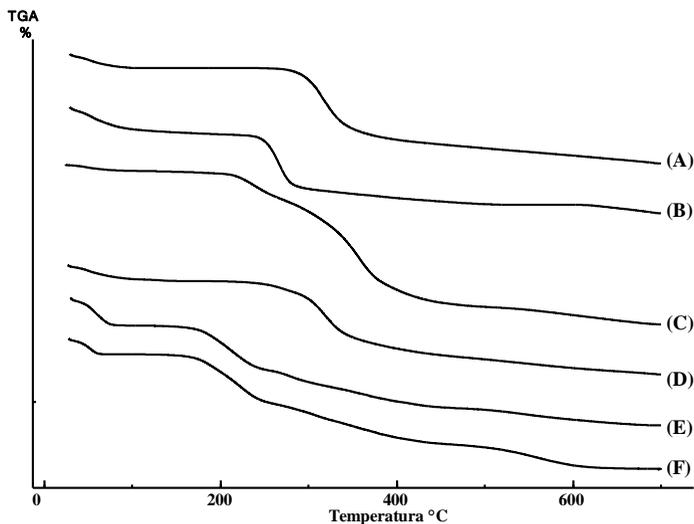


Figura 37. Curvas TG: QUI (A); ALG (B); AG (C); mistura física (D); nanopartículas placebo (E); nanopartículas contendo AG (F).

Na tabela 33 estão descritos os estágios de perda de massa calculados a partir das curvas termogravimétricas. Além disso, através da análise termogravimétrica derivada é possível descrever os valores de temperatura onde ocorre a máxima velocidade de degradação em cada estágio (pico DTG).

Tabela 33. Dados obtidos a partir da análise termogravimétrica derivada.

Amostra	Faixa temperatura (°C)	Perda de massa (%)	Pico DTG (°C)
Ácido glicirrízico	30,0 – 93,0	3,5	45,0
	200,0 – 271,0	16,2	238,0
	271,0 – 700,0	72,9	356,2
Quitosana	30,0 – 128,0	8,0	48,3
	240,0 – 700,0	56,4	318,0
Alginato	30,0 – 116,0	13,7	49,6
	212,0 – 700,0	46,1	265,7
Mistura Física	30,0 – 110,0	11,7	46,8
	110,0 – 155,5	1,8	133,2
	155,5 – 286,5	9,9	269,8
	286,5 – 700,0	44,5	318,7
Nanopartículas placebo	30,0 – 86,3	15,7	61,0
	138,5 – 257,7	26,5	212,2
	257,7 – 700,0	32,1	532,0
Nanopartículas AG	30,0 – 76,5	8,7	50,3
	127,5 – 262,3	29,4	223,6
	262,3 – 700,0	38,4	550,0

Os polímeros QUI e ALG apresentam perfil de degradação com dois estágios de perda de massa, enquanto que o AG e as nanopartículas apresentam três estágios, e a mistura física quatro estágios.

Em todas as amostras, o primeiro estágio está relacionado com a evaporação de água.

A degradação da QUI e do ALG é visualizada pela perda de massa no segundo estágio, iniciando em 240 e 212 °C, respectivamente.

O AG possui um estágio intermediário de perda de massa, iniciando em 180 °C, que confirma a presença de água internamente ligada observada no DSC. A maior perda de massa do fármaco inicia em 271 °C e corresponde a sua degradação.

A mistura física apresenta quatro eventos de perda de massa, que representam uma combinação de eventos observados na análise dos componentes individuais.

Os dados obtidos a partir das curvas termogravimétricas das nanopartículas placebo e contendo AG evidenciam um comportamento diferente do observado nos componentes individuais e na mistura física, exceto pelo primeiro estágio de perda de água. O segundo estágio de perda de massa observado para as duas amostras pode estar atribuído à

perda de água internamente ligada às nanopartículas, resultante da complexação entre os polieletrólitos (CRCAREVSKA; DODOV; GORACINOVA, 2007). A perda de massa que possivelmente corresponde à degradação dos polímeros é visualizada no terceiro estágio iniciando em 257,7 °C para as nanopartículas placebo e em 262,3 °C para as nanopartículas contendo AG.

3.6 ESTUDO DE ESTABILIDADE PRELIMINAR

A estabilidade frente ao armazenamento é fundamental em aplicações farmacêuticas, especialmente em sistemas nanoparticulados.

As partículas estão sujeitas a precipitar espontaneamente após certo tempo em repouso, porém, neste estudo, a aparência da suspensão permaneceu opalescente e sem precipitados. A turbidez e o pH das suspensões não apresentaram variações significativas no período de análise ($p \geq 0,05$).

3.6.1 Teor, eficiência de encapsulação e recuperação de AG

O teor de AG encontrado nas suspensões no tempo zero foi de 109,5 $\mu\text{g/mL} \pm 2,3$ %, enquanto que a recuperação foi de 64,5 % $\pm 1,4$ %. Ao final dos 90 dias de estudo não foram observadas mudanças significativas no teor e recuperação de fármaco, indicando que não ocorreu degradação ($p \geq 0,05$). Na figura 38 pode ser visualizada a variação na eficiência de encapsulação (EE) de fármaco no período de estudo.

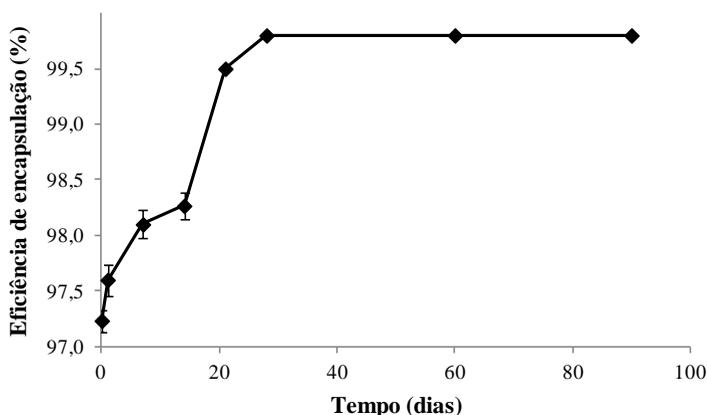


Figura 38. Eficiência de encapsulação de AG no estudo de estabilidade acelerado.

Pode ser visualizado que a EE aumenta até o tempo de 28 dias, atingindo um platô de concentração até o final do estudo, apesar de a análise estatística indicar que esta variação não é significativa. Isto pode estar relacionado ao mecanismo de formação das partículas, pois a interação eletrostática continua ocorrendo enquanto moléculas eletricamente carregadas estiverem disponíveis. Como a QUI está presente em excesso na suspensão, as moléculas de AG restantes podem complexar com os sítios disponíveis da QUI mesmo com a suspensão em repouso.

3.6.2 Tamanho de partícula e potencial zeta

A complexação entre QUI e TPP demonstrou ser instável fisicamente em estudos anteriores. Morris e colaboradores (2011) avaliaram a estabilidade de nanopartículas de QUI e TPP durante 12 meses armazenadas a 4, 25 e 40 °C. Os autores observaram que as formulações armazenadas a 40 °C apresentaram uma diminuição do tamanho de partícula no primeiro mês e, ao final de 6 meses, as partículas haviam desaparecido. Este fenômeno é provocado pela diminuição da massa molar da QUI devido à hidrólise, causando a quebra das cadeias poliméricas resultando na diminuição do tamanho e desintegração. Jang e Lee (2008) também observaram que temperaturas acima de 60 °C resultam em diminuição do tamanho de nanopartículas de QUI. López-Leon e colaboradores (2005) armazenaram nanopartículas de QUI e TPP a 20 °C e verificaram um aumento do tamanho após 7 dias devido ao intumescimento provocado pela presença do TPP. Entretanto, Gan e colaboradores (2005) demonstraram que a gelificação iônica e o crescimento de partículas de QUI e TPP é mantido durante 1 hora após o preparo. Então ocorre um pequeno aumento no tamanho de partícula de 180 para 240 nm nas próximas 24 h, sem agregação das partículas.

Desta forma, neste estudo as formulações foram armazenadas somente a 25 °C para evitar a hidrólise da QUI, que pode ocorrer em altas temperaturas. Na figura 39 podem ser visualizados os resultados de tamanho de partícula e potencial zeta obtidos no estudo de estabilidade acelerada.

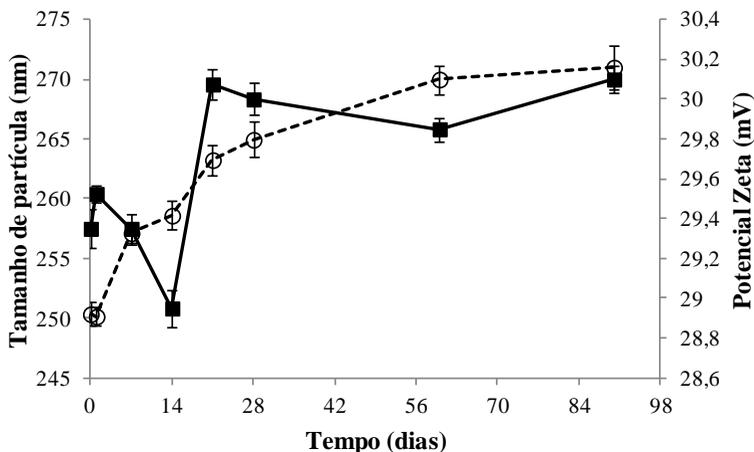


Figura 39. Tamanho de partícula (---○---) e potencial zeta (---■---) das suspensões de nanopartículas contendo ácido glicirrízico submetidas ao estudo de estabilidade acelerada.

Partículas pequenas tendem a aglomerar para reduzir a energia livre na superfície. Por isso o potencial zeta representa um indicativo da estabilidade física, devido à repulsão eletrostática causada na superfície das nanopartículas (FAZIL et al., 2012; RIDOLFI et al., 2012). Os valores de potencial zeta apresentaram alguma variação no período de estudo, porém permaneceram sempre acima de + 29,0 mV, que é considerado ideal para estabilidade electrocinética.

As partículas apresentaram um aumento do tamanho durante os 90 dias, entretanto a análise estatística resultou em uma diferença não significativa ($p \geq 0,05$). Este pequeno aumento pode estar relacionado à faixa de erro do equipamento e as novas interações eletrostáticas que podem ocorrer com o tempo de contato, conforme também foi constatado no resultado de EE. A polidispersão não apresentou mudanças significativas dos valores iniciais ($p \geq 0,05$).

Pelo fato de que os trabalhos encontrados na literatura relatam a instabilidade de nanopartículas de QUI e TPP, é esperado que a presença do ALG pudesse aumentar a estabilidade física das nanopartículas, pois o balanço das forças de interação é fundamental para a estabilização do complexo (TSAI et al., 2011). Como neste estudo de estabilidade acelerada as nanopartículas mantiveram a estabilidade físico-química, sugere-se que o ALG proporcionou uma maior interação eletrostática com a QUI, tornando a estrutura menos suscetível à quebra das ligações.

Entretanto, só será possível afirmar isto após um estudo de estabilidade de longa duração.

3.7 PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO GEL CONTENDO AS NANOPARTÍCULAS DE AG

A base semissólida escolhida para aplicação cutânea foi a de um gel, devido à sua capacidade de aumentar o contato das nanopartículas na pele, e também por formar uma fina camada oclusiva na superfície, aumentando a hidratação (SHAH et al., 2012).

O natrosol[®] é utilizado como agente suspensor, agente de consistência para emulsões, e formador de gel hidrofílico. Possui características de fluido não-newtoniano de caráter pseudoplástico, sendo compatível com a maioria dos materiais não-iônicos, aniônicos, anfotéricos e catiônicos. Além disso, é solúvel em água quente ou fria e tolera uma ampla faixa de pH (KIBBE, 2000). Este agente espessante foi utilizado previamente para preparar um gel contendo nanopartículas poliméricas de ácido flufenâmico (LUENGO et al., 2006), e um gel protetor solar contendo nanocápsulas de benzofenona (SIQUEIRA et al., 2011). A concentração de natrosol[®] utilizada neste trabalho foi de 0,05 % (p/v), com o objetivo de obter um gel fluido de fácil espalhamento.

A característica não-iônica do natrosol[®] foi determinante para sua escolha, uma vez que as nanopartículas desenvolvidas são formadas por interação eletrostática e possuem um potencial zeta positivo, sendo que o uso de um agente espessante aniônico poderia neutralizar estas cargas superficiais. Como as partículas são instáveis sem a camada elétrica superficial poderia ocorrer a sua agregação e consequente desestabilização do sistema (SOUTO et al., 2004).

3.7.1 Características organolépticas

O gel apresentou características organolépticas satisfatórias, com sabor e odor característicos, aspecto homogêneo e de coloração turva/esbranquiçada devido à turbidez inicial das suspensões.

3.7.2 Determinação do pH do gel

O valor médio de pH encontrado foi de $5,05 \pm 0,4$ %, semelhante ao valor de pH da suspensão de nanopartículas. Este valor é considerado compatível com o pH da pele, que varia de 4,0 a 7,0 dependendo da área do corpo (BARATA, 2002; TERROSO et al., 2009).

3.7.3 Determinação do teor de AG no gel

O teor médio de AG encontrado no gel foi de $114,2 \mu\text{g/mL} \pm 2,1 \%$. Como a suspensão de nanopartículas foi utilizada como fase aquosa no preparo do gel, o valor de teor encontrado não apresentou diferenças significativas quando comparado à suspensão inicial (item 3.2.3), indicando que não ocorreu nenhuma degradação do fármaco ou precipitação durante o preparo do gel.

3.7.4 Determinação do tamanho de partícula

A determinação do tamanho de partícula no gel foi realizada pela técnica de espalhamento de luz a fim de detectar a presença das nanopartículas após a formação do gel. A amostra apresentou diâmetro médio de $284,3 \text{ nm} \pm 2,3 \%$, dentro do intervalo obtido para as suspensões de nanopartículas antes da formação do gel (item 3.1.2). Deve ser ressaltado que o diâmetro das nanopartículas contidas no gel é adequado para aplicação de produtos tópicos (GUTERRES; ALVES; POHLMANN, 2007; VERMA et al., 2003).

3.7.5 Determinação do potencial zeta

O valor médio de potencial zeta após a formação do gel foi de $26,7 \text{ mV} \pm 2,1 \%$, similar ao obtido nas suspensões de nanopartículas (item 3.1.3). Este resultado comprova que o uso de um agente suspensor não-iônico não interfere na carga superficial das nanopartículas e mantém a estabilidade física evitando a aglomeração das partículas.

3.7.6 Reologia

A reologia é aplicada na investigação da viscosidade, plasticidade, elasticidade e deformação de materiais sob influência de estresse (GENNARO, 2000). O comportamento reológico de formulações destinadas ao uso tópico pode influenciar na sua espalhabilidade, retenção e tempo de contato com a superfície da pele (BATHEJA et al., 2011). Consequentemente, o estudo da reologia é de fundamental importância para a qualidade final da formulação.

A análise reológica foi realizada submetendo as amostras a taxas de cisalhamento ascendente e descendente. Uma amostra de gel controle (gel placebo) foi preparada dispersando o natrosol® em água. Por outro lado, o gel contendo nanopartículas de AG foi preparado utilizando a própria suspensão como fase aquosa, evitando a necessidade de uma diluição que levaria a uma menor concentração de partículas na formulação final.

A relação entre a tensão e a taxa de cisalhamento está representada graficamente na figura 40.

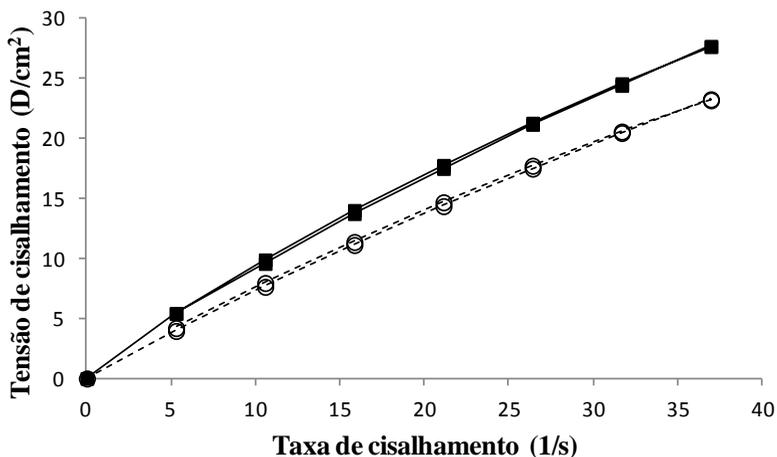


Figura 40. Reogramas médios de taxa de cisalhamento *versus* tensão de cisalhamento de amostras de gel placebo (---■---) e gel contendo nanopartículas de AG (---○---).

De acordo com as curvas de fluxo (figura 40) as amostras apresentam comportamento de fluido não-newtoniano, pois não se verifica uma relação direta entre a tensão de cisalhamento e a taxa de cisalhamento aplicada. Os fluidos não-newtonianos podem assumir três tipos principais de perfil de escoamento: plástico, pseudoplástico ou dilatante (ANSEL; POPOVICH; ALLEN, 2000). Na figura 31 pode ser observado que o material começa a fluir tão logo uma tensão de cisalhamento seja aplicada, onde a inclinação da curva diminui gradualmente com o aumento da velocidade de cisalhamento. Materiais que exibem esse comportamento são ditos pseudoplásticos, sendo encontrado em um grande número de sistemas de interesse na área farmacêutica, tais como suspensões, emulsões e géis, entre outros (AULTON, 2005).

A suspensão de nanopartículas analisada previamente apresentou comportamento dilatante (item 3.1.5), enquanto que o gel contendo as nanopartículas de AG apresenta comportamento pseudoplástico, demonstrando que a forma farmacêutica final determina qual o comportamento de fluxo o fluido exibirá.

O reograma não apresenta *loop* de histerese característico de sistemas tixotrópicos, ou seja, a viscosidade varia em função da taxa de cisalhamento, mas é independente do período de tempo em que a velocidade de cisalhamento é aplicada.

A representação mais satisfatória para caracterizar um material pseudoplástico é através de uma curva de fluxo relacionando a taxa de cisalhamento aplicada com a viscosidade obtida (figura 41).

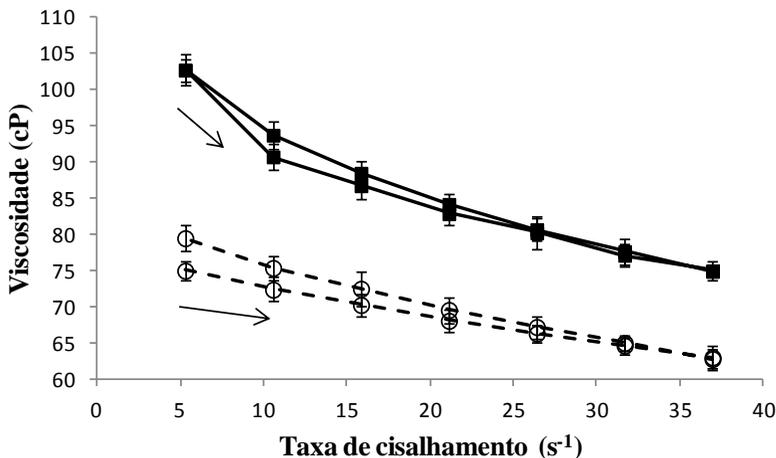


Figura 41. Reogramas médios de taxa de cisalhamento versus viscosidade de amostras de gel placebo (--■--) e gel contendo nanopartículas de AG (--○--).

Pode ser observado que com o aumento da taxa de cisalhamento ocorreu uma diminuição da viscosidade, sendo que com a diminuição da taxa de cisalhamento a viscosidade volta a aumentar devido à característica de fluido pseudoplástico. O uso da suspensão de nanopartículas como fase aquosa no preparo do gel não alterou o comportamento reológico observado no gel placebo, como já observado por outros autores utilizando diferentes nanocarreadores (ALVES; POHLMANN; GUTERRES 2005; MILÃO et al., 2003; FONTANA et al., 2011; SIQUEIRA et al., 2011). Entretanto, a curva descendente do gel contendo nanopartículas de AG não voltou exatamente para sua viscosidade inicial, o que pode ter sido causado pela quebra dos CPes com o cisalhamento, levando a um pequeno aumento na viscosidade final devido ao efeito “eletroviscoso” de polieletrólitos diluídos, que

resulta da expansão espacial do volume hidrodinâmico das moléculas de polieletrólitos (ZOHNG et al., 2010).

A característica de fluido pseudoplástico foi comprovada através do emprego da equação da lei da potência (modelo de Ostwald), onde foi verificado que o valor de n (índice de fluxo) é menor que 1 para todas as amostras. O comportamento pseudoplástico é desejável em processos onde a viscosidade em fluxo deve ser menor que a viscosidade em repouso, possibilitando que produtos de aplicação tópica sejam embalados em frascos e assegurando a sua permanência na pele após a aplicação. Desta forma, o sistema apresentou um comportamento reológico adequando à sua aplicação.

Como observado na figura 32, nenhuma parte da curva é linear, então a viscosidade média não pode ser expressa por um único valor, o que leva a determinação de uma viscosidade aparente para cada valor de taxa de cisalhamento (AULTON, 2005). Para atribuir um valor médio de viscosidade aparente para cada formulação foi utilizado o valor de viscosidade obtido no ponto de máximo cisalhamento (37 s^{-1}). Pode ser observado que o gel placebo é significativamente mais viscoso ($75,0 \text{ cP} \pm 0,84 \%$) do que o gel contendo as nanopartículas de AG ($63,0 \text{ cP} \pm 1,2 \%$) ($p \leq 0,05$). Resultados similares foram obtidos por outros autores após incorporação de nanocarreadores em formulações semissólidas (ALVES; POHLMANN; GUTERRES, 2005; BOOULMEDARAT et al., 2003; PAVELIC; SKALKO-BASNET; SCHUBERT, 2001). Provavelmente, o fato de o gel ser preparado com a própria suspensão de nanopartículas como fase aquosa limitou a capacidade de intumescimento do natrosol[®], resultando em uma menor viscosidade.

3.7.7 Morfologia

A fotomicrografia do gel contendo as nanopartículas de AG, obtidas por microscopia eletrônica de transmissão (MET) pode ser visualizada na figura 42.

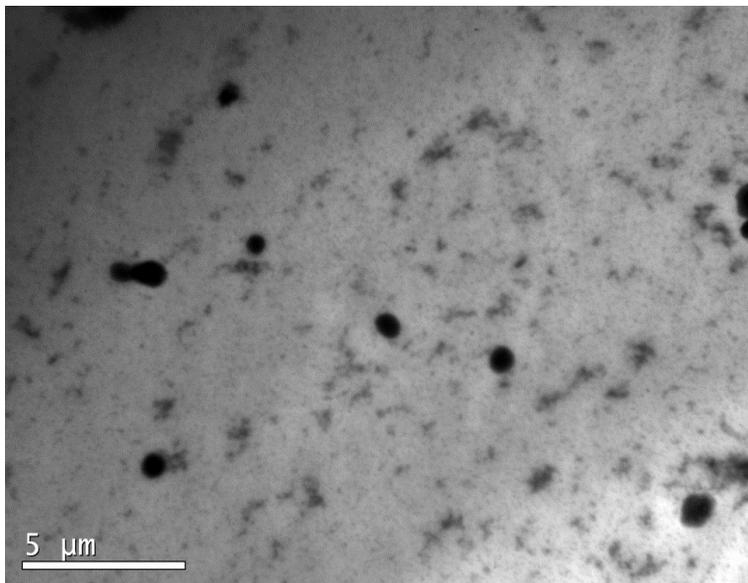


Figura 42. Fotomicrografia obtida por MET de gel contendo nanopartículas de AG.

Apesar da presença da matriz polimérica do natrosol[®] no meio, é possível visualizar as nanopartículas intactas dispersas no gel, comprovando que a técnica de preparo e o uso de um agente espessante não-iônico foram capazes de manter a morfologia inicial das nanopartículas.

4 CONCLUSÕES

A formulação AG 3_{pH 5,0} apresentou menor valor de T % e maior valor de kcps, o que significa maior turbidez da suspensão de nanopartículas. Conforme observado anteriormente com as nanopartículas placebo, o tamanho de partícula depende do pH da solução de QUI, e a reticulação provocada pelo TPP diminui o tamanho de partícula. Além disso, a interação da QUI com o ALG é fundamental para obter uma menor polidispersão. A presença de AG reduziu significativamente o tamanho de partícula. As suspensões de nanopartículas apresentaram características de fluido não-newtoniano dilatante, sendo que a formulação AG 3_{pH 5,0} apresentou menor valor de viscosidade em comparação com sua respectiva formulação placebo. A

avaliação da concentração de AG demonstrou que o sistema desenvolvido possui uma limitação quanto à quantidade de fármaco capaz de ser eficientemente encapsulada, sendo selecionado o AG na concentração de 1,0 mg/mL. Na análise morfológica foi observado que as nanopartículas (AG 3_{pH 5,0}) são esféricas e compactas, com uma superfície mais densa do que as nanopartículas placebo. A interação entre os polieletrólitos e o AG foi confirmada através de análises de espectroscopia de infravermelho, calorimetria exploratória diferencial e termogravimetria. A suspensão de nanopartículas de AG demonstrou estabilidade físico-química durante 90 dias armazenada a 25 °C. As nanopartículas foram incorporadas com sucesso em um gel para aplicação tópica, onde mantiveram suas características físico-químicas iniciais. O gel contendo as nanopartículas apresentou características de fluido não-newtoniano pseudoplástico.

5 REFERÊNCIAS

ABREU, F.; BIANCHINI, C.; FORTE, M.; KIST, T. Influence of the composition and preparation method on the morphology and swelling behavior of alginate–chitosan hydrogels. **Carbohydrate Polymers**, v. 74, p. 283–289, 2008.

AELENEI, N.; POPA, M. I.; NOVAC, O.; LISA, G.; BALAITA, L. Tannic acid incorporation in chitosan-based microparticles and in vitro controlled release. **Journal of Material Science: Materia Medica**, v. 20, p.1095–1102, 2009.

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

ANITHA, A.; DEEPAGAN, V.V.; RANI, A.; MENON, D.; NAIR, S.; JAYAKUMAR, R. Preparation, characterization, in vitro drug release and biological studies of curcumin loaded dextran sulphate–chitosan nanoparticles. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, p. 1158–1164, 2011.

ANSEL, H.C.; POPOVICH, N.G.; ALLEN, L.V. **Farmacotécnica: Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos**. 6 ed., São Paulo: Editorial Premier, 2000, p. 398-400.

AULTON, M.E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2 ed., São Paulo: Artmed, 2005. 677 p.

BARATA, E.A.F. **A Cosmetologia: Princípios básicos**. São Paulo: Tecnopress, 2002. P. 19.

BARBAS, C.; GARCIA, A.; SAAVEDRA, L.; CASTRO, M. Optimization and validation of a method for the determination of caffeine, 8-chlorotheophylline and diphenhydramine by isocratic high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 870, p. 97–103, 2000.

BATHEJA, P.; SHEIHET, L.; KOHN, J.; SINGER, A.; MICHNIAK-KOHN, B. Topical drug delivery by a polymeric nanosphere gel:

Formulation optimization and in vitro and in vivo skin distribution studies. **Journal of Controlled Release**, v. 149, p. 159–167, 2011.

BHUMKAR, D. & POKHARKAR, V. Studies on Effect of pH on Cross-linking of Chitosan With Sodium Tripolyphosphate: A Technical Note. **AAPS PharmSciTech**, v. 7, n. 2, 2006.

BOONSONGRIT, Y.; MITREVEJ, A.; MUELLER, B. Chitosan drug binding by ionic interaction. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 62, p. 267–274, 2006.

BOOULMEDARAT, L.; GROSSIORD, J. L.; FATTAL, E.; BOCHOT, A. Influence of methyl-B-cyclodextrin and liposomes on rheological properties of Carbopol 974 NF gels. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 254, p. 59–64, 2003.

BRASIL. Ministério da saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVS - **Portaria 899, de 29 de maio de 2003**. Disponível em <<http://www.anvisa.gov.br/>> Acesso em 02 de abril de 2011.

CAFAGGI, S.; RUSSO, E.; STEFANI, R.; LEARDI, R.; CAVIGLIOLI, G.; PARODI, B.; BIGNARDI, A.; DE TOTERO, B.; AIELLO, C.; VIALE, M. Preparation and evaluation of nanoparticles made of chitosan or N-trimethyl chitosan and a cisplatin–alginate complex. **Journal of Controlled Release**, v. 121, p. 110–123, 2007.

COPPI, G. & IANNUCELLI, V. Alginate/chitosan microparticles for tamoxifen delivery to the lymphatic system. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 367, p. 127–132, 2009.

CRCAREVSKA, M. S.; DODOV, M. G.; GORACINOVA, K. Chitosan coated Ca–alginate microparticles loaded with budesonide for delivery to the inflamed colonic mucosa. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 68, p. 565–578, 2008.

DAS, R.C.; KASOJU, N.; BORA, U. Encapsulation of curcumin in alginate-chitosan-pluronic composite nanoparticles for delivery to cancer cells. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 6, p. 153–160, 2010.

FAZIL, M.; SHADAB, S.; HAQUE, S.; KUMAR, M.; BABOOTA, S.; SAHNI, J.; ALI, J. Development and evaluation of rivastigmine loaded chitosan nanoparticles for brain targeting. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 47, p. 6–15, 2012.

FONTANA, M. C.; REZER, J.; CORADINI, K.; LEAL, D.; BECK, R. Improved efficacy in the treatment of contact dermatitis in rats by a dermatological nanomedicine containing clobetasol propionate. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 79, p. 241–249, 2011.

GAN, Q. & WANG, T. Chitosan nanoparticle as protein delivery carrier—Systematic examination of fabrication conditions for efficient loading and release. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 59, p. 24–34, 2007.

GAN, Q.; WANG, T.; COCHRANE, C.; MCCARRON, P. Modulation of surface charge, particle size and morphological properties of chitosan-TPP nanoparticles intended for gene delivery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 44, p. 65–73, 2005.

GENNARO, A. R. **Rheology in Remington: the science and practice of pharmacy**, Schott, H. ed. Philadelphia, 2000.

GUTERRES, S.S.; ALVES, M.P.; POHLMANN, A.R. Polymeric nanoparticles, nanospheres and nanocapsules for cutaneous applications. **Drug Target Insights**, v. 2, p. 147–157, 2007.

HO, Y.; MI, F.; SUNG, H.; KUO, P. Heparin-functionalized chitosan–alginate scaffolds for controlled release of growth factor. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 376, p. 69–75, 2009.

HUANG, W.; WANG, W.; WANG, P.; ZHANG, C.; TIAN, Q.; ZHANG, Y.; WANG, X.; CHA, R.; WANG, C.; YUAN C. Glycyrrhetic acid-functionalized degradable micelles as liver-targeted drug carrier. **Journal of Material Sciences: Materials in Medicine**, v. 22, p. 853, 2011.

ICH- International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human use:

Q2(R1)-Validation of Analytical procedures: text and methodology, 2005.

JANG, K. I. & LEE, H. G. Stability of chitosan nanoparticles for l-ascorbic acid during heat treatment in aqueous solution. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 1936–1941, 2008.

Ji, J.; HAO, S.; WU, D.; HUANG, R.; XU, Y. Preparation, characterization and in vitro release of chitosan nanoparticles loaded with gentamicin and salicylic acid. **Carbohydrate Polymers**, v. 85, p. 803, 2011.

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

KUZNETSOVA, E. G.; KURYLEVA, O. M.; SALOMATINA, L. A.; SEVAST'YANOV, V. I. Matrix Transdermal Systems for Caffeine Delivery Based on Polymer and Emulsion Compounds. **Biomedical Engineering**, v. 42, p. 141, 2008.

LANÇAS, F. M. **Cromatografia Líquida Moderna**. 1 ed. Ed. Átomo, 2009, 382 p.

LÓPEZ-LEÓN, T.; CARVALHO, E. L. S.; SEIJO, B.; ORTEGA-VINUESA, J. L.; BASTOS-GONZÁLEZ, D. Physicochemical characterization of chitosan nanoparticles: Electrokinetic and stability behavior. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 283, p. 344–351, 2005.

LUENGO, J.; WEISS, B.; SCHNEIDER, M.; EHLERS, A.; STRACKE, F.; KÖNIG, K.; KOSTKA, K.H.; LEHR, C.M; SCHAEFER, U.F. Influence of nanoencapsulation on human skin transport of flufenamic acid. **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 19, p. 190–7, 2006.

MILÃO, D.; KNORST, M.; RICHTER, W.; GUTERRES, S. Hydrophilic gel containing nanocapsules of diclofenac: development, stability study and physico-chemical characterization. **Pharmazie**, v. 58, p. 325-9, 2003.

MORRIS, G.A.; CASTILE, J.; SMITH, A.; ADAMS, G.; HARDING, S.E. The effect of prolonged storage at different temperatures on the

particle size distribution of tripolyphosphate (TPP) – chitosan nanoparticles. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, p. 1430–1434, 2011.

NAM, J.; CHOI, C.; JANG, M.; JEONG, Y.; NAH, J. Insulin-incorporated Chitosan Nanoparticles Based on Polyelectrolyte Complex Formation. **Macromolecular Research**, v. 18, n. 7, p. 630-635, 2010.

NICOLI, S.; COLOMBO, P.; SANTI, P.; Release and Permeation Kinetics of Caffeine From Bioadhesive Transdermal Films. **AAPS Journal**, v. 7, p. 20, 2005.

PARVEEN, S.; MITRA, M.; KRISHNAKUMAR, S.; SAHOO, S.K. Enhanced antiproliferative activity of carboplatin-loaded chitosan–alginate nanoparticles in a retinoblastoma cell line. **Acta Biomaterialia**, v. 6, p. 3120–3131, 2010.

PAVELIC, Z.; SKALKO-BASNET, N.; SCHUBERT, T. Liposomal gels for vaginal drug delivery. **International Journal of Pharmaceuticals**, v. 219, p. 139-149, 2001.

PIYAKULAWAT, P.; PRAPHAIRAKSIT, N.; CHANTARASIRI, N.; MUANGSIN, N. Preparation and Evaluation of Chitosan/Carrageenan Beads for Controlled Release of Sodium Diclofenac. **AAPS PharmSciTech**, v. 8, n. 4, 2007.

QUIJADA-GARRIDO, I., IGLESIAS-GONZÁLEZ, V.; MAZÓN, J.; BARRALES-RIENDA, J. The role played by the interactions of small molecules with chitosan and their transition temperatures. Glass-forming liquids: 1,2,3-propantriol (glycerol). **Carbohydrate Polymers**, v. 68, p. 173-186, 2007.

RIDOLFI, D. M.; MARCATO, P. D.; JUSTO, G. Z.; CORDI, L.; MACHADO, D.; DURÁN, N. Chitosan-solid lipid nanoparticles as carriers for topical delivery of tretinoin. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 93, p. 36–40, 2012.

SAETHER, H.; HOLME, H.; MAURSTAD, G.; BJØRN, T.; STOKKE, H. Polyelectrolyte complex formation using alginate and chitosan. **Carbohydrate Polymers**, v. 74, p. 813–821, 2008.

SANKALIA, M.G.; MASHRU, R.C.; SANKALIA, J.M.; SUTARIYA, V.B. Reversed chitosan–alginate polyelectrolyte complex for stability improvement of alpha-amylase: Optimization and physicochemical characterization. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 65, p. 215–232, 2007.

SHAH, P.; DESAI, P.; PATEL, A.; SINGH, M. Skin permeating nanogel for the cutaneous co-delivery of two anti-inflammatory drugs. **Biomaterials**, v. 33, p. 1607-1617, 2012.

SHEN, S.; CHANGA, Z.; LIUA, J.; SUNA, X.; HUA, X.; LIU, H. Separation of glycyrrhizic acid and liquiritin from *Glycyrrhiza uralensis* Fisch extract by three-liquid-phase extraction systems. **Separation and Purification Technology**, v. 53, p. 216–223, 2007.

SHOU, M.; GALINADA, W. A.; CHIENWEI, Y.; TANG, Q.; MARKOVICH, R. J.; RUSTUM, A. M. Development and validation of a stability-indicating HPLC method for simultaneous determination of salicylic acid, betamethasone dipropionate and their related compounds in Diprosalic Lotion®. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 50, p. 356–361, 2009.

SINGH, K.; SURI, A.; TIWARY, A.; RANA, V. Chitosan films: crosslinking with EDTA modifies physicochemical and mechanical properties. **Journal of Material Science: Materia Medica**, v. 23, p. 687-95, 2012.

SIQUEIRA, N. M.; CONTRI, R. V.; PAESE, K.; BECK, R. C. R.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Innovative Sunscreen Formulation Based on Benzophenone-3-Loaded Chitosan-Coated Polymeric Nanocapsules. **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 24, p. 166-174, 2011.

SOUTO, E. B.; WISSING, S. A.; BARBOSA, B.; MULLER, R. H. Evaluation of the physical stability of SLN and NLC before and after incorporation into hydrogel formulations. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 58, p. 83–90, 2004.

SUI, X.; WEI, W.; YANG, L.; ZU, Y.; ZHANG, L.; YANG, F.; ZHANG, Z. Preparation, characterization and in vivo assessment of the bioavailability of glycyrrhizic acid microparticles by

supercritical anti-solvent process. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 423, p. 471–479, 2012.

SUN, C.; XIE, Y.; TIAN, Q.; LIU, H. Separation of glycyrrhizic acid and liquiritin from licorice root by aqueous nonionic surfactant mediated extraction. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical Engineering Aspects**, v. 305, p. 42–47, 2007.

TERROSO, T.; KÜLKAMP, I.; JORNADA, D.; POHLMANN, A.; GUTERRES, S. S. Development of Semi-Solid Cosmetic Formulations Containing Coenzyme Q10-Loaded Nanocapsules. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 28, p. 819-26, 2009.

TIAN, Q.; WANG, W.; HE, X. T. Glycyrrhetic acid-modified chitosan/poly(ethylene glycol) nanoparticles for liver-targeted delivery. **Chinese Science Bulletin**, v. 54, p. 3121, 2009.

TSAI, M.; CHEN, R.; BAI, S.; CHEN, W. The storage stability of chitosan/tripolyphosphate nanoparticles in a phosphate buffer. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, p. 756-761, 2011.

VERMA, D. D.; VERMA, S.; BLUME, G.; FAHR, A. Particle size of liposomes influences dermal delivery of substances into skin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 258, (1-2), p. 141-151, 2003.

WANG, L.; KHOR, E.; LIM, L. Chitosan-Alginate-CaCl₂ System for Membrane Coat Application. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 90, n. 8, 2001.

YAPAR, E.; KAYAHAN, S.; BOZKURT, A.; TOPPARE, L. Immobilizing cholesterol oxidase in chitosan–alginate network. **Carbohydrate Polymers**, v. 76, p. 430–436, 2009.

ZHENG, Y.; WU, Y.; YANG, W.; WANG, C.; FU, S.; SHEN, X. Preparation, Characterization, and Drug Release In Vitro of Chitosan-Glycyrrhetic Acid Nanoparticles. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 95, n. 1, 2006.

ZHENG, H.; ZHANG, X.; XIONG, F.; ZHU, Z.; LU, B.; YIN, Y.; XU, P.; DU, Y.; In vitro characterization, and in vivo studies of crosslinked

lactosaminated carboxymethyl chitosan nanoparticles. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, p. 1139, 2011.

ZOHRI, M.; ALAVIDJEH, M.; HARIRIAN, I.; ARDESTANI, M.; EBRAHIMI, S.; SANI, H.; SADJADI, S. A Comparative Study Between the Antibacterial Effect of Nisin and Nisin-Loaded Chitosan/Alginate Nanoparticles on the Growth of *Staphylococcus aureus* in Raw and Pasteurized Milk Samples. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 2, p. 258-266, 2010.

CAPÍTULO IV

AVALIAÇÃO DA PERMEAÇÃO E RETENÇÃO CUTÂNEA DE NANOPARTÍCULAS PREPARADAS COM QUITOSANA, ALGINATO E ÁCIDO GLICIRRÍZICO

1 INTRODUÇÃO

O ácido glicirrízico (AG) é um fármaco que possui diversas atividades farmacológicas podendo ser administrado por via oral e topicamente (AFNAN et al., 2012; CAPELLA & FINZI, 2003; SHWARZ & CSUK, 2010; TRIPATHI & SINGH, 2009; WANG et al., 2011). Dependendo do objetivo terapêutico de determinada preparação, é necessária uma maior ou menor penetração do ativo nas diferentes camadas, pois isto permite o acesso a sistemas orgânicos e enzimas específicos.

Uma baixa absorção sistêmica para o composto ativo é interessante quando se almeja uma ação local, sendo ideal para uma formulação de AG para o uso como anti-inflamatório, antioxidante e antiviral. Como por exemplo, a permeação cutânea de glicirrizinato de amônio (sal do AG) encapsulado em etossomas foi avaliada para aplicação tópica no tratamento de afecções inflamatórias. Estes carreadores são vesículas formuladas com fosfatidilcolina e etanol. Os autores observaram um aumento da permeação do fármaco com o uso de etossomas e, conseqüentemente, o efeito anti-inflamatório do fármaco foi aumentado em modelo *in vivo* de eritema. Além disso, ocorreu um maior acúmulo do fármaco na pele, causado por uma liberação controlada, o que prolongou a sua atividade terapêutica (PAOLINO et al., 2005). Lipossomas contendo glicirrizinato de potássio, composto obtido por extração aquosa de raízes de alcaçuz que é utilizado como anti-inflamatório tópico, limitaram o efeito transdérmico do fármaco, que permaneceu retido na pele (TROTTA et al., 2002). Por outro lado, Harwansh e colaboradores (2011) obtiveram efeito transdérmico de AG a partir de nanoemulsões, com liberação prolongada do fármaco. Os autores relatam que a concentração de surfactantes utilizados na formulação afeta a liberação modificando a atividade termodinâmica do fármaco. Além disso, o tamanho das partículas e a viscosidade foram parâmetros fundamentais na permeação pela pele.

A encapsulação de fármacos em sistemas nanoparticulados com quitosana (QUI) é uma estratégia geralmente adotada para aumentar a permeação e/ou a retenção cutânea, uma vez que este biopolímero apresenta propriedades favoráveis que incluem baixa toxicidade, biocompatibilidade, biodegradabilidade e bioadesão (LERTSUTTHIWONG; ROJSITTHISAK; NIMMANNIT, 2009; SHAH et al., 2012). As cargas positivas da QUI podem interagir com os ácidos graxos livres presentes no estrato córneo através de interações eletrostáticas, afetando a penetração de fármacos pela pele (KIM et al.,

2010; SHIN et al., 2012). Ainda que compostos/fármacos geralmente tem sua permeação reforçada após interação com a QUI, o contrário também pode ser observado, particularmente nos casos em que há interação forte entre ativo e QUI. Uma vez que o AG interage eletrostaticamente com a QUI, como observado previamente (capítulo 3), neste estudo é esperado um efeito local com mínima absorção sistêmica.

1.1 AVALIAÇÃO DA PERMEACÃO E RETENÇÃO CUTÂNEA

O desenvolvimento de formulações dermatológicas exige estimativas prévias da taxa e da extensão de penetração do(s) composto(s) e adjuvante(s), através da pele. Modelos *in vivo* e *ex vivo* podem ser utilizados com este propósito (MUHAMMAD & RIVIERE, 2006). Considerando-se as dificuldades éticas e econômicas associadas à realização de ensaios clínicos, diferentes modelos animais têm sido desenvolvidos com o intuito de estimar a permeação cutânea em humanos. Embora a estrutura básica da pele humana seja similar a de muitos mamíferos, diferenças intra e inter-espécies são observáveis, tanto relativas à espessura da epiderme e da derme, quanto aos apêndices (MONTEIRO-RIVIERE, 1991).

Dentre os modelos animais, a pele de porco tem sido amplamente utilizada em função da sua similaridade estrutural e funcional com a pele humana, aliada à praticidade de obtenção deste material em abatedouros. Características comuns entre as peles humana e suína incluem a distribuição esparsa dos pelos, pigmentação e vascularização, bem como composição lipídica e propriedades biofísicas do estrato córneo (HASANOVIC et al., 2011; MUHAMMAD & RIVIERE, 2006). Diversos estudos demonstraram que a permeação de fármacos é bastante similar entre ambas (CHANG et al., 1994; HERKENNE et al., 2006; SCHMOOK et al., 2001).

1.1.1 Modelo de difusão da câmara de Franz

O modelo de difusão da câmara de Franz (figura 43), também chamado de modelo estático, tem ampla aplicabilidade em estudos de permeabilidade e permeação *in vitro* (FRANTZ, 1990). Após o preparo do tecido (seccionamento da porção de interesse), este é colocado entre dois compartimentos, denominados de compartimento doador (ou superior) e receptor (ou inferior). O estrato córneo da pele encontra-se voltado para o compartimento doador, enquanto que a derme para o receptor. O compartimento receptor é preenchido com uma solução,

geralmente tamponante, evitando-se a formação de bolhas, já que as mesmas podem alterar a área de difusão. No compartimento superior é colocada uma solução do fármaco ou a solução a ser testada. Os experimentos são realizados geralmente a 37° C (temperatura corporal), sob agitação constante e controlada. Alíquotas da solução receptora são coletadas, em diferentes tempos, e efetua-se a quantificação do fármaco ou adjuvante farmacêutico. As metodologias para quantificação mais utilizadas são técnicas espectrofotométricas e cromatográficas. Finalmente, os parâmetros de permeabilidade são calculados (FORSTER et al., 2009; KORTING & SCHAFFER-KORTING, 2010).

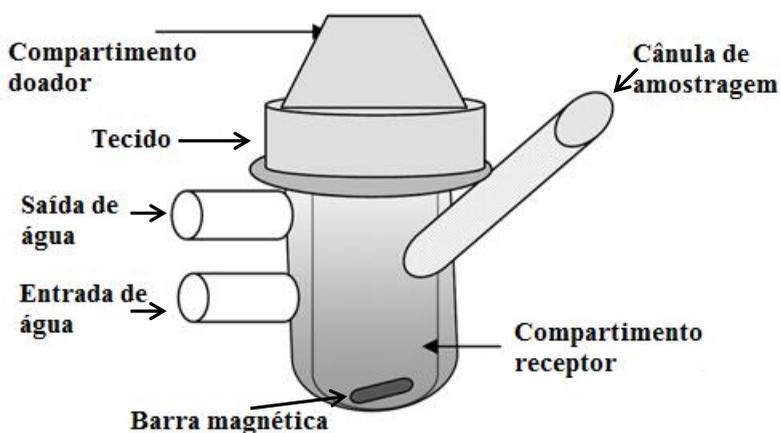


Figura 43. Esquema representativo da câmara de difusão de Franz (adaptado de Sassi et al., 2011).

2 METODOLOGIA

2.1 REVALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO (CLAE) UTILIZADO PARA QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDO GLICIRRÍZICO EM AMOSTRAS DE PELE

O método analítico utilizado para quantificação de ácido glicirrízico no estudo de permeação e retenção cutânea (TAGLIARI et al., 2012) foi revalidado de acordo com a ICH (2005) através da análise dos seguintes parâmetros: especificidade, linearidade, exatidão, precisão, e limites de quantificação e detecção.

As análises foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando um cromatógrafo Shimadzu LC-10A (Kyoto, Japão), equipado com bombas LC-10AD, detector UV/VIS SPD-10AV_{VP}, unidade de controle SCL-10AV_{VP} e auto-injetor Jasco AS-2055 Plus.

Para quantificação do ácido glicirrízico (AG) foi utilizada uma coluna de fase reversa C₁₈ Phenomenex Luna (250 mm x 4,6 mm, 5 µm) e o sistema mantido à temperatura de 25 ± 1 °C. Uma pré-coluna (4,0 mm x 3,0 mm) foi utilizada para proteger a coluna analítica.

A fase móvel consistiu numa mistura de metanol:tampão fosfato de potássio 0,025 M (60:40 v/v) adicionada de 5 mM de tetrabutilamônio de sódio. As análises foram realizadas em modo isocrático, com fluxo de 1,2 mL/min, detecção UV a 254 nm e volume de injeção de 50 µL. As áreas dos picos foram integradas automaticamente através do *software* Shimadzu Class VP® V 6.14.

2.1.1 Especificidade

Para confirmar a especificidade do método, uma solução contendo somente pele foi analisada nas mesmas condições experimentais das amostras na presença do fármaco.

2.1.2 Linearidade, e limites de detecção (LD) e quantificação (LQ)

A linearidade foi determinada através da construção de três curvas de calibração em três dias diferentes. Para a construção de cada curva de calibração seis concentrações de fármaco (1,0; 3,0; 5,0; 10,0; 15,0 e 20,0 µg/mL) foram preparadas em fase móvel. Foram realizadas três injeções de 50 µL de cada solução para verificar a repetibilidade da resposta do detector em cada concentração. As áreas de pico dos cromatogramas foram plotadas *versus* as concentrações padrão para obter as curvas de calibração. As áreas obtidas de cada concentração foram submetidas à análise de regressão pelo método dos mínimos quadrados para calcular a equação da reta e o coeficiente de correlação.

O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) foram calculados a partir da inclinação e do desvio padrão do intercepto da média de três curvas de calibração.

2.1.3 Precisão e exatidão

A precisão foi determinada por meio da repetibilidade (intra-dia) e precisão intermediária (inter-dia) utilizando soluções obtidas no estudo

de permeação cutânea. Após o estudo de permeação, a pele foi retirada e a área central foi picotada e dissolvida em 3 mL de metanol. Esta solução foi mantida em repouso por 24 h e uma alíquota foi retirada para quantificar o fármaco retido na pele. Esta solução foi contaminada com uma solução padrão de AG (5,0 µg/mL) e analisada 6 vezes a fim de estabelecer a repetibilidade do método. Na precisão intermediária as análises foram realizadas em três dias diferentes. As áreas dos picos obtidas foram comparadas e a precisão foi expressa em porcentagem como desvio padrão relativo (DPR %).

Para a análise da exatidão do método, as amostras de pele foram contaminadas com concentrações conhecidas de AG (4,0, 5,0 e 6,0 µg/mL) e a porcentagem de recuperação de fármaco foi calculada.

2.2 OBTENÇÃO DA PELE DE ORELHA SUÍNA

As orelhas foram obtidas em um matadouro situado na cidade de Antônio Carlos (SC), tendo sido armazenadas em tampão Krebs¹, a 4 °C, até o seu processamento. Inicialmente, as orelhas foram lavadas com água destilada, os pêlos foram cortados com tesoura, tendo sido selecionadas as partes íntegras, livres de lesões ou manchas. Com auxílio de pinça anatômica, bisturi e tesoura, procedeu-se à dissecação extraindo conjuntamente derme e epiderme, descartando a hipoderme (tecidos subcutâneos e gordurosos subjacente à derme). Após fragmentação, as amostras dissecadas de pele foram acondicionadas em papel alumínio e armazenadas a -80 °C, imersas em solução tampão de Krebs, até o momento da utilização. O período de armazenamento variou entre um e dois meses. O descongelamento foi realizado à temperatura ambiente (25 °C), com adição da solução tampão de Krebs.

2.3 AVALIAÇÃO DA PERMEAÇÃO E/OU RETENÇÃO CUTÂNEA DE AG

Esta etapa foi realizada no Laboratório de Virologia Aplicada (LVA) da UFSC, executada pelo doutorando Thiago Caon, sob supervisão da Prof^a Dr^a Cláudia Maria Oliveira Simões.

As câmaras de Franz foram alocadas no banho termostatizado (37 °C) com agitação multiponto (Dist). O compartimento receptor foi preenchido com 10 mL de tampão PBS:etanol (70:30 V/V). O tecido foi

¹Solução tampão de Krebs: NaCl (20mM); KCl (4,7mM); KH₂PO₄ (1,2mM); NaHCO₃ (25mM); CaCl₂ (2,5mM); MgCl₂ (1mM); glicose (5,5mM), pH 7,4.

disposto na interface dos compartimentos da câmara de Franz e o sistema de agitação foi acionado (800 RPM).

No compartimento doador foram depositados 2,0 mL de cada amostra: solução aquosa de AG ($1.100 \pm 0,6 \mu\text{g/mL}$), suspensão de nanopartículas ($112,1 \pm 0,9 \mu\text{g/mL}$), além do gel contendo nanopartículas ($114,2 \pm 1,1 \mu\text{g/mL}$).

No experimento com a solução de AG (SAG), a primeira coleta foi realizada após 12 h, com duração total de 24 h, enquanto que nas amostras contendo a suspensão de nanopartículas (SNP) e gel contendo nanopartículas (GNP) o tempo total de experimento foi estendido para 36 h. Em intervalos regulares de 2 h, alíquotas de 400 μL da solução receptora foram retiradas pela cânula de amostragem lateral (com reposição de quantidade equivalente de solução) e imediatamente armazenadas a -20°C .

Para a quantificação de AG, as amostras foram secas sob vácuo durante 12 h (speed vac[®]) e ressuspendidas em 200 μL de fase móvel. A seguir foram agitadas em aparato do tipo vortex[®] por 5 min, centrifugadas por igual período e analisadas através de CLAE utilizando método previamente validado.

Quando o fármaco atingiu o compartimento receptor em níveis quantificáveis, cálculos dos tempos de latência (L_T), dos fluxos constantes (J) e dos coeficientes de permeabilidade (P) foram realizados através de equações pautadas nas Leis de Fick, incluindo a plotagem gráfica das quantidades permeadas ($\mu\text{g/cm}^2$) em função do tempo. O estado de fluxo constante (J) foi obtido pelo coeficiente angular da reta que relaciona a quantidade permeada ($\mu\text{g/cm}^2$) em função do tempo (h) (MASHRU et al., 2005). O tempo de latência (T_L) foi calculado a partir da extrapolação da linha do estado estacionário (BARRY, 2002) e o coeficiente de permeabilidade foi obtido da relação entre o fluxo e concentração inicial no compartimento doador.

A retenção do AG na epiderme e na derme foi avaliada após 24 e 36 h do início do experimento. As amostras de pele foram retiradas do equipamento e lavadas com solução tampão PBS:etanol para remover o excesso de fármaco da superfície da epiderme. Com auxílio de bisturi e pinça anatômica a epiderme foi cuidadosamente separada da derme e apenas a região central, equivalente à área de permeação, foi recortada e picotada. Os fragmentos de derme e epiderme gerados foram colocados separadamente em tubos contendo 3,0 mL de metanol (líquido extrator) e mantidos em repouso por 24 h. Após este período, os tubos contendo as amostras foram submetidos à agitação (Vortex[®], 5 min) para o rompimento das células e aumento da eficiência de extração. Os restos

celulares, proteínas e outros interferentes foram removidos através de filtração, e as amostras foram centrifugadas e quantificadas por CLAE.

2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os experimentos foram realizados com, no mínimo, três repetições independentes. A comparação entre os diferentes valores de fluxo, de tempo de latência e os coeficientes de permeabilidade obtidos foi realizada por análise de variância (ANOVA), incluindo testes de comparações múltiplas (SNK). Diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

3 RESULTADOS

3.1 REVALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO (CLAE) UTILIZADO PARA QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDO GLICIRRÍZICO EM AMOSTRAS DE PELE

O cromatograma da solução contendo amostra de pele sem a presença de fármaco está apresentado na figura 44. Na região em que ocorre a absorção do AG (tempo de retenção de 20 minutos) não é visualizada interferência dos componentes da pele, comprovando a especificidade do método.

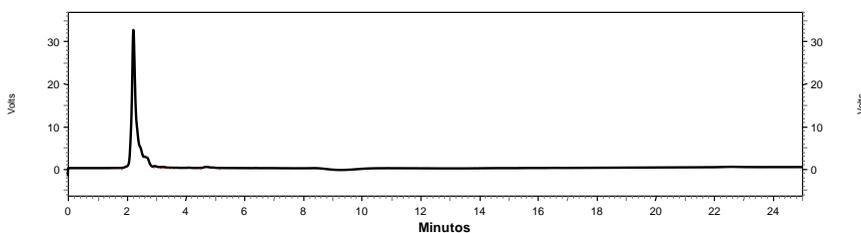


Figura 44. Cromatograma obtido após análise por CLAE de amostra de pele sem a presença de fármaco. Fase móvel constituída por metanol:tampão fosfato de potássio 25,0 mM (60:40 v/v) adicionada de 5,0 mM de tetrabutilamônio de sódio sob fluxo de 1,2 mL/min e detecção UV a 254 nm.

A linearidade da resposta do detector foi calculada para várias soluções padrão na faixa de 1,0 – 20,0 $\mu\text{g/mL}$. A equação média obtida a partir da reta foi $y = 21835x - 1389$ e o coeficiente de correlação (r)

igual a 1,0, indicando a linearidade da curva de calibração (figura 45). A validade do ensaio foi confirmada por análise de variância, ANOVA ($F_{\text{calculado}} = 153719 > F_{\text{crítico}} = 2,5 \times 10^{-10}$; $p \leq 0,05$).

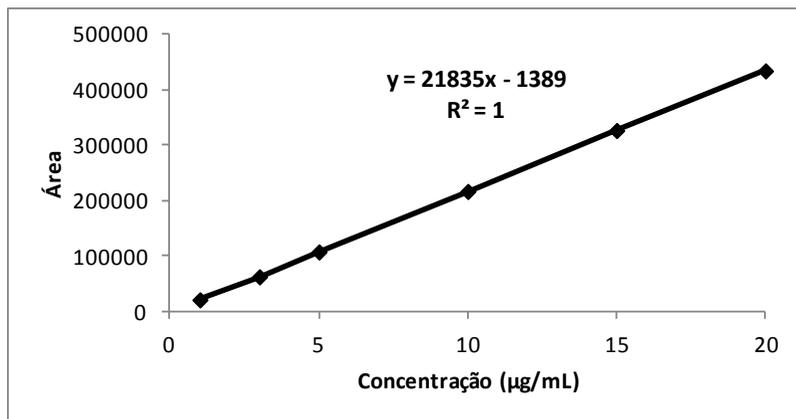


Figura 45. Curva de calibração média do ácido glicirrízico obtida por CLAE, com sua respectiva equação da reta e coeficiente de correlação (R^2).

O gráfico de resíduos apresentou uma distribuição adequada e homogênea dos pontos em torno do eixo das abscissas (figura 46) provando que a metodologia de CLAE utilizada mostrou-se satisfatória na faixa de concentração analisada.

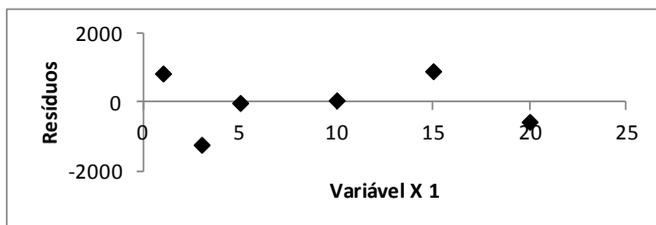


Figura 46. Análise dos resíduos da curva de calibração do ácido glicirrízico obtida por CLAE.

O LQ e LD calculados a partir das curvas obtidas foram 0,48 µg/mL e 0,16 µg/mL, indicando a alta sensibilidade do método.

Os resultados dos ensaios de precisão e exatidão estão descritos na tabela 34. Na precisão inter e intra-dia o desvio padrão relativo está dentro do critério de aceitação de 5 %. No ensaio de exatidão, valores de

recuperação entre 91,23 e 94,34 % foram obtidos após extração do fármaco de amostras de pele, satisfazendo os critérios do estudo.

Tabela 34. Resultados dos ensaios de precisão e exatidão do método de quantificação de AG em amostras de pele.

Precisão		DPR^c (%)
Precisão Inter-dia^a	Dia 1	2,95
	Dia 2	3,89
	Dia 3	3,22
Precisão Intra-dia^b		2,53
Exatidão		
Concentração adicionada (µg/mL)	Recuperação^a (%) ± DPR^c %	
4,0	91,23 ± 1,23	
5,0	94,34 ± 1,79	
6,0	93,87 ± 0,98	

^amédia de três replicatas

^bmédia de seis replicatas

^cdesvio padrão relativo

3.2 AVALIAÇÃO DA PERMEACÃO E/OU RETENÇÃO CUTÂNEA DE AG

Nesta etapa do trabalho, avaliou-se a permeação do AG a partir de três preparações: de uma solução aquosa ($1,1 \pm 0,6$ mg/mL), de uma suspensão de nanopartículas ($112,1 \pm 0,9$ µg/mL) e de um gel de natrosol[®] contendo as nanopartículas ($114,2 \pm 1,1$ µg/mL).

Amostragens foram realizadas após 12 h do início do experimento, pois estudos preliminares realizados com um metabólito do AG, o ácido glicirretínico, demonstraram uma baixa permeação pela pele durante as primeiras 10 h (HAO et al., 2010).

Das três preparações testadas, foi possível calcular os parâmetros de permeabilidade apenas para a solução aquosa de AG ($J = 11,13 \pm 1,14$ µg/cm².h; $L_T = 8,93 \pm 1,49$ h; $P = 0,011 \pm 0,001$ cm/h) (figura 47). A maior concentração de fármaco utilizada neste caso poderia ser uma das justificativas para este resultado (cerca de 10 vezes mais que as demais amostras). Para as outras duas amostras, o fármaco não atingiu o compartimento receptor em níveis quantificáveis, não sendo possível obter perfis de permeação que relacionam a quantidade de fármaco permeada versus tempo.

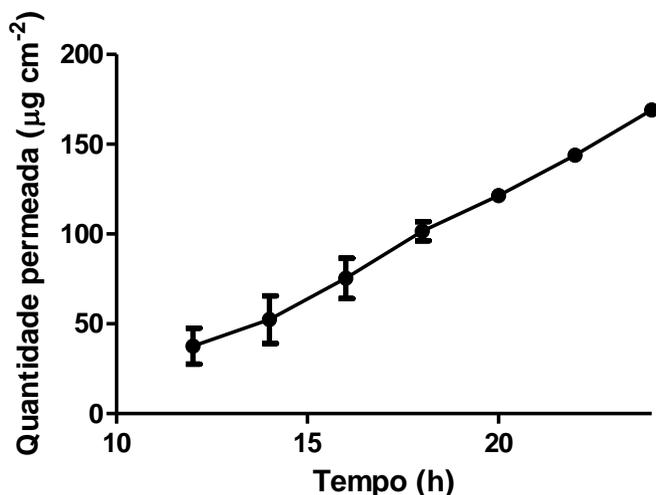


Figura 47. Perfil de permeação do AG em solução através da pele de orelha de porco.

Os valores dos coeficientes de regressão linear utilizados para avaliar o estado de fluxo constante obtidos foram superiores a 0,99, similarmente aqueles observados no estudo de Hao e colaboradores (2010). As diferenças entre os valores de P obtidos no presente estudo e aquele relatado no estudo de Hao e colaboradores (2010) podem estar associadas às diferenças estruturais entre as duas moléculas (fármaco VS. metabólito), ao tipo de tecido animal utilizado (pele de rato VS. pele de porco) e a proporção de etanol, o que torna estes valores de difícil comparação entre si.

Paolino e colaboradores (2005) avaliaram a permeação cutânea *in vitro* de uma solução aquosa e hidroalcolólica de glicirrizato de amônio, um sal do ácido glicirrízico, e observaram que as quantidades permeadas foram de 50,0 e 160,0 µg/cm², respectivamente, após 24 h de experimento. Estes dados apresentam certa similaridade em relação àqueles obtidos nesse estudo, ainda que alguns parâmetros experimentais sejam distintos.

Por outro lado, o AG não foi detectado em níveis superiores ao seu limite de quantificação no compartimento receptor para o sistema nanoestruturado após 24 h de experimento. O tempo foi prolongado para 36 h em um novo experimento, porém o resultado obtido foi o mesmo.

Entretanto, níveis consideráveis de fármaco foram encontrados nas diferentes camadas da pele (figura 48).

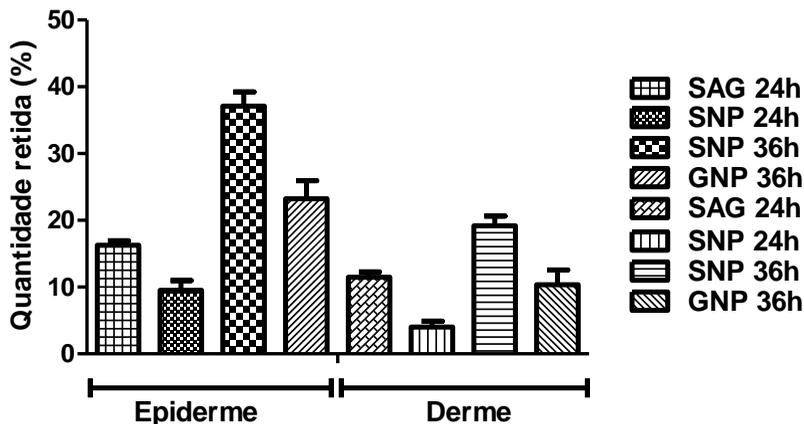


Figura 48. Quantidade (%) de AG retido na epiderme e derme após 24 e 36 h. Dados: solução de AG (SAG); suspensão de nanopartículas (SNP); gel contendo nanopartículas (GNP).

Com relação às amostras de nanopartículas (suspensão e gel), pode ser observado que quando o tempo experimental é estendido para 36 h, ocorre um aumento expressivo da quantidade retida tanto na derme quanto epiderme (aproximadamente 3x) comparada com os resultados obtidos após 24 h.

Quando se compara derme e epiderme, observou-se maior acúmulo do composto ativo na epiderme, o que pode estar associado à maior afinidade da QUI por esta camada.

A incorporação das nanopartículas em um gel resultou em menor quantidade de AG retida na pele em relação à suspensão de nanopartículas, pois com o gel uma etapa adicional para a liberação é estabelecida e também ocorre redução da mobilidade das partículas neste sistema.

Embora a complexação com a QUI torne o composto menos polar (mais lipofílico), devido à interação com os grupos polares do AG, o que é desejável no sentido de aumentar a permeação através do estrato córneo, a formação deste complexo pode estar limitando a passagem do fármaco através da pele. Isto porque a formação de um complexo de alto peso molecular devido a fortes interações eletrostáticas entre QUI, ALG

e o AG, poderia ser capaz de retardar a liberação do fármaco das nanopartículas.

O mecanismo sugerido é que em uma primeira etapa a QUI seja capaz de interagir com a pele e facilitar a adesão das nanopartículas. Como a interação eletrostática entre os componentes das nanopartículas é forte, supõe-se que o fármaco seja liberado de forma controlada e prolongada, permanecendo nas camadas da pele por mais tempo quando comparado à solução de AG, que permeia livremente.

A literatura descreve alguns trabalhos em que a QUI foi a responsável por uma maior retenção de fármacos na pele. Shah e colaboradores (2012) desenvolveram nanopartículas contendo *spantide II*, um anti-inflamatório tópico, utilizando ácido poli-láctico glicólico, quitosana e TPP, ou revestidas com um acelerador de permeação, o ácido oléico. As nanopartículas foram incorporadas em gel de HPMC. Após 24 h de estudo de permeação, o fármaco não foi detectado no compartimento receptor em nenhuma das amostras. A formulação preparada com quitosana e TPP apresentou uma retenção de fármaco no estrato córneo, na epiderme e na derme, de 7,34, 5,32, e 1,14 mg/g de pele, respectivamente. A retenção de fármaco das nanopartículas preparadas com quitosana foi 1,5 vezes maior do que as revestidas com ácido oleico.

Nanopartículas de quitosana e Pluronic F127[®] foram capazes de aumentar a permeação de macromoléculas hidrofílicas (CHOI et al., 2012). Os autores destacam que a estabilidade da interação química entre quitosana e Pluronic F127[®] é essencial para a permeação efetiva das moléculas. Neste caso, pode-se observar um sinergismo entre a quitosana e o surfactante. A quitosana pode aumentar a retenção das partículas através da pele enquanto que o Pluronic F127[®] modifica a fluidez da membrana, reforçando a permeação de moléculas.

Nanopartículas de quitosana e lecitina foram capazes de aumentar a retenção de quercetina na epiderme e evitar um efeito transdérmico. Este sistema é ideal como carreador para liberação controlada de quercetina para tratamento tópico como antioxidante e anti-inflamatório. As características das nanopartículas, como carga positiva e grande área superficial, são responsáveis pelo maior acúmulo de fármaco na epiderme, permitindo um maior contato na superfície entre as nanopartículas e a pele (TAN et al., 2011).

4 CONCLUSÕES

O sistema nanoestruturado proposto pode ser utilizado topicamente nos casos em que uma liberação controlada e prolongada é desejada, tendo em vista a baixa taxa de liberação do fármaco no tempo analisado e a reduzida absorção sistêmica, o que confere certa segurança na administração. Este sistema proporcionou alta retenção de ácido glicirrízico na derme e epiderme, efeito este atribuído a presença da quitosana. O uso de um gel como base retardou ainda mais a retenção do ácido glicirrízico na epiderme e na derme em relação à suspensão de nanopartículas, justamente pela presença de uma etapa adicional na liberação do ativo. Este reforço da retenção do fármaco nas diferentes camadas da pele pode aumentar ainda mais seus efeitos anti-inflamatório, antioxidante e antiviral, no entanto, testes adicionais são necessários neste sentido.

5 REFERÊNCIAS

AFNAN, Q.; ADIL, M.; NISSAR-UL, A.; RAFIQ, A. R.; AMIR, H. F.; KAISER, P.; GUPTA, V. K.; VISHWAKARMA, R.; TASDUQ, S. A. Glycyrrhizic acid (GA), a triterpenoid saponin glycoside alleviates ultraviolet-B irradiation-induced photoaging in human dermal fibroblasts. **Phytomedicine**, v. 19, p. 658– 664, 2012.

BARRY, B. Transdermal drug delivery. In: AULTON, M.E. (ed.) **Pharmaceutics: The science of dosage form design**. 2. ed. New York: Churchill Livingstone, 2002, p. 499-533.

BRASIL. Ministério da saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVS - **Portaria 899, de 29 de maio de 2003**. Disponível em < <http://www.anvisa.gov.br/>> Acesso em 02 de abril de 2011.

CAPELLA, G.L. & FINZI, A.F. Complementary therapy for psoriasis. **Dermatologic Therapy**, v. 16, p.164–74, 2003.

CHANG, S.K. WILLIAMS, P.L. DAUTERMAN, W. C. RIVIERE, J.E. Percutaneous absorption, dermatopharmacokinetics and related biotransformation studies of carbaryl, lindane, malathion, and parathion in isolated perfused porcine skin. **Toxicology**, v. 91, p. 269-80, 1994.

CHOI, W. I.; LEE, J. H.; KIM, J.; KIM, J.; KIM, Y.; TAE, G. Efficient skin permeation of soluble proteins via flexible and functional nano-carrier. **Journal of Controlled Release**, v. 157, p. 272 –278, 2012.

FDA/CDER. Nonsterile semisolid dosage forms – scale-up and postapproval changes: chemistry, manufacturing, and controls; in vitro release testing and in vivo bioequivalence documentation. 1997. Disponível em: <http://www.fda.gov/cder/guidance.htm>. Acesso em: jun 2012.

FÖRSTER, M.; BOLZINGER, M.; FESSI, H.; BRIANÇON, S. Topical delivery of cosmetics and drugs. Molecular aspects of percutaneous absorption and delivery. **European Journal of Dermatology**, v. 19, n. 4, p. 309-23, 2009.

FRANTZ, S.W. Instrumentation and methodology for in vitro skin diffusion cells in methodology for skin absorption. In: KEMPPAINEN,

B.W.; REIFENRATH, W.G. (eds.). **Methods for Skin Absorption**. Boca Raton: CRC, 1990, p.35-59.

HAO, J.; SUN, Y.; WANG, Q.; TONG, X.; ZHANG, H.; ZHANG, Q. Effect and mechanism of penetration enhancement of organic base and alcohol on Glycyrrhetic acid in vitro. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 399, p. 102–108, 2010.

HARWANSH, R. K.; PATRA, K. C.; PARETA, S. K.; SINGH, J.; RAHMAN, M. Nanoemulsions as vehicles for transdermal delivery of glycyrrhizin. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 47, n. 4, 2011.

HASANOVIC, A.; WINKLER, R.; RESCH, G. P.; VALENTA, C. Modification of the conformational skin structure by treatment with liposomal formulations and its correlation to the penetration depth of acyclovir. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 79, p. 76–81, 2011.

HERKENNE, C.; NAIK, A.; KALIA, Y.N.; HADGRAFT, J.; GUY, R.H. Pig ear skin ex vivo as a model for in vivo dermatopharmacokinetic studies in man. **Pharmaceutical Research**, v. 23, p.1850-6, 2006.

ICH- International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human use: **Q2(R1)-Validation of Analytical procedures: text and methodology**, 2005.

KIM, J.; SHIM, J.; KIM, Y.; CHAR, K.; SUH, K. KIM, J. The Design of Polymer-based Nanocarriers for Effective Transdermal Delivery. **Macromolecular Bioscience**, v. 10, p. 1171–1176, 2010.

KORTING , H. C. & SCHAFER-KORTING, M. Carriers in the Topical Treatment of Skin Disease. **Drug Delivery, Handbook of Experimental Pharmacology**, v. 197, p. 437-460, 2010.

LETSUTTHIWONG, P.; ROJSITTHISAK, P.; NIMMANNIT, U. Preparation of turmeric oil-loaded chitosan-alginate biopolymeric nanocapsules. **Materials Science and Engineering C**, v. 29, p. 856–860, 2009.

MASHRU, R.; SUTARIYA, V.; SANKALIA, M.; SANKALIA, J. Transbuccal delivery of lamotrigine across porcine buccal mucosa: in vitro determination of routes of buccal transport. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science**, v.8, p.54-62, 2005.

MONTEIRO-RIVIERE, N.A. Comparative anatomy, physiology, and biochemistry of mammalian skin. In: HOBSON, D.W. (ed.) **Dermal and ocular toxicology: fundamentals and methods**. New York: CRC, 1991, p. 3-71.

MUHAMMAD, F.; RIVIERE, J.E. In vivo models. In: RIVIERE, J.E. (ed.). **Dermal absorption models in toxicology and pharmacology**. New York: CRC, 2006, p. 49-60.

PAOLINO, D.; LUCANIA, G.; MARDENTE, D.; ALHAIQUE, F.; FRESTA, M. Ethosomes for skin delivery of ammonium glycyrrhizinate: In vitro percutaneous permeation through human skin and in vivo anti-inflammatory activity on human volunteers. **Journal of Controlled Release**, v. 106, p. 99 – 110, 2005.

QIN, T.; WEI, W.; XIAOTING, H.; XIAOCUI, Z.; WEI, H.; CHUANGNIAN, Z.; ZHI, Y.; XUESI, C. Glycyrrhetic acid-modified nanoparticles for drug delivery: Preparation and characterization. **Chinese Science Bulletin**, v. 54, p. 3121—3126, 2009.

SASSI, A. B.; COST, M. R.; COLE A. L.; COLE, A. M.; PATTON, D. L.; GUPTA, P.; ROHAN, L. C. Formulation Development of Retrocyclin 1 Analog RC-101 as an Anti-HIV Vaginal Microbicide Product. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 55, n. 5, 2011.

SCHMOOK, F.P.; MEINGASSNER, J.G.; BILLICH, A. Comparison of human skin or epiderms models with human and animal skin in in-vitro percutaneous absorption. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 215, p. 51-56, 2001.

SCHWARZ, S. & CSUK, R. Synthesis and antitumour activity of glycyrrhetic acid derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 18, p. 7458–7474, 2010.

SHAH, P. P.; DESAI, P. R.; PATEL, A.; SINGH, M. Skin permeating nanogel for the cutaneous co-delivery of two anti-inflammatory drugs. **Biomaterials**, v. 33, p. 1607-1617, 2012.

SHIN, J. B.; SHIN, K.; LEE, H.; SUH, K.; KIM, H.; KIM, J. Enhance d transdermal delivery by using electrostatically interactive chitosan nanocapsules. **Colloid & Polymer Science**, v. 29, p. 553-559, 2012.

TAN, Q.; LIU, W.; GUO, C.; ZHAI, G. Preparation and evaluation of quercetin-loaded lecithin-chitosan nanoparticles for topical delivery. **International Journal of Nanomedicine**, v. 6, p. 1621-1630, 2011.

TAGLIARI, M. P.; GRANADA, A.; KUMINEK, G.; STULZER, H. K.; SILVA, M. A. S. Desenvolvimento e validação de métodos analíticos para determinação de ácido glicirrízico, ácido salicílico e cafeína em nanopartículas de quitosana e alginato. **Quimica Nova**, v. 35, n. 6, p. 1228-1232, 2012.

TRIPATHI, M.B.K. & SINGH, P.K. Glycyrrhizic acid modulates t-BHP induced apoptosis in primary rat hepatocytes. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, p. 339-347, 2009.

TROTTA, M.; PEIRA, E.; DEBERNARDI, F.; GALLARATE, M. Elastic liposomes for skin delivery of dipotassium glycyrrhizinate. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 241, p. 319 - 327, 2002.

WANG, C.; KAO, T.; LO, W.; YEN, G. Glycyrrhizic Acid and 18 β - Glycyrrhetic Acid Modulate Lipopolysacchari de-Induced Inflammatory Response by Suppression of NF-j B through PI3K p110 δ and p110 γ Inhibitions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 7726-7733, 2011.

ZHENG, H.; ZHANG, X.; XIONG, F.; ZHU, Z.; LU, B.; YIN, Y.; XU, P.; DU, Y. Preparation, characterization, and tissue distribution in mice of lactosaminated carboxymethyl chitosan nanoparticles. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, p. 1139-1145, 2011.

CONCLUSÕES

Este trabalho teve como objetivo desenvolver um sistema nanoparticulado utilizando os biopolímeros quitosana e alginato de sódio, para incorporação de fármacos para uso tópico. A quitosana possui características biofarmacêuticas interessantes para este fim, como bioadesividade, capacidade de fluidificar o estrato córneo e afinidade pela pele. A técnica de complexação de polieletrólitos, utilizada no preparo das nanopartículas, apresenta como principal vantagem o fato de não utilizar solventes orgânicos no processo.

A análise das nanopartículas placebo, sem a presença de fármacos, demonstrou que existe uma faixa de concentração de polieletrólitos e valores de pH ideais para obtenção de um sistema estável. Estes parâmetros influenciam a turbidez, tamanho de partícula, potencial zeta, pH e viscosidade das suspensões de nanopartículas.

O sistema nanoparticulado apresentou limitações quanto à incorporação de fármacos. Somente o ácido glicirrízico apresentou uma eficiência de encapsulação adequada, que foi resultado da presença de grupamentos carboxílicos em sua molécula capazes de interagir eletrostaticamente com os grupamentos amino da quitosana.

Ao final da caracterização físico-química das nanopartículas contendo ácido glicirrízico, uma formulação foi selecionada para a incorporação em um gel. Este manteve as características iniciais das nanopartículas, estando apto a ser utilizado como base semissólida para aplicação tópica.

O estudo de permeação cutânea avaliou a suspensão de nanopartículas e o gel contendo nanopartículas aplicados em pele de porco. As amostras apresentaram baixa taxa de liberação do fármaco no tempo analisado e reduzida absorção sistêmica, sendo ideais para uma formulação tópica com atividades anti-inflamatória, antioxidante e antiviral.

APÊNDICE A

**CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS
FÁRMACOS (ácido glicirrízico, ácido salicílico e cafeína)**

1 METODOLOGIA

A caracterização físico-química do ácido glicirrízico matéria-prima (DEG, São Paulo, Brasil) foi realizada conforme laudo do fornecedor e dados obtidos da literatura, pois o fármaco não possui monografia descrita em compêndios oficiais (ZHENG et al., 2006). Para verificar a solubilidade, utilizou-se água quente, etanol diluído (50 %), clorofórmio e éter.

O ácido salicílico matéria-prima (DEG, São Paulo, Brasil) foi caracterizado conforme monografia e métodos gerais disponíveis na Farmacopéia Portuguesa (2008). Para verificar a solubilidade, utilizou-se água, álcool, éter e cloreto de metileno. Os ensaios limite de cloretos e de sulfatos foram realizados conforme monografia do fármaco. Para o ensaio de doseamento, 0,12 g da amostra foram dissolvidas em 30 ml de álcool R, acrescentados 20,0 ml de água R e 0,1 ml de solução de vermelho de fenol R. A titulação foi realizada com hidróxido de sódio 0,1 M. 1 ml de hidróxido de sódio 0,1 M corresponde a 13,81 mg de $C_7H_6O_3$. Para reação dos salicilatos, cerca de 30 mg da amostra foi dissolvida em 5 ml de hidróxido de sódio 0,5 M. O volume foi completado para 20 ml com água.

A cafeína (CF) matéria-prima (Valdequímica, São Paulo, Brasil) foi caracterizada conforme monografia e métodos gerais disponíveis na Farmacopéia Brasileira (2010). Para verificar a solubilidade, utilizou-se clorofórmio, água, etanol e éter etílico. A identificação foi realizada por reações colorimétricas. Para o primeiro ensaio, 5 mg de CF foram dissolvidas em 1 ml de ácido clorídrico em vidro de relógio ou cápsula de porcelana, foram adicionados 50 mg de cloreto de potássio e levados à evaporação em banho de vapor até secar. O vidro de relógio foi invertido sobre outro contendo uma pequena quantidade de hidróxido de amônio 6 M. O resíduo adquire uma coloração púrpura que desaparece com a adição da solução de hidróxido de sódio 1 M. Em outro ensaio, 50 µl de uma solução de iodeto de potássio iodada foram adicionados à 2 ml de uma solução aquosa saturada da amostra. A solução apresenta-se límpida. Após acrescentar 0,1 ml de ácido clorídrico diluído forma-se precipitado castanho que se dissolve após neutralização com solução diluída de hidróxido de sódio. O ensaio de metais pesados foi realizado conforme descrito em Métodos de reação com íon sulfeto (Método 1). Para o ensaio de doseamento, 0,4 g da amostra exatamente pesada foram dissolvidas com aquecimento em 40 ml de anidrido acético. Após esfriar foram adicionados 80 ml de benzeno. A titulação foi realizada com solução de ácido perclórico 0,1 M SV, determinando o ponto final

potenciometricamente. Cada ml de ácido perclórico 0,1 M SV equivale a 19,47 mg de $C_8H_{10}N_4O_2$.

Além dos ensaios específicos anteriormente descritos para cada fármaco, foram realizados:

1.1 DESCRIÇÃO

Foram observados os caracteres físicos como coloração, odor e aparência da matéria-prima. A faixa de fusão foi obtida em célula DSC-60 (Shimadzu) utilizando cadinhos de alumínio fechados com ~2 mg de amostra sob atmosfera dinâmica de N_2 (50 mL/min) e razão de aquecimento de 10 °C/min. Quando necessário, as amostras foram submetidas à análise de difração de raios-X (DRX) em difratômetro PanAnalytical X'pert PRO com radiação de Cu e operando a 45 kV e 40 mA. As amostras foram preparadas sobre monocristal de silício "zero background" com cavidade. A análise foi realizada no Laboratório de Difração de Raio-X da UFSC com orientação do Prof. Carlos de Campos.

1.2 ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO

O espectro de absorção na região do infravermelho (IV) foi realizado com o equipamento Shimadzu (IR Prestige 21) utilizando resolução de 4 cm^{-1} . As amostras foram trituradas com brometo de potássio (KBr) e submetidas à análise entre 400 a 4000 cm^{-1} . As principais bandas de absorção para cada fármaco foram observadas e comparadas com dados da literatura (CLARKE'S, 2004; ZHENG et al., 2006).

1.3 PERDA POR DESSECAÇÃO

Pesa-filtros (\varnothing 52 mm x 48 mm) previamente dessecados e tarados foram adicionados de aproximadamente 1,0 g de cada matéria-prima exatamente pesado. As amostras foram colocadas em estufa a 105 °C até peso constante e a porcentagem de perda foi calculada.

2 RESULTADOS

A tabela 1 resume os resultados obtidos para o fármaco ácido glicirrízico, comparando-os com especificações da literatura e com laudo do fornecedor (DEG Ltda; SUI et al., 2012; ZHENG et al., 2006).

Tabela 1. Resultados da caracterização físico-química do fármaco ácido glicirrízico.

Ensaio	Especificação	Resultado
Descrição	Pó cristalino, branco de sabor adocicado	De acordo
Solubilidade	Facilmente solúvel em água quente e etanol diluído, insolúvel em clorofórmio e éter	De acordo
Faixa de fusão	Sem evento de fusão	De acordo (Fig. 1)
Perda por dessecação	Máximo de 6 %	1,2 %
Espectroscopia no IV	Principais picos de absorção são: 1719, 1458, 1647 cm^{-1}	De acordo (Fig. 3)

Na figura 1 pode ser visualizada a ausência de endoterma de fusão na curva DSC do ácido glicirrízico.

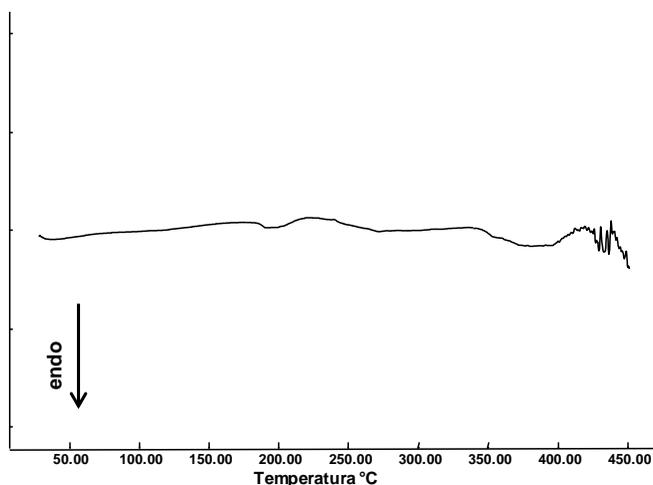


Figura 1. Curva de DSC obtida a partir do ácido glicirrízico.

Para avaliar o grau de cristalinidade do fármaco foi realizada análise de difração de raios-X (figura 2). O difratograma confirma o caráter amorfo do fármaco, como já foi observado por outros autores (SUI et al., 2012).

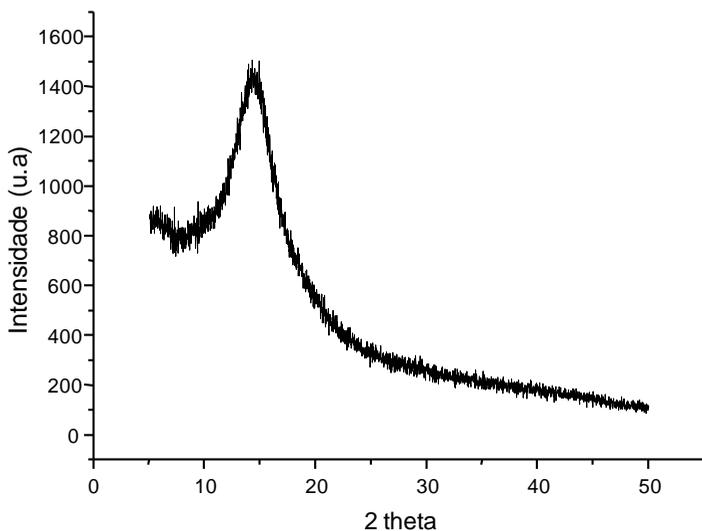


Figura 2. Perfil de DRX obtido para o ácido glicirrízico.

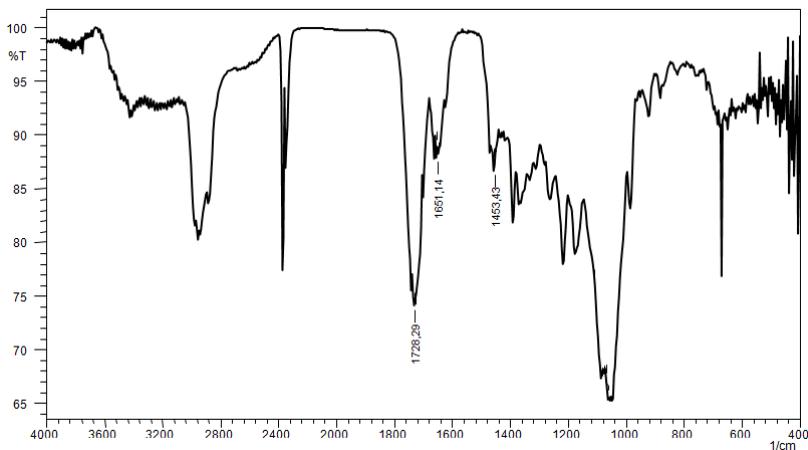


Figura 3. Espectro de absorção na região do infravermelho do ácido glicirrízico.

A tabela 2 resume os resultados obtidos para o fármaco ácido salicílico, comparando-os com especificações da Farmacopéia Portuguesa (2008) e Clarke's (2004).

Tabela 2. Resultados da caracterização físico-química do fármaco ácido salicílico.

Ensaio	Especificação	Resultado
Descrição	Pó cristalino branco ou cristais aciculares brancos ou incolores.	De acordo
Solubilidade	Pouco solúvel em água, facilmente solúvel em álcool e em éter e ligeiramente solúvel em cloreto de metileno	De acordo
Faixa de fusão	158 a 161°C	158,2 a 160,5 °C (Fig. 4)
Perda por dessecação	Máximo de 0,5 %	0,4 %
Espectroscopia no IV	Principais picos de absorção são: 758, 1657, 1288, 1210, 1250, 1150, 1587, 1724, 1176, 1515, 699, 1041 cm ⁻¹	De acordo (Fig.5)
Ensaio-limite de Cloretos	Máximo 100 ppm	De acordo
Ensaio-limite de Sulfatos	Máximo 200 ppm	De acordo
Reações de Identificação (salicilatos)	Desenvolvimento de coloração violeta	De acordo
Doseamento	99,0 – 100,5 %	99,3 ± 0,4 %

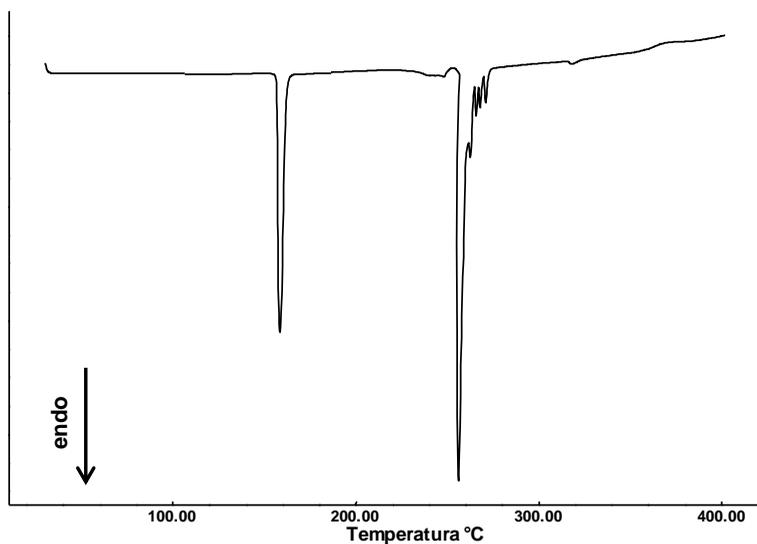


Figura 4. Curva de DSC obtida a partir do ácido salicílico.

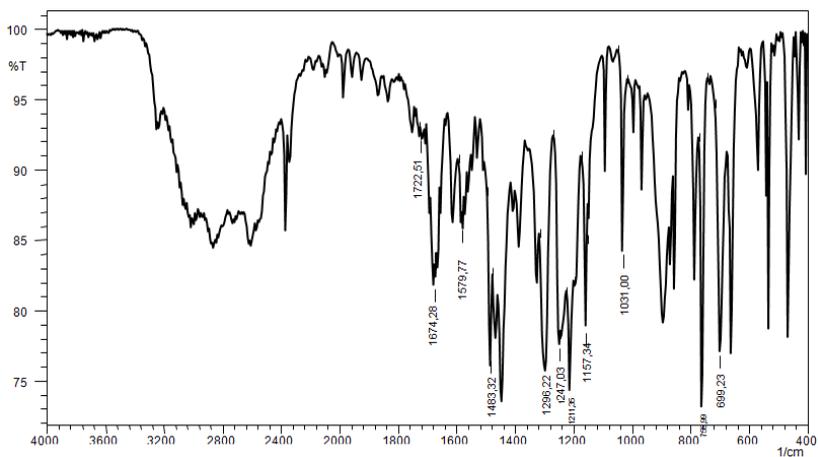


Figura 5. Espectro de absorção na região do infravermelho do ácido salicílico.

A tabela 3 resume os resultados obtidos para o fármaco cafeína, comparando-os com especificações da Farmacopéia Brasileira (2010).

Tabela 3. Resultados da caracterização físico-química do fármaco cafeína.

Ensaio	Especificação	Resultado
Descrição	Pó branco ou cristais aciculares, brancos e brilhantes. Inodoro e de sabor amargo	De acordo
Solubilidade	Facilmente solúvel em clorofórmio, ligeiramente solúvel em água e etanol, e pouco solúvel em éter etílico	De acordo
Faixa de fusão	235 a 239 °C	235 a 238,4 °C
Perda por dessecação	Máximo de 0,5 %	0,3 %
Espectroscopia no IV	Principais picos de absorção são: 1658, 1698, 1548, 1242, 760, 747 cm^{-1}	De acordo (Fig.7)
Metais pesados	Máximo 20 ppm	De acordo
Reação de identificação (A)	Desenvolvimento de coloração púrpura que desaparece com a adição da solução de hidróxido de sódio 1 M.	De acordo
Reação de identificação (B)	Formação de precipitado castanho que se dissolve após neutralização com solução diluída de hidróxido de sódio.	De acordo
Doseamento	98,5 - 101 %	99,1 \pm 0,5 %

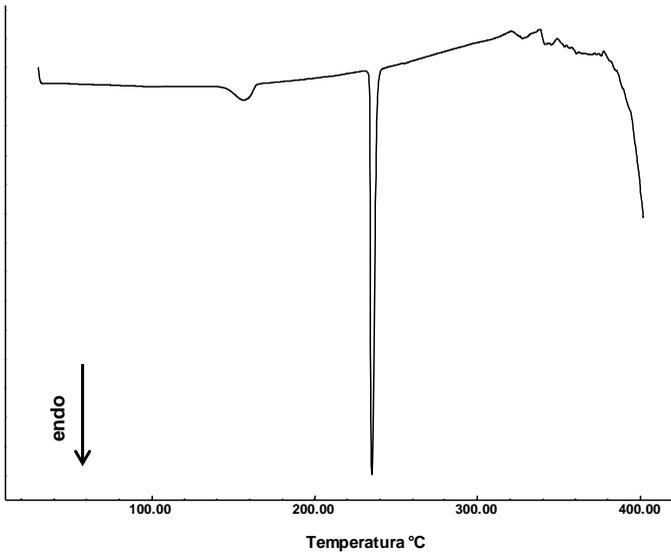


Figura 6. Curva de DSC obtida a partir da cafeína.

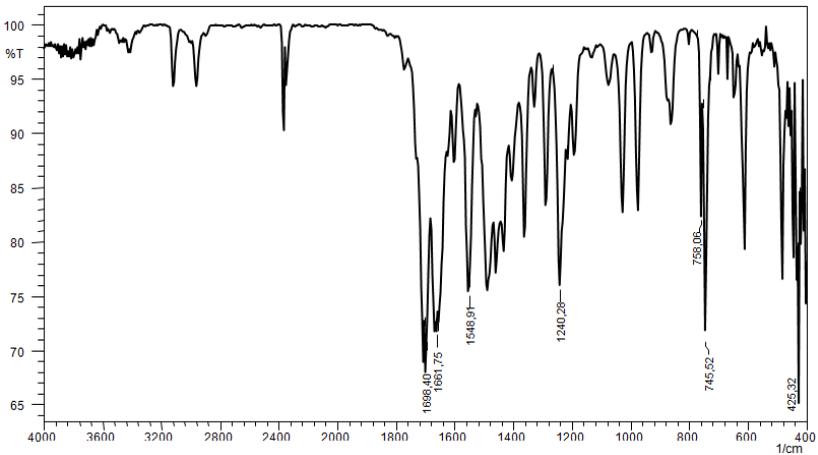


Figura 7. Espectro de absorção na região do infravermelho da cafeína.

3 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos com a caracterização físico-química dos fármacos utilizados neste trabalho conferem com as especificações da literatura.

4 REFERÊNCIAS

CLARKE'S Analysis of Drugs and Poisons. London: Pharmaceutical Press. Eletronic version, 2004.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 5 ed. São Paulo: Atheneu, 2010.

FARMACOPÉIA PORTUGUESA. 9 ed. Lisboa, 2008.

SUI, X., WEI, W., YANG, L., ZU, Y., ZHAO, C., ZHANG, L., YANG, F., ZHANG, Z. Preparation, characterization and in vivo assessment of the bioavailability of glycyrrhizic acid microparticles by supercritical anti-solvent process. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 423, p. 471– 479, 2012.

ZHENG, Y.; WU, Y.; YANG, W.; WANG, C.; FU, S.; SHEN, X. Preparation, Characterization, and Drug Release In Vitro of Chitosan-Glycyrrhetic Acid Nanoparticles. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 95, n. 1, 2006.