

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CLARISSA ELIZE LOPES

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS
LIPÍDICAS CONTENDO HALCINONIDA PARA MODULAÇÃO DA
INFLAMAÇÃO NO PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO DE LESÕES CUTÂNEAS

PONTA GROSSA
2015

CLARISSA ELIZE LOPES

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS
LIPÍDICAS CONTENDO HALCINONIDA PARA MODULAÇÃO DA
INFLAMAÇÃO NO PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO DE LESÕES CUTÂNEAS

Dissertação apresentada como requerimento parcial para a obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas na Universidade Estadual de Ponta Grossa, no Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração: Fármacos, Medicamentos e Biociências aplicadas à Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Vitor Farago

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Priscileila Colerato Ferrari

PONTA GROSSA
2015

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS – ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: FÁRMACOS, MEDICAMENTOS E BIOCÊNCIAS APLICADAS À FARMÁCIA, NÚMERO DA ATA 09/2015, DA MESTRANDA CLARISSA ELIZE LOPES REALIZADO NO DIA 21 DE DEZEMBRO DE 2015, NA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA.

Aos vinte e um dias de dezembro de dois mil e quinze, às 14h00min na sala 115, bloco M, da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) em seção pública sob a presidência da Professora Doutora Priscileila Colerato Ferrari (UEPG) reuniu-se a Banca Examinadora de defesa da Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas da mestranda Clarissa Elize Lopes na linha de pesquisa: Fármacos, medicamentos e biociências aplicadas à farmácia/ desenvolvimento e controle de fármacos, medicamentos e correlatos. Constituída pelos demais Doutores (membros titulares): Leandro Lipinski (UEPG/PR) e Sandra Maria Warumby Zanin (UFPR). Iniciados os trabalhos, a presidência deu conhecimento aos membros da banca e a candidata das normas que regem a defesa da dissertação de Mestrado e definiu - se a ordem a ser seguida pelos examinadores para arguição. O título do trabalho foi: Desenvolvimento e Caracterização de nanopartículas lipídicas contendo halcinonida para modulação da inflamação do processo de cicatrização de feridas na pele. Encerrado a defesa, a banca pronunciou-se APROVADA a dissertação, considerado como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em - Ciências Farmacêuticas. O aluno deverá entregar, no prazo de até 60 dias, a versão definitiva da dissertação de Mestrado, com as modificações sugeridas pelos membros da banca examinadora. Nada mais havendo a ser tratado, lavrou-se a presente ata que vai assinada pelos membros da Banca Examinadora.

Observações (se necessário): _____

Alteração de título: sim ☒ não ☐

Novo título:

Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas lipídicas contendo halcinonida para modulação da inflamação em lesões cutâneas

Priscileila C. Ferrari

Priscileila Colerato Ferrari 1- Presidente (DEFAR – UEPG)

Leandro Lipinski

Leandro Lipinski 2- (MEDICINA/UEPG) – Titular

Sandra Maria Warumby Zanin

Sandra Maria Warumby Zanin 3- (UFPR) – Titular

Ponta Grossa, 21 de Dezembro de 2015.

Ficha Catalográfica
Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG

L864 Lopes, Clarissa Elize
Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas lipídicas contendo halcinonida para modulação da inflamação no processo de cicatrização de lesões na pele/ Clarissa Elize Lopes. Ponta Grossa, 2015.
94f.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas - Área de Concentração: Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Vitor Farago.

Coorientadora: Prof^a Dr^a Priscileila Colerato Ferrari.

1.Nanopartículas poliméricas de núcleo lipídico. 2.Nanopartículas lipídicas sólidas. 3.Glicocorticoide tópico. 4.Toxicidade. I.Farago, Paulo Vitor. II. Ferrari, Priscileila Colerato. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Mestrado em Ciências Farmacêuticas. IV. T.

CDD: 615.7

AGRADECIMENTOS

À Deus, por estar segurando minha mão, me abençoando e dando forças em todos os momentos da minha vida, especialmente nos mais difíceis.

Ao meu orientador, prof. Dr. Paulo Vitor Farago, pela oportunidade, confiança e contribuição para a concretização deste estudo.

À minha co-orientadora, prof. Dr^a. Priscileila Colerato Ferrari, pela amizade, apoio, paciência e dedicação. Sua orientação foi fundamental para o desenvolvimento deste trabalho, assim como para meu crescimento pessoal e profissional.

À Dr^a. Traudi Klein, pela ajuda, especialmente no desenvolvimento e validação do método analítico, e por sempre transmitir tranquilidade nos momentos de nervosismo e ansiedade.

À professora M. Sc. Jessica Mendes Nadal, por sua disponibilidade generosa, solicitude e pelos ensinamentos compartilhados ao longo deste período.

À companheira de laboratório e também amiga Dr^a. Débora Maria Borsato, por sempre estar disposta a ajudar no desenvolvimento dos meus experimentos, além dos conselhos e apoio.

À professora Dr^a Josiane Padilha, pelos conselhos e orientações, por ter permitido a utilização do seu laboratório de pesquisa e também pelo empréstimo de materiais, sem nunca ter medido esforços para me ajudar.

À professora Dr^a Andressa Novatski, por ter levado amostras da minha pesquisa para que a caracterização fosse realizada com o apoio da COMCAP da Universidade Estadual de Maringá.

Ao professor Dr Leandro Lipinski e aos seus alunos de Iniciação Científica do curso de Medicina, pela colaboração no desenvolvimento da pesquisa com os animais, assim como no auxílio na interpretação dos resultados desse estudo.

À minha banca de qualificação, professoras Dr^a. Andressa Novatski e Dr^a. Josiane Padilha, pelos conselhos, observações e correções solicitadas, proporcionando uma melhora significativa na qualidade do meu trabalho.

Aos meus colegas de turma, que sempre estiveram dispostos a me ajudar em tudo que foi preciso, com ensinamentos, direcionamentos, paciência, companheirismo e amizade.

Ao meu marido Marcelo Fadani, que sempre me apoiou, ajudou, se fez presente, e também ausente, quando foi necessário. Pela compreensão nos

momentos difíceis, nas noites mal dormidas e por sempre ter me incentivado a ir em busca dos meus sonhos, com amor e dedicação.

À minha família, que mesmo distante, sempre me apoiou e incentivou a ir em frente. Tudo devo à eles!!

À CAPES pelo auxílio financeiro.

À todos que cooperaram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Lesões cutânea são interrupções da sua estrutura anatômica normal e fisiológica que causam danos pela perda da função barreira da pele tornando-a exposta a diversos tipos de substâncias e microrganismos. Dessa forma uma rápida cicatrização desta lesão é fundamental para evitar o risco de infecções e outras complicações. O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de nanopartículas lipídicas, na forma de nanopartículas lipídicas sólidas e nanopartículas poliméricas de núcleo lipídico, para veiculação de halcinonida para modulação da fase inflamatória da cicatrização, reduzindo dor, desconforto, edema e exsudato, aliado a redução da toxicidade do fármaco. Para tanto, as nanopartículas foram obtidas e caracterizadas quanto ao tamanho de partícula, propriedades físico-químicas, estabilidade, eficiência de encapsulação do fármaco, microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo, difração de raios x, espectroscopia na região do infravermelho e Raman com Transformada de Fourier, calorimetria diferencial de varredura, análise termogravimétrica, estudo de permeação cutânea *in vitro* e avaliação *in vivo* da resposta inflamatória e da toxicidade do fármaco. Além disso, um método para quantificação do fármaco por cromatografia líquida de alta eficiência foi desenvolvido e validado. As nanopartículas apresentaram diâmetro médio variando entre 260 a 500 nm, índice de polidispersão abaixo de 0,37, potencial zeta próximo a -30 mV, pH entre 5,3 e 6,5 e apresentaram estabilidade após armazenamento de 60 dias. As imagens obtidas por microscopia revelaram formato esférico com superfície lisa. A análise de difração de raios x demonstrou a amorfização do fármaco nos sistemas nanoestruturados. Por espectroscopia na região do infravermelho e Raman puderam-se identificar as bandas características dos principais componentes das formulações, indicando que não houve ligação química entre eles. A análise térmica revelou os picos da fusão do fármaco e dos lipídeos e polímero utilizados e a temperatura da sua degradação. As nanopartículas apresentaram 5,0 % do fármaco permeado em 24 horas de estudo. O estudo *in vivo* revelou que a halcinonida livre foi tóxica, produzindo efeitos adversos sistêmicos e as nanopartículas contendo o fármaco foram capazes de modular a inflamação da cicatrização, evitando a formação de edema e exsudato, porém prejudicando as fases subsequentes do processo de cicatrização. No entanto, a incorporação da halcinonida nas nanopartículas foi capaz de reduzir a toxicidade do fármaco pelo controle da sua liberação. Em relação às amostras, as duas nanopartículas desenvolvidas apresentaram resultados semelhantes, sendo que as nanopartículas poliméricas de núcleo lipídico mostrou melhor retração da ferida e aspecto macroscópico, possivelmente pelo controle polimérico associado ao do lipídeo para liberação da halcinonida.

Palavras-chave: nanopartículas poliméricas de núcleo lipídico, nanopartículas lipídicas sólidas, glicocorticoide tópico, toxicidade.

ABSTRACT

Skin wounds are interruptions of the normal physiological and anatomical structure of the skin causing damage by loss of barrier function becoming the organism exposed to various types of substances and microorganisms. A fast healing of the wound is essential to avoid the risk of infections and other complications. The aim of this work was to the development of lipid nanoparticles, as solid lipid nanoparticles and lipid-core polymeric nanoparticles containing halcinonide to modulate the inflammatory phase of wound healing, reducing pain, discomfort, edema, exudates and to reduced the drug toxicity. To this end, nanoparticles were obtained and characterized for particle size, physicochemical properties, stability, encapsulation efficiency, scanning electron microscopy by field emission, x-ray diffraction, spectroscopy in the infrared and Raman Fourier Transform, differential scanning calorimetry, thermal gravimetric analysis, study of the *in vitro* skin permeation and *in vivo* evaluation of the inflammatory response and drug toxicity. Furthermore, a high-performance liquid chromatography method for quantification of the drug was developed and validated. Nanoparticles had an average diameter ranging from 260-500 nm, polydispersity index below 0.37, zeta potential close to -30 mV, pH between 5.3 and 6.5 and were stability after storage for 60 days. The microscopy images showed spherical shape with smooth surface. The X-ray diffraction analysis showed drug amorphization in the nanostructured systems. By infrared and Raman spectroscopy was identified the characteristic bands of main components of the formulations, indicating no chemical bonding between them. Thermal analysis revealed the melting peaks of the drug and lipids and polymer and the temperature of its degradation. Nanoparticles showed 5.0% of drug permeation in 24 hours. *In vivo* study showed that the pure halcinonide was toxic; producing systemic adverse effects and nanoparticles containing the drug was able to modulate the inflammation healing, avoiding the edema and exudates formation and however impairing the subsequent stages of the healing process. However, the incorporation of the halcinonide in nanoparticles was able to reduce the drug toxicity due to the control of the drug release. Regarding the samples of lipid nanoparticles, both showed similar results, wherein the lipid-core polymeric nanoparticles showed better retraction of the wound and macroscopic appearance, possibly due to the polymer control associated with the lipid in halcinonide release.

Keywords: lipid-core polymeric nanoparticles, solid lipid nanoparticles, topical glucocorticoids, toxicity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Representação das camadas da pele e seus anexos.	20
Figura 2: Estrutura química da HAL.	24
Figura 3: Representação esquemática do método da nanoprecipitação ou deposição interfacial do polímero pré-formado (SCHAFFAZICK, 2006).	28
Figura 4: Estrutura química da PCL.	28
Figura 5: Estrutura química do AE.	31
Figura 6: Fluxograma das etapas realizadas no desenvolvimento da pesquisa.	35
Figura 7: Cromatograma obtido para HAL (25,0 $\mu\text{g. mL}^{-1}$; FM: metanol:água, 85:15, v/v).....	43
Figura 8: Cromatograma das nanopartículas: (A) NLS inerte; (B) NLS-HAL; (C) NNL inerte e (D) NNL-HAL (FM: metanol:água, 85:15, v/v).	44
Figura 9: Representação gráfica da curva analítica da HAL obtida por CLAE (FM: metanol:água 85:15 v/v; $\lambda = 239 \text{ nm}$).....	45
Figura 10 (a): Fotomicrografia da NNL (50.000 x); (b) Fotomicrografia da NLS (37.700 x).	51
Figura 11 (a) DRX do AE; (b) DRX da PCL.....	52
Figura 12: DRX da HAL.....	53
Figura 13: DRX das NLS. AE: ácido esteárico; HAL: halcinonida; MF AE-HAL: mistura física; NLS-HAL: NLS carregada; NLS0 – NLS inerte.	54
Figura 14: DRX das NNL. PCL: poli(ϵ -caprolactona); HAL: halcinonida; MF PCL-HAL: mistura física; NNL-HAL: NNL carregada; NNL0 – NNL inerte.	54
Figura 15: Espectro FTIR de: (a) AE; (b) PCL.....	55
Figura 16: Espectro FTIR da HAL.	56
Figura 17: Espectros de FTIR de NNL. PCL: poli(ϵ -caprolactona); HAL: halcinonida; MF PCL-HAL: mistura física; NNL-HAL: NNL carregada; NNL0 – NNL inerte.	57
Figura 18: Espectro FTIR de NNL de 4000 a 2000 cm^{-1} . HAL: halcinonida; PCL: poli(ϵ -caprolactona); MF PCL-HAL: mistura física; NNL-HAL: NNL carregada; NNL0: NNL inerte.	58
Figura 19: Espectro FTIR de NNL de 20000 a 400 cm^{-1} . HAL: halcinonida; PCL: poli(ϵ -caprolactona); MF PCL-HAL: mistura física; NNL-HAL: NNL carregada; NNL0: NNL inerte.	58

Figura 20. Espectro FTIR de NLS. AE: ácido esteárico; HAL: halcinonida; MF AE-HAL: mistura física; NLS-HAL: NLS carregada; NLS0 – NLS inerte.	59
Figura 21: Espectro FTIR de NLS em 4000 e 2000 cm ⁻¹ . AE: ácido esteárico; HAL: halcinonida; MF AE-HAL: mistura física; NLS-HAL: NLS carregada; NLS0 – NLS inerte.	59
Figura 22: Espectro FTIR de NLS em 2000 e 400 cm ⁻¹ . AE: ácido esteárico; HAL: halcinonida; MF AE-HAL: mistura física; NLS-HAL: NLS carregada; NLS0 – NLS inerte.	60
Figura 23: Espectro FT-Raman de: (a) AE, (b) PCL.....	61
Figura 24: Espectro FT- Raman da HAL.	61
Figura 25: Espectro FT- Raman de>NNL. PCL: poli(ε-caprolactona); HAL: halcinonida; MF PCL-HAL: mistura física;>NNL-HAL:>NNL carregada;>NNL0 –>NNL inerte.	62
Figura 26: Espectro FT- Raman de>NNL em 4000 e 2000 cm ⁻¹ . PCL: poli(ε-caprolactona); HAL: halcinonida; MF PCL-HAL: mistura física;>NNL-HAL:>NNL carregada;>NNL0 –>NNL inerte.	63
Figura 27: Espectro FT- Raman de>NNL em 2000 e 400 cm ⁻¹ . PCL: poli(ε-caprolactona); HAL: halcinonida; MF PCL-HAL: mistura física;>NNL-HAL:>NNL carregada;>NNL0 –>NNL inerte.	63
Figura 28: Espectro FT-Raman de NLS. AE: ácido esteárico; HAL: halcinonida; MF AE-HAL: mistura física; NLS-HAL: NLS carregada; NLS0 – NLS inerte. ...	64
Figura 29: Espectro FT-Raman de NLS em 4000 e 2000 cm ⁻¹ . AE: ácido esteárico; HAL: halcinonida; MF AE-HAL: mistura física; NLS-HAL: NLS carregada; NLS0 – NLS inerte.	64
Figura 30: Espectro FT-Raman de NLS em 2000 e 400 cm ⁻¹ . AE: ácido esteárico; HAL: halcinonida; MF AE-HAL: mistura física; NLS-HAL: NLS carregada; NLS0 – NLS inerte.	65
Figura 31: Curva de DSC das NLS. AE: ácido esteárico; HAL: halcinonida; MF AE-HAL: mistura física; NLS-HAL: NLS carregada; NLS0 – NLS inerte.	66
Figura 32: Curvas de DSC das>NNL. PCL: poli(ε-caprolactona); HAL: halcinonida; MF PCL-HAL: mistura física;>NNL-HAL:>NNL carregada;>NNL0 –>NNL inerte.	67
Figura 33: Curva de TGA das NLS. AE: ácido esteárico; HAL: halcinonida; MF AE-HAL: mistura física; NLS-HAL: NLS carregada; NLS0 – NLS inerte.	68
Figura 34: Curvas de TGA das>NNL. PCL: poli(ε-caprolactona); HAL: halcinonida; MF PCL-HAL: mistura física;>NNL-HAL:>NNL carregada;>NNL0 –>NNL inerte.	69
Figura 35: Perfil da permeação cutânea in vitro da HAL livre e a partir das>NNL e NLS.	70

Figura 36: Imagens dos animais tratados no 3° dia após sofrer a lesão.>NNL-HAL e NLS-HAL: nanopartículas carregadas com HAL;>NNL0 e NLS0: nanopartículas inertes; HAL: fármaco livre.....	72
Figura 37: Imagens dos animais tratados no 9° dia após sofrer a lesão.>NNL-HAL e NLS-HAL: nanopartículas carregadas com HAL;>NNL0 e NLS0: nanopartículas inertes; HAL: fármaco livre.....	73
Figura 38: Imagens dos animais tratados com>NNL carregada com HAL,>NNL inerte e HAL livre no 18° dia após sofrer a lesão.	75
Figura 39: Representação gráfica da evolução do processo de cicatrização de acordo com a área das lesões.>NNL-HAL e NLS-HAL: nanopartículas carregadas com HAL;>NNL0 e NLS0: nanopartículas inertes; HAL: fármaco livre.....	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Resultado ANOVA para a linearidade do método desenvolvido para HAL.	46
Tabela 2: Resultados obtidos para precisão (repetibilidade, reprodutibilidade e precisão intermediária).....	47
Tabela 3: Resultados obtidos para exatidão através da variação dos níveis de concentração da amostra.	47
Tabela 4: Resultados obtidos para exatidão através da recuperação.....	47
Tabela 5: Resultados obtidos para robustez.	48
Tabela 6: Teor de HAL incorporada e EE.	48
Tabela 7: Diâmetro médio, PZ, IPD e pH das NNL e NLS carregadas com HAL após a preparação e após 60 dias de armazenamento.	49
Tabela 8: Área média das lesões dos grupos tratados.	76

LISTA DE ABREVIATURAS

AE	ácido esteárico
ANOVA	análise de variância
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
Df	grau de liberdade
DP	desvio padrão
DPR	desvio padrão relativo
DRX	difração de raio X
DSC	varredura por calorimetria diferencial
EE	eficiência de encapsulação
F	valor do teste F
Ftab	valor de F tabelado
FT- Raman	Espectroscopia Raman com Transformada de Fourier
HAL	halcinonida
IL	interleucina
IPD	índice de polidispersão
LD	limite de detecção
LQ	limite de quantificação
MF AE – HAL	mistura física do ácido esteárico com a halcinonida
MF PCL – HAL	mistura física da poli (ϵ -caprolactona) com a halcinonida
MS	quadrados médios dos resíduos
NLS	nanopartícula lipídica sólida
NLS0	nanopartícula lipídica sólida inerte
NLS – HAL	nanopartícula lipídica sólida carregada com halcinonida
NNL	nanopartícula de núcleo lipídico
NNL0	nanopartícula de núcleo lipídico inerte
NNL – HAL	nanopartícula de núcleo lipídico carregada com halcinonida
PCL	poli (ϵ -caprolactona)
PGA	ácido poliglicólico
PLA	ácido polilático
SS	soma dos quadrados dos resíduos

TGA	análise termogravimétrica
TNF	fator de necrose tumoral

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	OBJETIVOS.....	18
2.1	Objetivo geral.....	18
2.2	Objetivos específicos	18
3	REVISÃO DA LITERATURA.....	19
3.1	A pele.....	19
3.2	Lesões cutâneas.....	21
3.3	Corticosteroides tópicos e a HAL.....	22
3.4	Nanopartículas como sistemas de liberação de fármacos.....	25
3.4.1	Nanopartículas poliméricas de núcleo lipídico (NNL).....	26
3.4.2	Nanopartículas lipídicas sólidas (NLS)	29
4	MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1	Equipamentos	33
4.2	Matérias primas e solventes.....	33
4.3	Desenho experimental	34
4.4	Procedimento experimental	35
4.4.1	Obtenção das NNL	35
4.4.2	Obtenção das NLS.....	36
4.4.3	Obtenção das misturas físicas.....	36
4.4.4	Desenvolvimento e validação do método analítico de quantificação da HAL por CLAE	36
4.4.5	Caracterização das NNL e NLS.....	38
4.4.6	Estudos de permeação cutânea <i>in vitro</i> da HAL a partir das NNL e NLS.....	41
4.4.7	Avaliação <i>in vivo</i> da resposta inflamatória e da toxicidade da HAL a partir das NNL e NLS.....	41
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
5.1	Obtenção das NNL.....	43
5.2	Obtenção das NLS.....	43
5.3	Desenvolvimento e validação do método analítico de quantificação da HAL por CLAE	43

5.3.1 Validação do método analítico	44
5.4 Caracterização das NNL e NLS	48
5.4.1 Avaliação da EE da HAL nas NNL e NLS.....	48
5.4.2 Determinação do diâmetro médio, do IPD, do pH e do PZ das NNL e NLS.....	49
5.4.3 Microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (FEG-SEM).....	51
5.4.4 Difração de Raios X	52
5.4.5 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	55
5.4.6 Espectroscopia de Raman com Transformada de Fourier (FT-RAMAN).....	60
5.4.7 Análise térmica	65
5.5 Estudos de permeação cutânea <i>in vitro</i> da HAL a partir das NNL e NLS	69
5.6 Avaliação <i>in vivo</i> da resposta inflamatória e da toxicidade da HAL a partir das NNL e NLS	70
6 CONCLUSÃO.....	78
7 REFERÊNCIAS.....	80

1 INTRODUÇÃO

A pele é um dos maiores órgãos do corpo humano e é um tecido dinâmico protetor que atua como uma grande barreira entre o ambiente externo e o organismo interno. Ela está constantemente exposta a uma variedade de poluentes ambientais, substâncias químicas, microrganismos patogênicos e materiais físicos (OTANG & AFOLAYAN, 2016). No entanto, a pele é continuamente submetida a várias lesões e uma área da pele danificada ou ferida inicia uma série de acontecimentos complexos e bem concebidos para que a sua integridade seja rapidamente estabelecida, restaurando sua função normal (CHANDIKA *et al.*, 2015).

A lesão cutânea ainda é um problema de saúde comum e cerca de 11 milhões de pessoas sofrem por lesões cutâneas agudas enquanto que 0,3 milhões de pessoas são hospitalizadas por ano somente nos Estados Unidos (MU *et al.*, 2016). Uma lesão cutânea é definida como uma interrupção da estrutura anatômica normal e fisiológica do tecido e representa danos das barreiras naturais de defesa que favorecem a invasão de microrganismos (MOMOH *et al.*, 2015).

A cicatrização de lesões cutâneas é um evento fisiológico complexo destinado não apenas a restaurar a função barreira da pele e a homeostase, mas também reduzir o risco de infecção e outras complicações (GAINZA *et al.*, 2015). Em indivíduos saudáveis, a maioria das lesões cutâneas cura de uma maneira relativamente rápida, após a homeostase, através de três fases que se sobrepõem: inflamatória, proliferativa e de remodelação ou maturação (ELLIOT *et al.*, 2015).

Contudo a recuperação da pele e a cicatrização podem levar várias semanas de acordo com o tamanho da lesão, o que causa dor, desconforto e grande probabilidade de infecção. Dessa forma, buscam-se mecanismos para acelerar o processo de cicatrização da pele pela utilização de fármacos e medicamentos administrados diretamente sobre a ferida.

Como a primeira fase da cicatrização é uma inflamação, a utilização de anti-inflamatórios com a função de modular a inflamação pode ser uma ferramenta interessante para acelerar o processo de cicatrização, atenuando a dor e o desconforto do indivíduo que tem a pele lesionada, sem interferir na

cascata de eventos relacionados a essa fase. Uma vez que a fase inflamatória é compreendida por vermelhidão e presença de edema e exsudato, a modulação da inflamação poderia reduzir esses efeitos fisiológicos, acelerando o fechamento da lesão cutânea pela cicatrização.

Glicocorticoides tópicos, como a halcinonida (HAL), são a classe de medicamentos mais frequentemente prescritos por dermatologistas (WIEDERSBERG, LEOPOLD & GUY, 2008) e são utilizados para tratar um amplo espectro de doenças inflamatórias e autoimunes (BOARDMAN et al., 2014). A sua eficácia clínica no tratamento de doenças de pele como a psoríase e a dermatite atópica é relacionada com a sua ação vasoconstritora, anti-inflamatória e imunossupressora (WIEDERSBERG, LEOPOLD & GUY, 2008).

Sendo assim, o uso de glicocorticoides tópicos como a HAL para promover a modulação da fase inflamatória acelerando a cicatrização de lesões cutâneas é uma alternativa aparentemente interessante. No entanto, essas substâncias apresentam toxicidade dependente da dose e a administração diretamente na pele lesionada, sem a barreira exercida pelo estrato córneo, poderia levar a absorção e ao aparecimento de efeitos adversos sistêmicos. A encapsulação da HAL em sistemas nanoestruturados como as nanopartículas, que promovem a liberação controlada do fármaco em sítios de ação específicos, é uma ferramenta bastante difundida para reduzir a toxicidade de fármacos e melhorar a sua ação (SCHAFFAZICK & GUTERRES, 2003).

Sistemas nanoestruturados na forma de nanopartículas são carreadores de fármacos com tamanho que, normalmente, variam de 10 a 500 nm e tem a capacidade de encapsular eficientemente moléculas de fármacos com diferentes propriedades físico-químicas (SCHAFFAZICK & GUTERRES, 2003). Nanopartículas com caráter lipídico são amplamente utilizadas para carrear fármacos lipofílicos e são constituídas em maior proporção por lipídeos biocompatíveis e não tóxicos e podem ou não serem associadas a polímeros (KELIDARI *et al.*, 2015).

Nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) são um sistema transportador coloidal para o direcionamento de fármacos, constituídas de lipídeos não irritantes e não tóxicos e as formulações são bem adaptadas para uso na pele inflamada e danificada, formando um filme intacto na superfície da pele (SHAH

et al., 2015). Nanopartículas poliméricas de núcleo lipídico (NNL) são dispositivos nanoestruturados em que uma parede polimérica rodeia um núcleo lipídico capazes de estabilizar as substâncias encapsuladas e controlar a liberação do fármaco melhorando a sua eficácia (CORADINI *et al.*, 2014; FIEL *et al.*, 2014)

Dessa forma, a incorporação da HAL em sistemas nanoparticulados constituídos por lipídeos como as NLS e NNL seria um interessante mecanismo de controle da liberação do fármaco na pele lesionada, por se tratar de preparações biocompatíveis, não irritantes e não tóxicas, reduzindo a toxicidade do fármaco. A administração da HAL atuaria na fase inflamatória da cicatrização modulando a inflamação pela redução de edema e exsudato, além da atenuação da dor e do desconforto causado pela lesão cutânea, acelerando o processo de cicatrização.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver, caracterizar e avaliar a resposta inflamatória da cicatrização e a toxicidade de sistemas nanoparticulados, na forma de NLS e>NNL, carregados com HAL e administrados sobre lesões cutâneas.

2.2 Objetivos específicos

- Obter NLS e>NNL inertes e carregadas com HAL;
- Desenvolver e validar um método de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para quantificação da HAL;
- Determinar a eficiência de encapsulação da HAL das nanopartículas;
- Caracterizar as nanopartículas carregadas com HAL por análises físico-químicas, morfológicas, espectroscópicas e térmicas;
- Determinar a estabilidade das nanopartículas;
- Avaliar a permeação *in vitro* da HAL e das>NNL e NLS carregadas com HAL;
- Avaliar *in vivo*, em modelo animal, o efeito tóxico da HAL, das nanopartículas carregadas e inertes incorporadas em gel de Natrosol® administradas sobre a pele lesionada, assim como a resposta inflamatória durante a cicatrização da lesão cutânea.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 A pele

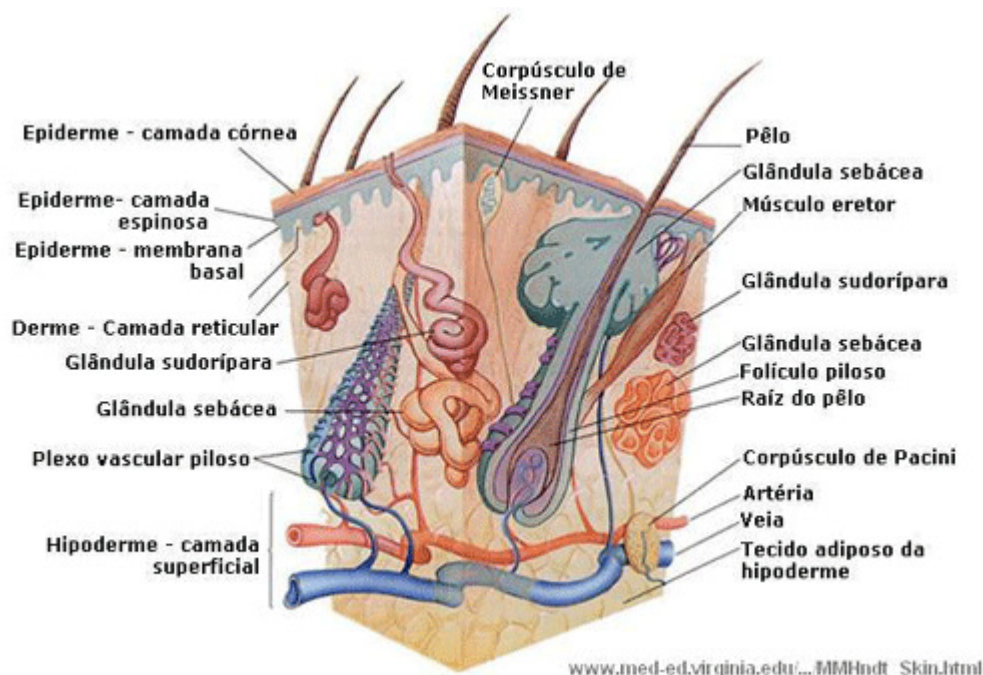
A pele é um dos maiores órgãos do corpo humano com uma área de cerca de 2,0 m² e é a interface entre o organismo e o ambiente, impedindo a perda de água e a entrada de materiais estranhos (SHAHZAD *et al.*, 2015; WIEDERSBERG *et al.*, 2008). A espessura da pele é altamente variável dependendo de fatores como a localização anatômica, idade e sexo. As funções da pele têm sido classificadas como proteção, homeostática e sensorial (SENYIGIT & OZER, 2012).

Conforme é mostrado na Figura 1, a pele é dividida em três camadas distintas: a epiderme, a derme e a camada de gordura subcutânea, ou hipoderme. A epiderme é a camada mais externa da pele e é caracterizada como a parte mais fina e com espessura variável (SHAHZAD *et al.*, 2015). É composta por 4 a 5 subcamadas que, de dentro para fora da pele, são: estrato basal, estrato espinhoso, estrato granuloso, estrato lúcido (presente apenas na palma da mão e sola do pé) e estrato córneo (SENYIGIT & OZER, 2012). A maior parte da epiderme é formada por um epitélio escamoso, que consiste principalmente, por queratinócitos. Essas células se diferenciam em cada estrato, até que chegam ao estrato córneo, que é a camada mais externa da pele (WELSS *et al.*, 2004).

A derme apresenta cerca de 2,0 mm de espessura e contém colágeno, fibras elásticas, vasos sanguíneos, nervos, bem como os folículos capilares e as glândulas sebáceas e sudoríparas. As principais células da derme são os fibroblastos, que estão envolvidos na resposta imune e inflamatória e sobre a qual os receptores de glicocorticoides são encontrados. É a fonte de nutrientes para a epiderme (WIEDERSBERG *et al.*, 2008).

A hipoderme é um tecido subcutâneo que consiste em gordura e músculo e atua como um isolador de calor, amortecedor de choque e uma região de armazenamento de energia (WIEDERSBERG *et al.*, 2008).

Figura 1: Representação das camadas da pele e seus anexos.



A pele é uma barreira natural para a penetração de substâncias. Dessa forma, para o tratamento tópico o fármaco deve atravessar o estrato córneo para atingir as camadas mais profundas da pele. No entanto, o estrato córneo é a principal barreira contra a penetração de substâncias na pele, por ser composto por queratinócitos, localizado em uma matriz lipídica organizada em bicamadas lamelares (BERGH et al., 1997).

O transporte de fármacos através da pele ocorre principalmente por difusão das moléculas através das estruturas da pele. Este percurso pode ser realizado por três vias: entre os corneócitos, permanecendo na matriz lipídica (via intercelular), através dos corneócitos e da matriz lipídica (via transcelular) ou através dos anexos da pele (via apêndices). O transporte pode ser mediado por transporte ativo (os transportadores de proteína facilitam o transporte de fármacos em certos ambientes) e transporte passivo, pelo qual as moléculas são movidas por correntes locais no sistema linfático ou vascular ou pelos espaços intersticiais (JEPPS et al., 2013).

3.2 Lesões cutâneas

Toda lesão que leva à interrupção da continuidade de um tecido corpóreo é chamada de ferida, em maior ou menor extensão, causada por qualquer tipo de trauma físico, químico, mecânico ou desencadeada por uma afecção clínica, que aciona as frentes de defesa orgânica para o contra ataque, chamado de processo de cicatrização (CESARETTI, 1998). As lesões cutâneas, como as feridas, possuem grande importância clínica em função da alta frequência de ocorrência, da morbidade e da proliferação bacteriana presente em um grande número delas (WOUK *et al.*, 1998).

A cicatrização das lesões cutâneas é uma reação natural do organismo que leva à restauração da integridade estrutural e funcional dos tecidos lesionados (AMMAR *et al.*, 2015). Este processo envolve a interação de uma cascata complexa de ações bioquímicas e celulares que induzem a produção e secreção de citocinas pró-inflamatórias, tais como interleucina (IL) -1, fator de necrose tumoral (TNF), fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos e IL-6 (HATANO, 2015).

O processo de reparação da lesão cutânea compreende três estágios ordenados sobrepostos: fase inflamatória, fase proliferativa e a fase de maturação (PARK *et al.*, 2015). Geralmente, a inflamação começa 24 horas após a lesão e compreende os processos de hemostasia, onde o endotélio estimula a ação plaquetária liberando os fatores de crescimento e ativando a formação de fibrina. Forma-se o trombo com a migração de polimorfonucleares e liberação de mediadores inflamatórios. Os neutrófilos são os marcadores de célula predominante na fase de inflamação. Juntamente com os macrófagos removem os detritos de células resultante do ferimento por fagocitose (LI *et al.*, 2015; MOMOH *et al.*, 2015).

A fase de proliferação é iniciada cerca de quatro dias após a lesão. Esta fase é caracterizada pela angiogênese e epitelização, quando o tecido de granulação começa a invadir o espaço da lesão e numerosos novos capilares são gerados no tecido. As células predominantes da fase proliferativa no local da lesão são os fibroblastos, que são responsáveis pela produção da nova matriz necessária para restaurar a função e estrutura do tecido lesionado (LI *et al.*, 2015; PARK *et al.*, 2015).

A fase de maturação ou remodelação começa aproximadamente três a quatro semanas após a lesão, mas somente ocorre após as fases inflamatórias e de proliferação terem sido concluídas. Nesta fase, a remodelação do tecido de granulação ocorre e os tecidos conjuntivos imaturos se transformam em tecidos conjuntivos maduros através da formação de colágeno extracelular (LI *et al.*, 2015; MOMOH *et al.*, 2015; PARK *et al.*, 2015).

As prostaglandinas estão envolvidas tanto na fase inicial de reparação dos tecidos quanto durante a propagação e a migração celular. Assim, a utilização de anti-inflamatórios pode influenciar a evolução do processo de cicatrização. O conhecimento da regulação das respostas do tecido proliferativo pode permitir o desenvolvimento de tratamentos que possibilite melhores condições para a homeostase do tecido e a otimização do processo de cicatrização (CARDOSO *et al.* 2004).

Cardoso *et al.* 2004 sugerem que o tempo de início e a intensidade da resposta inflamatória interferem na velocidade da reparação do tecido e consequentemente no fechamento da lesão cutânea. Segundo o estudo, a resposta inflamatória intensa, iniciada rapidamente contribuiu para um retardo no fechamento das lesões cutâneas nos primeiros dias após a lesão. Esse atraso prejudicado pode ser devido a uma demora na resolução da fase exsudativa do processo inflamatório. Eles também observaram que a indução de uma resposta inflamatória local menos intensa favoreceu o fechamento das lesões na pele mais rapidamente nos primeiros dias após a lesão. Dessa forma, a modulação da inflamação no início da cicatrização aceleraria a reparação do tecido pelo fechamento das lesões.

3.3 Corticosteroides tópicos e a HAL

Os glicocorticoides foram introduzidos na terapêutica dermatológica em 1952, quando a hidrocortisona tópica foi utilizada com sucesso no tratamento de dermatoses (HENGGE *et al.*, 2006). São utilizados no tratamento de doenças inflamatórias da pele como psoríase, dermatite atópica, dermatite de contato ou manifestações cutâneas de doenças autoimunes (GUICHARD *et al.*, 2015).

A potência clínica dos vários esteroides sintéticos depende da taxa de absorção, da concentração nos tecidos alvo, da afinidade para o receptor de esteroides e da taxa de metabolismo e subsequente eliminação (SCHACKE, DOCKE & ASADULLAH, 2002). Formulações de glicocorticoides do mesmo grupo de potência têm eficácia semelhante e podem provocar efeitos secundários semelhantes. Quanto maior a potência, maior é a eficácia terapêutica, mas também maiores serão os efeitos adversos. Formulações de baixa e média potência são consideradas aceitáveis para tratamentos de longo prazo, como em lesões nas áreas do rosto e regiões intertriginosas, enquanto os produtos mais potentes devem ser reservados para tratamentos mais curtos e para uso em pequenos locais, como as palmas das mãos e plantas dos pés, onde os glicocorticoides de baixa potência são ineficazes (WIEDERSBERG *et al.*, 2008; HENGGE *et al.*, 2006).

A ocorrência e a severidade dos efeitos colaterais são dependentes do tempo de utilização, da dosagem, do regime de dosagem e do fármaco utilizado, juntamente com a variabilidade individual do paciente. No entanto, o maior fator de risco é o uso prolongado. A concentração de corticosteroide na circulação sistêmica e o risco de efeitos colaterais sistêmicos são aumentados através da terapêutica prolongada com os glicocorticoides tópicos (SENIYGIT & OZER, 2012).

Os efeitos dos glicocorticoides são mediados via receptores e podem ser resumidos como anti-inflamatório ou imunossupressor; metabólicos e tóxicos. Os efeitos anti-inflamatórios e imunossupressores incluem mudanças na circulação e migração de leucócitos (por exemplo, neutrofilia, linfopenia, e monocitopenia) e alterações nas funções celulares específicas, como inibição de síntese de linfoquinas. Os efeitos anti-inflamatórios e imunossupressores são esperados, porém os efeitos metabólicos e tóxicos são geralmente indesejados (SCHACKE, DOCKE & ASADULLAH, 2002).

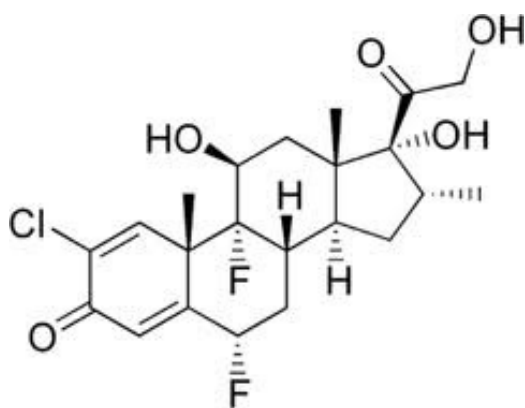
Os efeitos colaterais mais importantes dos glicocorticoides, resultantes do uso tópico, incluem atrofia da epiderme e da derme, ou até mesmo do tecido subcutâneo, que pode resultar no surgimento irreversível de estrias. Também incluem o aumento do crescimento de pelos, acne esteroide, dermatite perioral e distúrbios de pigmentação da pele (SENIYGIT & OZER, 2012; SCHACKE, DOCKE & ASADULLAH, 2002). Os principais efeitos colaterais sistêmicos

associados com glicocorticoides tópicos são o ganho de peso corporal, síndrome de Cushing, desequilíbrio eletrolítico, hipertensão arterial, diabetes mellitus, pseudo aldosteronismo primário, retardo do crescimento, osteoporose, úlcera péptica e gastrite (SENYIGIT & OZER, 2012).

HAL é um glicocorticoide de alta potência (Classe II) com baixo potencial irritativo tópico, poucos efeitos adversos locais com seu uso adequado, prolongado período de atividade e alta taxa de aceitação pelo paciente. É um derivado da hidrocortisona e comparada a ela, HAL apresenta importantes modificações na sua estrutura que alteram a sua absorção, potência e efeitos adversos. É um fármaco que pode ser utilizado para uma grande variedade de doenças inflamatórias da pele sensíveis a esteroides, como eczema, psoríase, lúpus discoide eritematoso, vitiligo e alopecia (TAHERI & FELDMAN, 2012).

HAL é um pó cristalino branco, com caráter lipofílico e insolúvel em água. Possui fórmula molecular $C_{24}H_{32}ClFO_5$, estrutura química (11 β ,16 α)-21-Cloro-9-fluoro-11-hidroxi-16,17-[(1-metiletilidene)bis(oxi)] pregn-4-ene-3,20-diona e sua fórmula estrutural está representada na Figura 2. No Brasil, é encontrado comercialmente sob o nome de Halog[®], produzido pelo laboratório Bristol, nas formas farmacêuticas de creme e pomada, em concentrações de 0,025% e 0,1%.

Figura 2: Estrutura química da HAL.



Fonte: <http://www.abcam.com/Halcinonide-ab145820.html>

3.4 Nanopartículas como sistemas de liberação de fármacos

A nanotecnologia farmacêutica é uma área das ciências farmacêuticas direcionada ao desenvolvimento, à caracterização e à aplicação de sistemas terapêuticos de escala nanométrica. O estudo desses sistemas tem sido realizado com o objetivo de direcionar e/ou controlar a liberação de fármacos (SAKATA *et al.*, 2007).

Essa tecnologia surgiu nos anos 60, resultante do elevado desenvolvimento da microencapsulação, técnica de transformação de líquidos, polímeros e outras substâncias em partículas sólidas com tamanho micrométrico. A microencapsulação já apresentava um amplo potencial em diversas indústrias como, por exemplo, na área alimentícia, têxtil, farmacêutica e cosmética, pela proteção que é capaz de conferir às substâncias lábeis e voláteis (MARQUES *et al.*, 2009). Entretanto, foi no final da década de 1960 que Peter Paul Speiser desenvolveu as primeiras nanopartículas. Embora seu objetivo inicial fosse a liberação sustentada de fármacos a partir de nanocápsulas com o propósito de permitir a administração intravenosa, Speiser centrou-se no desenvolvimento de nanopartículas para fins de vacinação (KREUTER, 2007).

Dentre os sistemas desenvolvidos pela nanotecnologia, incluem-se os sistemas coloidais, como lipossomas, sistemas estabilizados por tensoativos e as nanopartículas. As nanopartículas constituídas por polímeros biodegradáveis têm atraído grande atenção dos pesquisadores devido às suas potencialidades terapêuticas e à estabilidade nos fluídos biológicos e durante o armazenamento (SCHAFFAZICK & GUTERRES, 2003). A nanotecnologia voltada para a liberação de fármacos foi desenvolvida como uma estratégia para melhorar os efeitos terapêuticos dos fármacos, uma vez que o efeito desejado das substâncias incorporadas pode ser conseguido com doses baixas e a duração da ação pode ser aumentada, podendo reduzir a dose e o número de administrações (FIEL *et al.*, 2014).

Dentre as vantagens que as nanopartículas oferecem ao tratamento medicamentoso incluem: maior estabilidade do fármaco no sangue, menor toxicidade, melhor solubilidade aquosa ou lipofílica e melhoria da biodisponibilidade, além de prolongar a meia vida sanguínea, proteger a

substância encapsulada contra a degradação e reduzir efeitos colaterais aumentando a eficácia terapêutica. São compatíveis com a maioria das vias de administração, podendo resolver problemas ligados à adesão a terapia (OLIVEIRA *et al.*, 2013; PARVEEN, MISRA & SAHOO, 2012; KUMARI, YADAV & YADAV, 2010).

As nanopartículas são sistemas estruturados capazes de promover a liberação controlada de fármacos e apresentam todas as vantagens relativas a estes sistemas, como a manutenção da concentração sanguínea nos níveis terapêuticos evitando os níveis tóxicos. Assim, o desenvolvimento de nanopartículas é altamente vantajoso quando se deseja reduzir a toxicidade de fármacos, uma vez que o fármaco estará encapsulado ou disperso em uma matriz polimérica ou lipídica ficando protegido no interior ou entre a matriz da partícula e a sua liberação será realizada lentamente e de forma controlada, garantindo que pequenas quantidades da dose sejam disponibilizadas ao longo do tempo.

3.4.1 Nanopartículas poliméricas de núcleo lipídico (NNL)

As NNL são sistemas carreadores de fármacos que apresentam diâmetro inferior a 1,0 μm . São classificadas como nanocápsulas, por serem constituídas por um invólucro polimérico e um núcleo oleoso, podendo o fármaco estar dissolvido neste núcleo e/ou adsorvido à parede interna polimérica. Nas NNL o núcleo oleoso é formado por uma dispersão de um lipídeo líquido e um lipídeo sólido, que é rodeado por uma parede polimérica e normalmente é estabilizada com polissorbato 80 (CORADINI *et al.*, 2014).

As NNL possuem alta capacidade de encapsular substâncias pouco solúveis em água e têm sido utilizadas para liberação de fármacos por diversas vias de administração, como tópica e sistêmica, além de serem capazes de estabilizar substâncias fotolábeis para controlar a liberação do fármaco e melhorar a eficácia (CHARÃO *et al.*, 2015; FRIDRICH *et al.*, 2015).

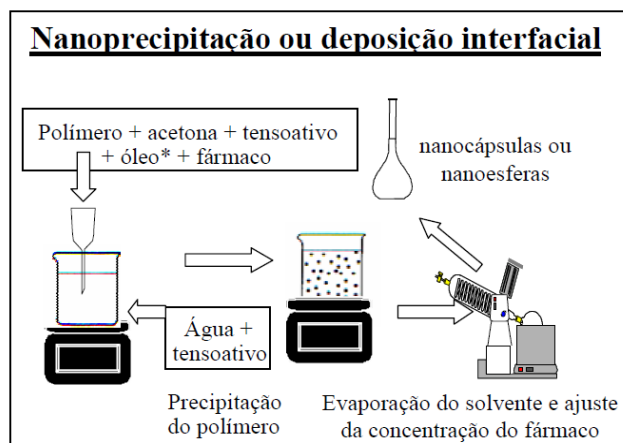
O tratamento de doenças tópicas pode ser melhorado com o uso de uma terapia local realizada com nanopartículas. Alguns autores sustentam a hipótese de que as nanopartículas podem se fixar na matriz lipídica do estrato córneo da pele ou em seus anexos e, subsequentemente, serem lentamente

liberadas para a camada dérmica mais profunda. No entanto, não é adequado classificar as propriedades de permeação das nanopartículas apenas com base nos seus parâmetros intrínsecos, como dimensão ou composição química de superfície, visto que as características das nanopartículas podem mudar completamente quando interagem com meios fisiológicos. Fatores como veículo, densidade e temperatura, por exemplo, podem determinar a agregação e aglomeração das nanopartículas, atingindo dimensões não nanométricas e alterando a carga de superfície (FILON *et al.*, 2015).

Existem diversos métodos relatados na literatura para a preparação de NNL (PINTO REIS *et al.*, 2006). Entre eles, o método mais utilizado é o do deslocamento do solvente ou nanoprecipitação, também chamado de método da deposição interfacial do polímero pré-formado, o qual foi desenvolvido por Fessi *et al.* em 1986. O método inicialmente proposto consiste na mistura de um solvente miscível com a água (acetona ou etanol), do fármaco a encapsular, de um polímero e um tensoativo lipofílico. Essa dispersão é vertida sobre um solvente que não dissolve o polímero (normalmente a água), contendo um tensoativo hidrofílico.

Por este método as nanopartículas são formadas instantaneamente pela rápida difusão do solvente, o qual é removido por pressão reduzida. O mecanismo de formação das nanopartículas pode ser explicado pela turbulência interfacial gerada durante o deslocamento do solvente, devido à mútua miscibilidade entre este e a água. Em 1989, Fessi e colaboradores adaptaram o método para a obtenção de nanocápsulas, adicionando-se um óleo à fase orgânica (Figura 3) (SOUTO, SEVERINO & SANTANA, 2012; SCHAFFAZICK, 2006). Já para a obtenção das NNL adiciona-se um lipídeo sólido dissolvido na fase orgânica, que ficará rodeado pela parede polimérica na nanocápsula (CORADINI *et al.*, 2014).

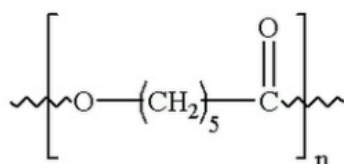
Figura 3: Representação esquemática do método da nanoprecipitação ou deposição interfacial do polímero pré-formado (SCHAFFAZICK, 2006).



A obtenção de nanopartículas pelo método da deposição interfacial é normalmente realizada com uso de polímeros sintéticos. Esses polímeros devem ser biocompatíveis e serem capazes de liberar completamente o solvente ou outros materiais utilizados durante o processo de nanoencapsulação (SOUTO, SEVERINO, SANTANA, 2012).

A poli(ϵ -caprolactona) (PCL) foi um dos primeiros polímeros sintetizados pelo grupo Carothers no início da década de 1930 (AZOUZ *et al.*, 2016). É um polímero alifático semicristalino com fórmula química $(C_6H_{10}O_2)_n$. Apresenta baixo ponto de fusão (60 °C) e propriedades como boa biocompatibilidade, biodegradabilidade e resistência mecânica. Sua fórmula estrutural está representada na Figura 4 (AZOUZ *et al.*, 2016; ABDELRAZEK *et al.*, 2015; SONG *et al.*, 2015; WOODRUFF, HUTMACHER, 2010).

Figura 4: Estrutura química da PCL.



Em sistemas de liberação controlada de fármacos a utilização da PCL apresenta como vantagens a sua alta permeabilidade aos fármacos e poucos produtos de degradação ácidos, em comparação com outros tipos de poliésteres alifáticos como ácido poli-lático (PLA) e ácido poliglicólico (PGA),

sendo que seu produto de degradação da PCL é o ácido 6-hidroxi-hexanóico, um metabolito que ocorre naturalmente no corpo humano (LI, TAN, 2014).

Nas formulações de NNL entre os lipídeos que podem ser utilizados está o triglicerídeo do ácido cáprico/caprílico. É um triglicerídeo de cadeia média constituído principalmente por ésteres de ácidos caprílicos e cápricos derivados do óleo de coco. Apresenta baixa viscosidade e espalhamento como resultado de sua característica saturada, além de ser biocompatível e pouco suscetível à oxidação. Devido ao tamanho da cadeia, o triglicerídeo do ácido cáprico e caprílico apresenta excelente solubilidade em álcool e daí sua importância na aplicabilidade em produtos farmacêuticos. Pode ser usado como uma alternativa aos óleos vegetais, com a vantagem de deixar uma sensação menos oleosa na pele e ser um bom solvente para substâncias lipossolúveis (BARS *et al.*, 2015; www.mapric.com.br; www.fagron.com.br).

3.4.2 Nanopartículas lipídicas sólidas (NLS)

As NLS têm sido utilizadas como um transportador eficiente de fármacos por apresentarem boa estabilidade, baixa toxicidade, elevada biocompatibilidade, boa biodisponibilidade e capacidade de produção em grande escala (ARANA *et al.*, 2015; NEGI *et al.*, 2013). As NLS permitem a incorporação de fármacos lipofílicos com capacidade de transportar grande quantidade de fármacos promovendo liberação controlada e protegendo os compostos ativos. Ainda apresenta baixo custo e não é irritante na pele (ARANA *et al.*, 2015; SHAH *et al.*, 2015; GHADIRI *et al.*, 2012).

As NLS são definidas como nanocarreadores lipídicos, que se apresentam geralmente de forma esférica, contendo em seu núcleo um lipídeo sólido a temperatura ambiente e corporal podendo ser um mono, di ou triglicerídeo, ácidos graxos, esteroides e ceras, entre outros, estabilizados por várias classes de agentes emulsionantes (SHAH *et al.*, 2015). A solidez característica dos lipídeos que formam as NLS confere pouca mobilidade aos fármacos nelas incorporadas sendo capazes de sustentar e controlar a velocidade da liberação desses fármacos (MEHNERT, MADER 2012).

A produção das NLS pode ser realizada em grande escala sem a utilização de solvente orgânico e as nanopartículas apresentam estabilidade

física por um longo prazo (JESUS, ZUHORN, 2015). Para a obtenção das NLS um dos métodos mais utilizados é a homogeneização a quente, a qual ocorre a temperaturas acima do ponto de fusão do lipídeo. Uma emulsão do tipo óleo-em-água (O/A) é obtida com o fármaco dissolvido na fase lipídica e uma fase aquosa contendo um emulsionante hidrofílico e são aquecidos à mesma temperatura e são misturados sob agitação na temperatura de fusão do lipídeo por alta rotação como a proveniente pelo agitador do tipo Ultra-Turrax (MEHNERT, MADER, 2012). Dessa forma, as NLS são obtidas pela adição da emulsão ainda quente em água gelada, seguido de forte agitação e retirada do excesso de água. Assim, como a fase interna da emulsão é composta por lipídeos de baixo ponto de fusão, quando ela entra em contato com a água gelada as nanogotas lipídicas sofrem cristalização (MARENGO et al., 2000).

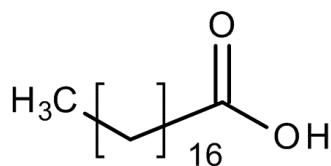
Em geral, temperaturas elevadas resultam em tamanhos de partículas menores devido à diminuição da viscosidade da fase interna. No entanto, temperaturas muito elevadas podem aumentar a taxa de degradação do fármaco e do lipídeo (MEHNERT, MADER, 2012).

Os compostos utilizados para produzir NLS são bem tolerados e apresentam pouca toxicidade (JESUS, ZUHORN, 2015). O ácido esteárico (AE) e os seus derivados têm sido utilizados na preparação de produtos farmacêuticos e cosméticos. Apresenta vários benefícios para a saúde quando consumido por via oral ou aplicado localmente sobre a pele (SAGIRI *et al.*, 2015).

AE é o segundo ácido graxo saturado natural mais abundante, depois do ácido palmítico (SAGIRI *et al.*, 2015). Possui características desejáveis para produção de NLS incluindo baixa temperatura de fusão, estabilidade térmica e química e não apresenta toxicidade (LATIBARI *et al.*, 2015). Tem ponto de fusão mais elevado do que a temperatura corporal (37 °C), é biocompatível com os tecidos humanos e tem sido utilizada na composição de formas farmacêuticas para a liberação controlada de fármacos (SAGIRI *et al.*, 2015).

AE é um ácido graxo saturado com estrutura molecular $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_{16}\text{-COOH}$ (SOUZA *et al.*, 2015) e sua fórmula estrutural é mostrada na Figura 5. Devido ao rearranjo dos grupos carboxila e metila para a forma cristalina, muitas fases polimórficas podem ser obtidas dependendo das condições da cristalização e do tipo de solvente utilizado (SOUZA *et al.*, 2015).

Figura 5: Estrutura química do AE.



Polimorfismo é a capacidade que uma molécula possui de cristalizar-se em duas ou mais formas. O polimorfo é uma fase cristalina sólida de um determinado composto que embora tenha a mesma composição apresentam diferentes estruturas e propriedades, como por exemplo, ponto de fusão, ponto de ebulição, condutividade, volume, densidade, cor, morfologia, higroscopicidade, solubilidade, dissolução e estabilidade química. O surgimento de uma determinada forma cristalina é influenciada pela temperatura, taxa de cristalização, natureza do solvente, pureza do próprio ácido e pelo número de átomos de carbono presentes na cadeia (ALMEIDA, 2014). A forma polimórfica influencia na concentração de saturação sendo que a solubilidade é maior para as modificações polimórficas que apresentam alta energia interna e baixo ponto de fusão. Em geral, sabe-se que a forma mais cristalina de um polimorfo é a mais estável devido, principalmente, a sua baixa energia livre, o seu alto ponto de fusão e a sua baixa solubilidade (DURAN et al., 2010).

Ácidos carboxílicos saturados normais podem ser representados pela fórmula geral $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n + 2\text{COOH}$, onde n pode ser par ou ímpar, apresentam um complexo e variado comportamento polimórfico. O polimorfismo dos ácidos graxos depende da paridade do número n e é uma função de temperatura. Quando os ácidos carboxílicos apresentam n par estes se cristalizam nas formas A_1 , A_2 , A_3 , A_{super} , $B_{o/m}$, C e $E_{o/m}$. Já para aqueles que apresentam n ímpar são observadas as formas cristalinas A'' , B'' , C' , C'' e D'' . Os polimorfos que possuem formas cristalinas A_1 , A_2 , A_3 , A_{super} correspondem à simetria triclínica. Já as formas $B_{o/m}$, C e $E_{o/m}$ correspondem à simetria monoclínica. No que diz respeito aos polimorfos designados por A'' e B'' pode-se obter a cristalização dos mesmos na simetria triclínica. As formas cristalinas C' e C'' pertencem à simetria monoclínica. No ácido esteárico podem ocorrer as fases

A_2 (triclínico), B_m (monoclínico), B_o (ortorrômbico), C (monoclínico), E_m (monoclínico) e E_o (ortorrômbico) (ALMEIDA, 2014).

As NLS podem ser aplicadas com segurança sobre a pele inflamada e/ou danificada. O pequeno tamanho das partículas lipídicas assegura a sua íntima associação com o estrato córneo controlando a quantidade de fármaco que penetra na pele e após aplicação tópica as propriedades oclusivas das suspensões de NLS evitam a perda de água. As NLS são uma ótima alternativa para o transporte de fármacos glicocorticoides por permitir a liberação prolongada do fármaco no local de ação reduzindo, assim, os efeitos secundários dependentes da dose desses fármacos, conforme relatado por Prahdan, Singh, Singh (2015) com o uso de NLS contendo fluocinolona para tratamento da psoríase.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Equipamentos

- Agitador magnético com aquecimento (SOLAB, modelo SL-91, Piracicaba, Brasil);
- Balança analítica (CELTAC, modelo FA2104N, São Paulo, Brasil);
- Balança termogravimétrica (SHIMADZU, modelo TGA-50, Quioto, Japão);
- Bomba de vácuo (FISATOM, modelo 830, São Paulo, Brasil);
- Ultracentrífuga refrigerada (HITACHI, modelo Himac CR21GII, Tóquio, Japão);
- Destilador de água (FANEM LTDA, modelo 724/2-A, São Paulo, Brasil);
- Difrátômetro de raios X (RIGAKU, modelo Ultima IV, Quioto, Japão);
- Espectrômetro infravermelho com transformada de Fourier (SHIMADZU, modelo IR Prestige-21, Quioto, Japão);
- Espectrômetro de auto-correlação a laser (MALVERN INSTRUMENTS, modelo Zetasizer Nanoseries ZS90, Malvern, Reino Unido);
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência (MERCK-HITACHI, modelo Lachrom D-7000, Tóquio, Japão);
- Metalizador (SHIMADZU, modelo IC-50 Ion Coater, Quioto, Japão);
- Microscópico eletrônico de varredura (SHIMADZU, modelo SSX-550, Quioto, Japão);
- Sistema de ultrapurificação de água (Milli-Q®, MILLIPORE, Bedford, Estados Unidos);
- Potenciômetro digital de bancada (HANNA INSTRUMENTS, modelo HI 221, São Paulo, Brasil).
- Dispersor ULTRA TURRAX IKA T 18 Basic de alta performance.
- Equipamento de Termogravimetria – Calorimetria exploratória diferencial simultâneas - NETZCH STA 409 PC/PG.

4.2 Matérias primas e solventes

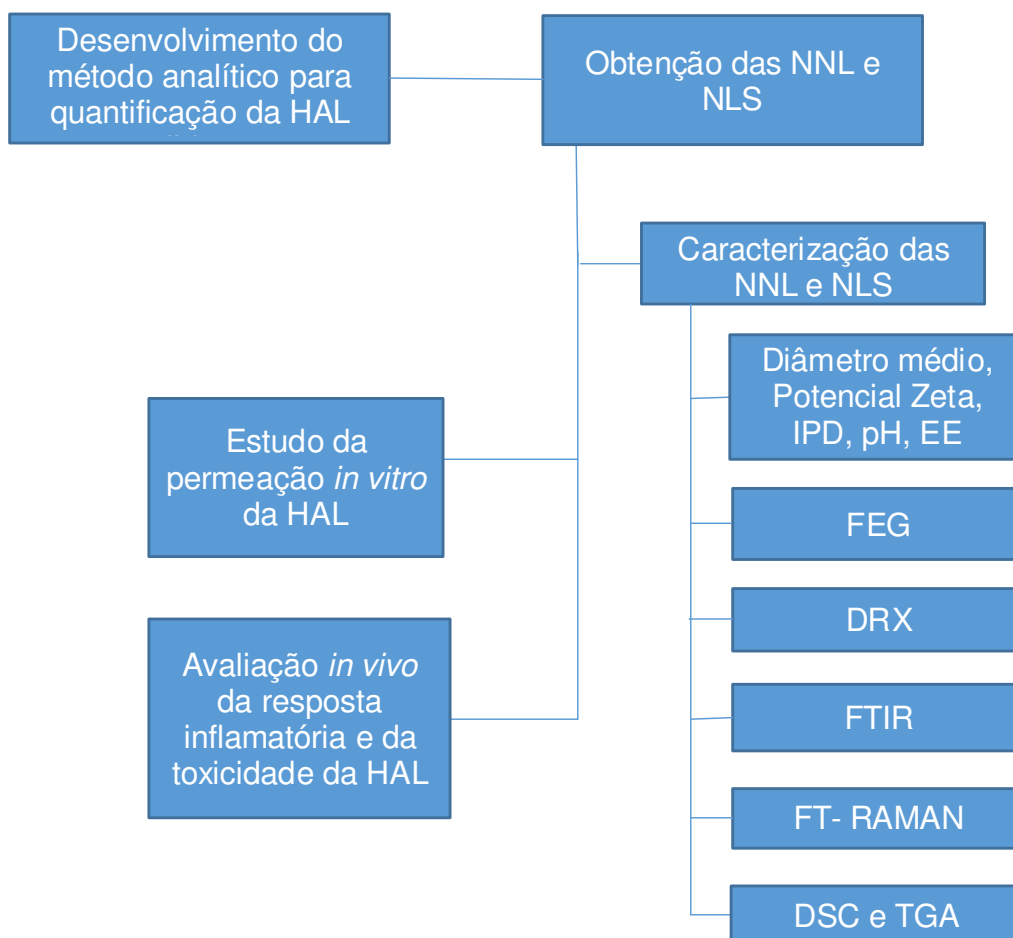
- Halcinonida (HAL) - $C_{24}H_{32}ClFO_5$, 454.96 g.mol⁻¹, teor de pureza 99,2% (FAGRON, São Paulo, Brasil);

- Poli(ϵ -caprolactona) (PCL, M_w 10.000-14.000 g.mol⁻¹, SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO, Estados Unidos);
- Água ultrapura obtida através de filtração Milli-Q® (MILLIPORE, Bedford, Estados Unidos).
- Acetona P.A (VETEC, Rio de Janeiro, Brasil);
- Brometo de potássio grau espectroscópico (KBr) (SIGMA-ALDRICH, St. Louis, Estados Unidos);
- Metanol grau HPLC (EMD CHEMICALS INC., Darmstadt, Alemanha);
- Monooleato de sorbitano etoxilado (polissorbato 80, Tween® 80, DELAWARE, Porto Alegre, Brasil);
- Monoestearato de sorbitano (Span 60®, SIGMA-ALDRICH, St. Louis, Estados Unidos);
- Ácido esteárico (FAGRON, São Paulo, Brasil).
- Triglicerídeo do ácido cáprico e caprílico (FAGRON, São Paulo, Brasil).
- Álcool etílico absoluto (JAND QUÍMICA, São Paulo, Brasil).
- Natrosol® (PHARMA NOSTRA, Rio de Janeiro, RJ).
- Citrato de fentanila (CRISTÁLIA, Itapira, SP).
- Ketamina (CEVA, Paulínia, SP).
- Xilazina (HERTAPE CALIER, Juatuba, MG).

4.3 Desenho experimental

O fluxograma da Figura 6 apresenta de forma esquemática as etapas realizadas. Inicialmente as NNL e NLS foram obtidas por diferentes métodos. Um método analítico para quantificação da HAL incorporada nas nanopartículas foi desenvolvido e validado por CLAE. As NNL e NLS foram caracterizadas quanto a sua morfologia, suas propriedades físico-químicas por técnicas espectroscópicas e pelo comportamento térmico. A estabilidade física das nanopartículas foi avaliada após armazenamento das amostras por 60 dias. A permeação *in vitro* da HAL pela pele, simulada por membrana sintética, foi realizada, assim como um estudo *in vivo* para avaliação da resposta inflamatória e da toxicidade do fármaco liberado a partir das nanopartículas.

Figura 6: Fluxograma das etapas realizadas no desenvolvimento da pesquisa.



4.4 Procedimento experimental

4.4.1 Obtenção das NNL

Para o preparo da formulação das NNL, foi utilizado o método da deposição interfacial do polímero pré-formado, segundo descrito por Fiel *et al.*, (2014). A fase orgânica contendo o polímero PCL (0,1 g), triglicerídeo de ácido cáprico/caprílico (0,3 g), Span® 60 (0,077 g) e a HAL (0,03 g) foram dissolvidos em acetona (27 mL) e acrescentados à fase aquosa contendo Tween® 80 (0,077 g em 53 mL) por gotejamento e sob moderada agitação e temperatura constante de 40° C. O solvente orgânico foi removido por evaporação sob pressão reduzida. A suspensão foi evaporada até volume final de 10 mL. As amostras foram preparadas com e sem fármaco (controle) em triplicata.

4.4.2 Obtenção das NLS

As NLS foram obtidas pelo método de homogeneização a quente modificado segundo descrito por DOLATABADI *et al.* (2014). O AE (2,5 g) foi aquecido a aproximadamente 70 °C (para sua completa fusão) juntamente com a HAL (0,150 g). A solução aquosa contendo Tween® 80 (0,5 g em 30 mL) foi aquecida à mesma temperatura da fase lipídica, em béquer separado. Então, a fase aquosa foi vertida sobre a fase lipídica e homogeneizada com o auxílio de Ultra-Turrax, na velocidade de 16000 rpm durante 10 min a 70 °C. A solidificação das nanopartículas foi obtida dispersando esta emulsão formada em água gelada (20 mL a 0 °C) a 3400 rpm em Ultra-Turrax durante 1 min. Após este tempo, a dispersão de nanopartículas foi mantida em repouso em banho de gelo por 5 min e armazenadas em geladeira. As amostras foram preparadas com e sem fármaco (controle) e em triplicata.

4.4.3 Obtenção das misturas físicas

As misturas físicas (MF) entre o polímero (PCL) e a HAL e entre o lipídeo sólido (AE) e a HAL foram preparadas para estudos de caracterização comparativos com as formulações das nanopartículas desenvolvidas. Essas misturas foram constituídas na proporção, em massa, de 1:1 (PCL:HAL) e (AE: HAL) com auxílio de gral e pistilo.

4.4.4 Desenvolvimento e validação do método analítico de quantificação da HAL por CLAE

4.4.4.1 Equipamentos e condições cromatográficas

As análises por CLAE foram realizadas em cromatógrafo MERCK-HITACHI (Lachrom D-7000), equipado com detector de UV L-7400, bomba L-7100, degaseificador e injetor manual Rheodyne (volume de injeção: 20 µL), controlado por *software* Chromquest. As amostras foram injetadas com seringa de 100 µL (HAMILTON, Microliter 710).

Uma coluna analítica de fase reversa GL Sciences Inertsil® ODS3 (150 mm x 4.6 mm, 5 µm) e uma pré-coluna GL Sciences Inertsil® ODS3 (10 mm x 4 mm, 5 µm), mantidas à temperatura ambiente, foram utilizadas. A eluição foi realizada de modo isocrático, com fase móvel (FM) constituída de

metanol:água (85:15 v/v) e vazão de 1,0 mL.min⁻¹. O tempo de análise foi de 10 minutos e a detecção ocorreu em 239 nm (KIRSCHBAUM *et al.*, 1980).

4.4.4.2 Validação do método analítico

A validação do método analítico por CLAE foi realizada segundo os critérios propostos pelo *International Conference on Harmonization of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use* (ICH, 2005) e pela Resolução 899 de 29 de maio de 2003 (ANVISA, 2003). Os parâmetros avaliados foram especificidade, linearidade, precisão, exatidão, limites de detecção e de quantificação e robustez.

A especificidade foi determinada pela análise dos cromatogramas obtidos para as nanopartículas sem HAL (controle negativo) e para as contendo o fármaco, com o objetivo de avaliar a interferência dos outros componentes das formulações no tempo de retenção da HAL.

Para o estudo da linearidade, foram elaboradas três curvas analíticas nas concentrações de 10,0; 15,0; 20,0; 30,0 e 40,0 µg mL⁻¹ de HAL, na FM metanol:água (85:15 v/v). A equação da reta e o coeficiente de correlação (*r*) foram determinados com base no cálculo de regressão linear de mínimos quadrados.

O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) foram calculados segundo as equações descritas no ICH (2005), através da inclinação da reta da curva analítica.

A precisão foi determinada pela repetibilidade, reprodutibilidade e precisão intermediária. A repetibilidade foi realizada a partir da análise de seis amostras independentes, na concentração de 25,0 µg.mL⁻¹, no mesmo dia e nas mesmas condições experimentais. Para a reprodutibilidade foram analisadas 6 amostras (25,0 µg.mL⁻¹) pela manhã e 6 amostras a tarde, no mesmo dia, seguida por mais 6 amostras na manhã seguinte. Para a avaliação da precisão intermediária as amostras (n=6) foram preparadas e analisadas por outro analista. Os resultados foram expressos por desvio padrão relativo (DPR).

A exatidão foi determinada utilizando três níveis de concentração: baixo, intermediário e alto, concentrações essas intermediárias à curva de calibração (17,5; 25,0 e 35,0 µg.mL⁻¹) e efetuadas em triplicata. A recuperação

foi realizada preparando-se uma solução inicial na concentração de $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$; em seguida uma nova solução com concentração conhecida de fármaco foi preparada utilizando a primeira solução como diluente, resultando assim numa concentração final de $700 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Essas soluções foram preparadas em triplicata e diluídas para a concentração de $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para que se mantivesse dentro da faixa de linearidade estabelecida pelo método. Para ambas as técnicas utilizadas, a verificação da exatidão do método foi realizada pelo valor da concentração média obtida comparada ao valor teórico, considerado 100 %.

Para o estudo da robustez, a vazão do fluxo foi alterada para 0,995 e $1,005 \text{ mL.min}^{-1}$ e a FM foi alterada para metanol:água 84:16 (v/v) e 86:14 (v/v). Os estudos foram realizados em sextuplicata e os resultados foram analisados por DPR.

4.4.4.3 Análise estatística da validação do método analítico por CLAE

A análise estatística foi realizada por Análise de Variância (ANOVA) e análise de resíduos, utilizando *software* Statistica 8.0 (Statsoft, Inc.).

4.4.5 Caracterização das>NNL e NLS

4.4.5.1 Avaliação da Eficiência de Encapsulação (EE) da HAL nas nanopartículas

As>NNL e NLS foram submetidas à ultrafiltração/centrifugação em centrífuga a 40000 rpm durante 10 minutos com auxílio de uma membrana de 100 kDa (Amicon® 10.000 Mw, Milipore), que faz a separação da fase aquosa (contendo o fármaco livre) da parte da suspensão coloidal, sendo possível determinar a concentração do fármaco livre, através da determinação indireta. A HAL livre foi determinada no ultrafiltrado e a EE (%) foi calculada pela diferença entre a concentração teórica e a concentração encontrada de fármaco livre, empregando o método de CLAE validado.

4.4.5.2 Determinação do pH das suspensões das nanopartículas

A determinação do pH foi realizada em potenciômetro digital previamente calibrado com soluções tampão pH 4,0 e 7,0, diretamente nas

suspensões coloidais, após a preparação. Os resultados representam a média da triplicata.

4.4.5.3 Determinação do diâmetro médio das nanopartículas, do índice de polidispersão (IPD) e do potencial zeta (PZ)

O diâmetro médio das NNL e NLS e o IPD, referente à distribuição de seu tamanho, foram avaliados ($n=3$) por espectroscopia de correlação de fótons após diluição de uma alíquota de suspensão de nanopartículas em água ultrapurificada (1:500 v/v). As medidas foram realizadas utilizando o equipamento Zetasizer Nano Series ZS90 (MALVERN INSTRUMENTS). No mesmo equipamento, o PZ foi determinado por meio da técnica de mobilidade eletroforética, com o mesmo preparo de amostras para a análise do tamanho de partícula.

4.4.5.4 Análises morfológicas e de superfície por microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (*Field Emission Gun Scanning Electron Microscopy* – FEG-SEM)

A avaliação morfológica e de superfície das NNL e NLS foram realizadas em microscópio eletrônico de varredura por emissão de campo (TESCAN, modelo Mira 3, Brno, República Tcheca). As suspensões foram depositadas sobre os stubs de análise, secos em estufa a 37° C e submetidas à metalização com ouro em metalizador IC-50 Ion Coater (SHIMADZU, Quioto, Japão). Para obtenção das eletromicrografias, foram empregadas voltagens de aceleração de 10 e 15 kV em vários aumentos.

4.4.5.5 Análise por difração de raios X (DRX)

As suspensões de NNL e de NLS foram depositadas sobre lamínula de vidro e secas em estufa a 37 °C. HAL, PCL, AE e MF não receberam tratamento prévio à análise. Na sequência, as amostras foram examinadas em difratômetro de raios X (RIGAKU, modelo Ultima IV), scan de 2°.min⁻¹ e 2 θ de 5° a 60°, radiação K α de cobre ($\lambda=1.5418\text{\AA}$), corrente de 40 mA e voltagem 30 kV, para a observação de possíveis picos indicativos de cristalinidade.

4.4.5.6 Avaliação por espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (*Fourier transform infrared spectroscopy* - FTIR)

As NNL e de NLS liofilizadas foram analisadas por espectroscopia na região do infravermelho, em pastilha com KBr, empregando 4 mg de cada amostra e 196 mg de KBr grau espectroscópico (2% m/m), no equipamento IR Prestige-21 (SHIMADZU), 32 scans.min⁻¹, resolução de 4 cm⁻¹, na faixa de 4000 a 400 cm⁻¹.

4.4.5.7 Avaliação por espectroscopia RAMAN com Transformada de Fourier (FT-RAMAN)

As NNL e NLS liofilizadas foram analisadas por espectroscopia FT-RAMAN utilizando um equipamento com laser de Nd:YAG com comprimento de onda de 1064 nm, potência nominal de 500 mW e detector de germânio, mantido sob refrigeração de nitrogênio líquido. Os dados do espectrômetro foram coletados através do software OPUS 6.5, onde ocorre a correção de *background* e os interferogramas são convertidos em espectros via transformada de Fourier. O equipamento operou com resolução espectral de 4 cm⁻¹, número de varreduras igual a 150, intervalo espectral de 4000 a 400 cm⁻¹ e potência do laser de 50 mW. As amostras foram analisadas com o apoio da COMCAP (UEM).

4.4.5.8 Análise térmica

A estabilidade térmica das amostras liofilizadas foi estudada por análise termogravimétrica (TGA) e por calorimetria diferencial de varredura (DSC), realizadas por aquecimento até 500 °C em equipamento da NETZCH STA 409 PC/PG. Foram pesadas aproximadamente 10 mg de cada amostra e acondicionadas em cadinhos de platina. As curvas térmicas foram obtidas sob fluxo de nitrogênio (20 mL.min⁻¹) a uma taxa de aquecimento de 10° C. min⁻¹. As amostras foram analisadas com o apoio da COMCAP (UEM).

4.4.5.9 Estudo de estabilidade das NNL e NLS

As suspensões de NNL foram armazenadas à temperatura ambiente (25 °C) e protegidas da luz em frascos âmbar e as NLS foram armazenadas em

refrigeração. As amostras foram monitoradas durante 60 dias pelas determinações de pH, diâmetro médio de partícula, IPD e potencial zeta e os resultados foram comparados com as análises realizadas após a preparação.

4.4.6 Estudos de permeação cutânea *in vitro* da HAL a partir das NNL e NLS

O estudo de permeação cutânea *in vitro* foi realizado em células verticais de difusão, com um compartimento receptor de 12 mL e uma área disponível de 1,77 cm². Membranas sintéticas *Strat M* (Merck Millipore®) foram utilizadas no estudo por apresentarem alta similaridade com a pele humana.

As amostras de NNL e NLS carregadas com HAL e o fármaco livre foram individualmente incorporadas em gel de natrosol a 0,5 %, mantendo a concentração do fármaco em 0,1 % em todas as amostras. A membrana foi posicionada entre o compartimento doador e receptor das células verticais de difusão, conforme indicação do fabricante. No compartimento doador foi adicionado 1,0 g de gel contendo as amostras e o sistema foi mantido sob agitação constante e à temperatura de 37 °C. Considerando o caráter lipofílico da amostra em estudo, o compartimento receptor foi preenchido com álcool isopropílico, garantindo a condição “*sink*”. Foram retiradas alíquotas de 3,0 mL do meio receptor nos tempos 1, 2, 4, 6, 8, 12 e 24 horas e o volume foi repostado.

O fármaco permeado contido nas alíquotas, considerando o volume total da célula e a área efetiva para liberação na célula foi quantificado por CLAE utilizando o método analítico validado. O estudo foi realizado em triplicada.

4.4.7 Avaliação *in vivo* da resposta inflamatória e da toxicidade da HAL a partir das NNL e NLS

O estudo *in vivo* foi realizado com 72 ratos Wistar com peso entre 200 e 250 g. Os animais foram distribuídos em seis grupos (n=12) e em cada animal foi produzida uma lesão na região lombar de 2,0 cm², após anestesia com ketamina (40,0 mg.kg⁻¹) e xilazina (5,0 mg.kg⁻¹) por via intraperitoneal. Após a produção das lesões, os animais receberam citrato de fentanila (2,0 mg.kg⁻¹), para que fosse minimizado o desconforto no pós operatório e assim que os animais retornaram da anestesia, receberam água e ração comercial *ad*

libitum. A metodologia foi realizada conforme projeto de pesquisa aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UEPG (Protocolo 050/2015).

O tratamento das lesões iniciou-se aproximadamente 12 horas após a produção das lesões e cada animal foi tratado diariamente, durante 15 dias, com 0,5 mL de gel de natrosol a 0,5 % contendo as amostras administrados sobre as lesões. Os grupos de animais tratados foram: (i) gel com NNL-HAL; (ii) gel com NLS-HAL; (iii) gel com NNL inerte; (iv) gel com NLS inerte; (v) gel com HAL livre; (vi) gel sem amostra (controle). A concentração da HAL em todas as amostras que a continham foi de 0,1 %. Durante o tratamento não ocorreu nenhuma aproximação dos bordos da lesão cutânea e a avaliação da cicatrização foi realizada por segunda intenção.

As lesões de cada animal foram avaliadas segundo a clínica macroscópica por hemorragia local, presença de coágulos, crostas, tecido de granulação, epitelização e presença de exsudato. A área de cada lesão foi mensurada nos dias 0, 3, 6, 9, 12, 15 e 18, posicionando um plástico transparente sobre a lesão e demarcando com caneta de retroprojeter a sua área para a avaliação da retração média da área da lesão por grupo. A medida da área foi realizada pela digitalização das imagens obtidas utilizando o programa ImageJ® e os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e comparados pelo teste de Tukey.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Obtenção das NNL

As suspensões de NNL obtidas apresentaram macroscopicamente o aspecto de um líquido leitoso e opalescente com reflexo azulado, relacionado ao movimento browniano das estruturas coloidais (Efeito Tyndall) em acordo com os resultados previamente relatados para outros sistemas nanoparticulados (SCHAFFAZICK et al., 2003; MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010).

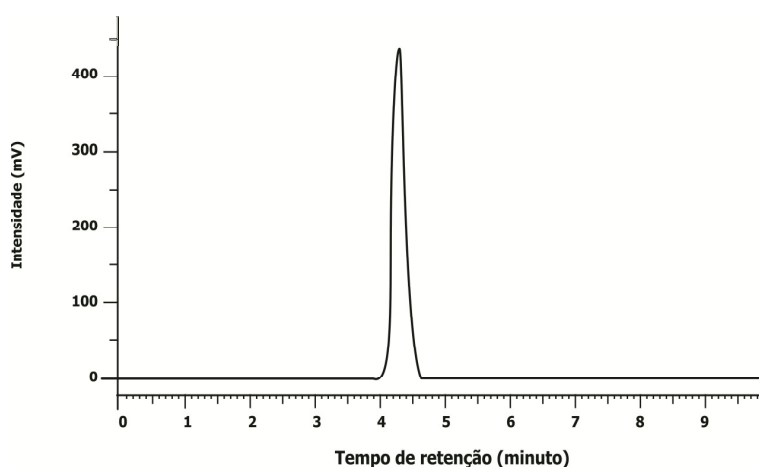
5.2 Obtenção das NLS

As NLS obtidas apresentaram-se macroscopicamente como uma emulsão branca leitosa, sem separação de fase, formação de creme ou qualquer outro aspecto que pudesse indicar instabilidade física.

5.3 Desenvolvimento e validação do método analítico de quantificação da HAL por CLAE

O método analítico para quantificação da HAL nas nanopartículas foi desenvolvido por CLAE e a Figura 7 mostra o cromatograma obtido pela injeção de uma solução de HAL na FM (metanol:água, 85:15, v/v) de $25,0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. O tempo de retenção do fármaco foi de 4,21 minutos.

Figura 7: Cromatograma obtido para HAL ($25,0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; FM: metanol:água, 85:15, v/v).



5.3.1 Validação do método analítico

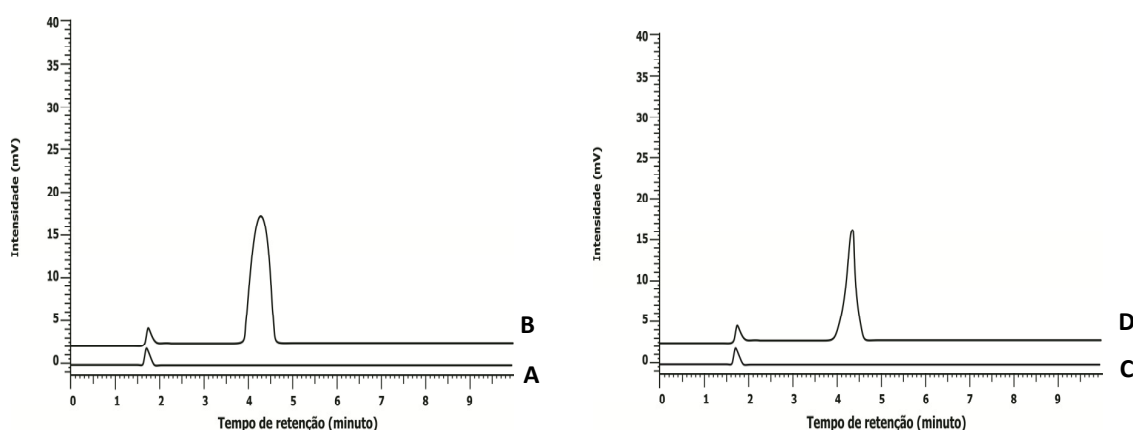
Para garantir que o método analítico desenvolvido forneça informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve passar por um processo de avaliação denominado validação, que garante a confiabilidade e a rastreabilidade dos resultados (RIBANI et al., 2004).

5.3.1.1 Especificidade

É a capacidade que o método possui de medir exatamente uma substância na presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da formulação (BRASIL, 2003).

Para garantir a especificidade do método desenvolvido foram comparadas as formulações de nanopartículas inertes com as que continham o fármaco. O método desenvolvido demonstrou ser específico para a HAL, conforme demonstrado pela Figura 8, uma vez que o pico referente ao fármaco ($t_R = 4,2$ min) não apareceu nas formulações NNL e NLS inertes (sem HAL), indicando que não houve interferência dos demais componentes das formulações das nanopartículas para a quantificação do fármaco.

Figura 8: Cromatograma das nanopartículas: (A) NLS inerte; (B) NLS-HAL; (C) NNL inerte e (D) NNL-HAL (FM: metanol:água, 85:15, v/v).

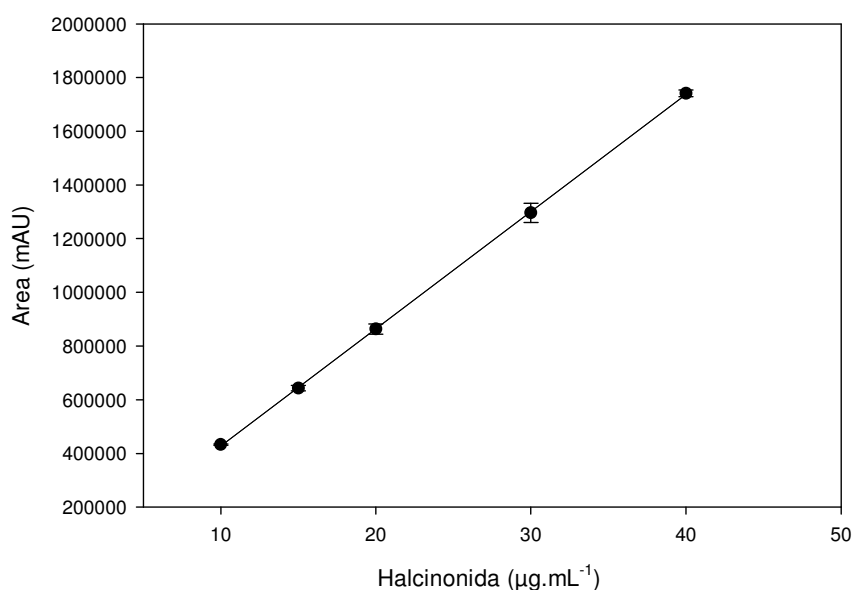


5.3.1.2 Linearidade

A linearidade do método analítico corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em análise dentro de um determinado intervalo (BRASIL, 2003).

A equação geral da reta foi obtida através da média de três curvas analíticas. O intervalo estudado foi de 10 a 40 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Figura 9) e a equação da reta representativa da linearidade é $y = 43639,9632x - 8299,2874$ ($n=3$) com coeficiente de correlação (r) igual a 0,9994. O método se mostrou linear dentro do intervalo de concentração determinado e o valor de r foi maior que 0,99; valor mínimo aceitável segundo a RE 899/2003 (ANVISA).

Figura 9: Representação gráfica da curva analítica da HAL obtida por CLAE (FM: metanol:água 85:15 v/v; $\lambda = 239$ nm)



De acordo com o *Analytical Methods Committee*, um valor de coeficiente de regressão próximo a 1,00 não é, necessariamente, o resultado de uma relação linear e, em consequência, o teste para a falta de ajuste que avalia a variação dos valores residuais deve ser aplicado (GOMES *et al.*, 2015; KLEIN *et al.*, 2012). A ANOVA para a linearidade do método está apresentada na Tabela 1. O valor de F para a falta de ajuste foi menor que o valor de F

tabelado para o intervalo de 95% de confiança ($\alpha = 0,05$) indicando que a regressão linear não mostrou falta de ajuste.

Tabela 1: Resultado ANOVA para a linearidade do método desenvolvido para HAL.

	SS	df	MS	F	F_{tab}
Modelo	1.8581×10^8	1	1.8581×10^8	0.60	3.04
Resíduo	4.0503×10^9	1 3	3.1156×10^8	Linear	
Falta de ajuste	2.2397×10^8	3	0.7465×10^8	0.195117	2.72
Erro puro	3.8263×10^9	1 0	3.8263×10^8	<i>Não há falta de ajuste</i>	

SS: soma dos quadrados dos resíduos; df: graus de liberdade; MS: quadrados médios dos resíduos; F: valor do teste F; F_{tab}: valor de F tabelado

5.3.1.3 Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

O LD é a menor quantidade de analito presente em uma amostra que pode ser detectada, porém não necessariamente quantificada. Já o LQ representa a menor quantidade presente em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas (BRASIL, 2003). Os valores obtidos para LD e LQ da HAL pelo método desenvolvido foram de $0,04 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $0,14 \mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente.

5.3.1.4 Precisão

Os resultados obtidos para a precisão estão descritos na Tabela 2. As análises de repetibilidade, reprodutibilidade e precisão intermediária mostraram que o método desenvolvido para a quantificação da HAL foi preciso, pois os valores de DPR de todos os parâmetros foram menores que 5,0 %, conforme estabelecido pela RE 899/2003 (ANVISA).

Tabela 2: Resultados obtidos para precisão (repetibilidade, reprodutibilidade e precisão intermediária).

	Concentração teórica ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Concentração experimental ($\mu\text{g.mL}^{-1} \pm \text{DP}$)	Recuperação (%)	DPR (%)
Repetibilidade (n=6)	25.0	25.9 $\pm$ 0.75	103.6 $\pm$ 2.99	2.88
Reprodutibilidade				
Manhã 1 (n=6)	25.0	25.61 $\pm$ 0.28	102.45 $\pm$ 1.14	1.09
Manhã 2 (n=6)	25.0	25.1 $\pm$ 0.52	102.09 $\pm$ 4.46	4.37
Tarde 1 (n=6)	25.0	25.23 $\pm$ 0.34	100.93 $\pm$ 1.36	1.35
Precisão Intermediária				
Analista 1 (n=6)	25.0	25.9 $\pm$ 0.75	103.6 $\pm$ 2.99	2.88
Analista 2 (n=6)	25.0	25.72 $\pm$ 0.33	102.9 $\pm$ 1.33	1.29

DP: desvio padrão; DPR: desvio padrão relativo

5.3.1.5 Exatidão

A exatidão foi determinada utilizando concentrações intermediárias e através da recuperação (Tabelas 3 e 4). Os resultados obtidos para os dois métodos utilizados apresentaram DPR menor que 5,0 % e, ainda, o método por recuperação apresentou porcentagem de recuperação próxima a 100 %, de acordo com o estabelecido pela RE 899/2003 (ANVISA).

Tabela 3: Resultados obtidos para exatidão através da variação dos níveis de concentração da amostra.

Níveis de concentração	Concentração teórica ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Concentração experimental ($\mu\text{g.mL}^{-1} \pm \text{DP}$)	Recuperação (%)	DPR (%)
Baixa	17.5	16.68 $\pm$ 0.25	95.31 $\pm$ 1.44	1.51
Média	25.0	24.52 $\pm$ 0.18	98.06 $\pm$ 0.72	0.73
Alta	35.0	34.35 $\pm$ 0.30	98.14 $\pm$ 0.89	0.90

DP: desvio padrão; DPR: desvio padrão relativo

Tabela 4: Resultados obtidos para exatidão através da recuperação.

Concentração teórica ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Concentração experimental ($\mu\text{g.mL}^{-1} \pm \text{DP}$)	Recuperação (%)	DPR (%)
200	198.48 $\pm$ 6.18	99.24 $\pm$ 3.09	3.11
700	704.6 $\pm$ 22.69	100.65 $\pm$ 3.24	3.22

DP: desvio padrão; DPR: desvio padrão relativo

5.3.1.6 Robustez

A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos (BRASIL, 2003). Assim, foram realizadas variações no fluxo e na composição (proporção) da FM. Os resultados, mostrados na Tabela 5 (DPR < 5,0 %), indicam a confiança do método diante de pequenas variações que podem ocorrer durante o processo, demonstrando que o método desenvolvido é robusto.

Tabela 5: Resultados obtidos para robustez.

Condições	Concentração experimental ($\mu\text{g.mL}^{-1} \pm \text{SD}$)	Recuperação (%)	DPR (%)
Fluxo			
0.995 mL.min ⁻¹	25.89 $\pm$ 0.26	103.56 $\pm$ 1.05	1.00
1.005 mL.min ⁻¹	26.00 $\pm$ 0.41	104.03 $\pm$ 1.64	1.54
Fase móvel			
84:16	26.25 $\pm$ 0.24	105.00 $\pm$ 0.95	0.90
86:14	26.48 $\pm$ 0.19	105.93 $\pm$ 0.75	0.70

DP: desvio padrão; DPR: desvio padrão relativo

5.4 Caracterização das NNL e NLS

5.4.1 Avaliação da EE da HAL nas NNL e NLS

Para a determinação do teor de fármaco incorporado utilizou-se o método indireto e as amostras foram analisadas em triplicata (Tabela 6). A EE encontrada foi próxima a 100 %, indicando que o fármaco foi totalmente incorporado às nanopartículas.

Tabela 6: Teor de HAL incorporada e EE.

Amostra	Concentração teórica ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	HAL encapsulada ($\mu\text{g.mL}^{-1} \pm \text{DP}$)	EE (% $\pm$ DP)
NNL	3000	2997,092 $\pm$ 1,14	99,90 $\pm$ 0,04
NLS	3000	2999,01 $\pm$ 0,1	99,96 $\pm$ 0,005

DP: desvio padrão; EE: eficiência de encapsulação. NNL: nanopartícula polimérica de núcleo lipídico; NLS: nanopartícula lipídica sólida; HAL: halcinonida.

Não foram encontrados na literatura estudos sobre a HAL incorporada em sistemas nanoestruturados, assim, também não há relatos sobre a EE deste fármaco. Entretanto, Silva *et al.*(2015) conseguiu EE semelhante ao

encapsular betametasona, um fármaco da mesma classe farmacêutica da HAL, em nanopartículas poliméricas.

5.4.2 Determinação do diâmetro médio, do IPD, do pH e do PZ das NNL e NLS

As análises morfológicas, de superfície e de estabilidade das NNL e NLS carregadas com HAL logo após a preparação e após 60 dias de armazenamento estão demonstrados na Tabela 7. As análises estatísticas entre as nanopartículas carregadas e sem fármaco, realizadas pelo teste *t* de Student, revelaram que não houve diferença significativa em nenhum dos parâmetros estudados (diâmetro médio, IPD, PZ e pH), indicando que a incorporação da HAL não modificou essas características físico-químicas nas nanopartículas.

Tabela 7: Diâmetro médio, PZ, IPD e pH das NNL e NLS carregadas com HAL após a preparação e após 60 dias de armazenamento.

	NNL-HAL	NNL-HAL (após 60 dias)	NLS-HAL	NLS-HAL (após 60 dias)
Diâmetro (nm±DP)	267,30 ± 1,17 ^a	279,66 ± 11,62 ^a	494,90 ± 27,72 ^b	466,76 ± 6,03 ^b
PZ	-32,06 ± 4,79 ^a	-34,21 ± 5,02 ^a	-28,33 ± 3,74 ^b	-32,8 ± 1,80 ^b
IPD	0,21 ± 0,03 ^a	0,26 ± 0,08 ^a	0,37 ± 0,02 ^b	0,30 ± 0,01 ^c
pH	6,53 ± 0,14 ^a	6,12 ± 0,33 ^a	5,36 ± 0,06 ^b	5,69 ± 0,15 ^{a,c}

DP: desvio padrão. PZ: potencial zeta; IPD: índice de polidispersão. NNL: nanopartícula polimérica de núcleo lipídico; NLS: nanopartícula lipídica sólida. Letras iguais indicam que não há diferença estatística significativa entre as amostras para cada análise ($p > 0,05$) pelo teste *t* de Student.

Estudos têm sido desenvolvidos para avaliar os principais fatores que afetam o diâmetro das partículas nos sistemas nanoestruturados. No caso do método de obtenção das NNL por deposição interfacial, a presença do polímero (PCL) pode conduzir a uma maior diminuição do tamanho das partículas em relação ao método de obtenção de NLS por microemulsificação devido, provavelmente, à redução da energia livre interfacial do sistema mediante um efeito estabilizador causado também pelo polímero ao redor das gotículas (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). Esse efeito poderia justificar a diferença encontrada entre os diâmetros médios das nanopartículas obtidas, NNL e NLS ($p = 0,0037$), uma vez que as NLS não contêm polímeros na sua constituição.

NNL e NLS foram caracterizadas em relação ao PZ que é uma medida que indica o potencial elétrico que surge na suspensão coloidal quando

nanopartículas adquirem carga elétrica em sua superfície em contato com um líquido. Este potencial elétrico é influenciado pelas mudanças na interface das partículas com o meio dispersante, em razão da dissociação de grupos funcionais de superfície ou da adsorção de espécies iônicas presentes no meio aquoso da dispersão (SAVIAN *et al.*, 2015; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

Dessa forma a medida do PZ auxilia a avaliação da estabilidade das dispersões coloidais durante armazenamento. De modo geral, a agregação entre nanopartículas é menos provável em partículas carregadas com altos valores de PZ e valores próximos a 30 (em módulo) indicam repulsão elétrica entre elas (ARANA *et al.*, 2015). Os valores de PZ obtidos das amostras analisadas (próximos a -30 mV) indicaram estabilidade elétrica das nanopartículas, sendo que as>NNL apresentaram maior estabilidade do que as NLS ($p = 0,035$). Em relação a análise após armazenamento de 60 dias em cada tipo de nanopartícula (>NNL ou NLS) não houve diferença estatística entre o mesmo grupo.

Os resultados de IPD mostraram diferença estatística entre as>NNL e NLS ($p = 0,0018$), porém ambos indicaram homogeneidade de tamanho de partícula, uma vez que o IPD é um índice que varia de zero, quando todas as nanopartículas da dispersão apresentam relativamente o mesmo tamanho e um (1,0), quando o diâmetro médio das partículas é bastante heterogêneo (DAL PIZOL, 2014) e valores de IPD menores que 0,3 indicam formação de sistemas monodispersos (NEMEN & LEMOS-SENNA, 2011), conforme encontrado nas>NNL. Após o armazenamento por 60 dias, houve redução significativa do IPD das NLS ($p = 0,0028$), indicando que durante o armazenamento a distribuição do tamanho das partículas tornou-se mais homogênea, provavelmente devido à presença do tensoativo (Tween® 80) na superfície das partículas, reduzindo a tensão interfacial e proporcionando impedimento estérico que evita a agregação (DAL PIZOL, 2014).

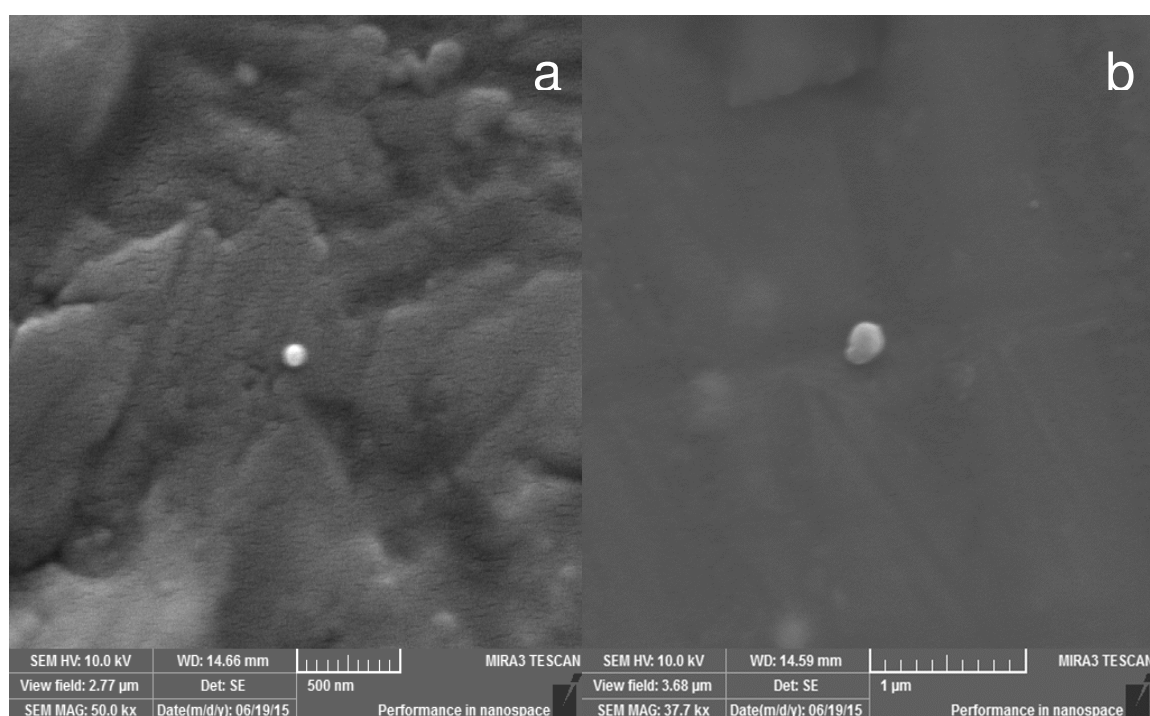
Todas as formulações apresentaram pH levemente ácido (variando de 5,3 a 6,6), devido às características de seus constituintes. A presença da PCL contribui para a obtenção de suspensões de caráter ácido, conforme descrito por outros autores (KULKAMP *et al.*, 2009), assim como o AE que resulta em nanopartículas de caráter ácido.

No estudo de estabilidade, os valores de pH das NNL não apresentaram diferença estatística indicando que não houve degradação da formulação mantendo a estabilidade. Já as NLS apresentaram um pequeno aumento do pH da suspensão ($p = 0,0290$) após os 60 dias de armazenamento, o que pode indicar a formação de nanopartículas de AE durante o armazenamento, tornando a dispersão um pouco menos ácida. O estudo de estabilidade das NLS mostrou redução do IPD e aumento do pH, estatisticamente significativas, resultando em uma dispersão de nanopartículas mais homogênea e menos ácida.

5.4.3 Microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (FEG-SEM)

Através das fotomicrografias apresentadas na Figura 10 (a e b), observou-se que as nanopartículas apresentaram estruturas esféricas e de superfície lisa. Essa característica pode indicar a encapsulação da HAL, que apresenta baixa solubilidade em água e, portanto, maior afinidade ao núcleo lipídico das nanopartículas. Beck *et al.* (2003) identificaram nanopartículas com as mesmas características ao examinar a morfologia de nanopartículas contendo dexametasona.

Figura 10 (a): Fotomicrografia da NNL (50.000 x); (b) Fotomicrografia da NLS (37.700 x).



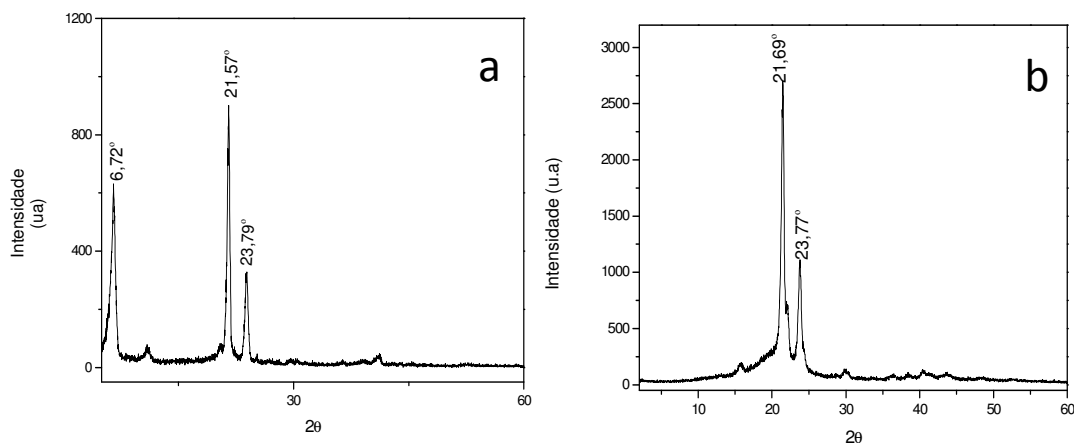
5.4.4 Difração de Raios X

A DRX caracteriza a amostra em termos de cristalinidade e traz informações sobre os tamanhos dos cristais, a orientação da cadeia de polímero ou alterações na morfologia cristalina (KOTZIANOVA *et al.*, 2014).

A Figura 11a apresenta o difratograma do AE. Ele é encontrado em diferentes formas polimórficas e com base na análise do pico em relação às posições do pico e ao espaçamento (d) do difratograma, AE corresponde à forma-C ou forma monocíclica, assim como descrito por SAGIRI *et al.* (2015). As análises de DRX para o AE revelaram picos característicos em 2θ iguais a $21,57^\circ$ e $23,79^\circ$, condizente com o encontrado por Latibari *et al.* (2015) de $21,6^\circ$ e $23,8^\circ$ e também por Severino *et al.* (2011) de $21,5^\circ$ e $24,1^\circ$.

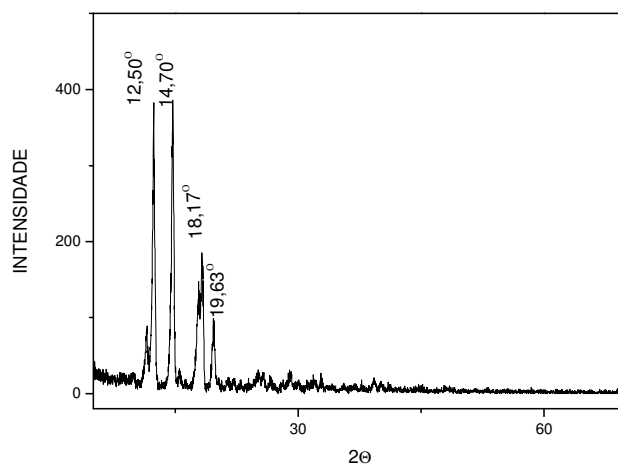
A PCL (Fig. 11b) apresentou dois picos distintos de difração em 2θ iguais em $21,69^\circ$ e $23,77^\circ$, sendo esses valores adequados e muito próximos aos já descritos por Azous *et al.* (2016) que obteve picos de $21,3^\circ$ e $23,6^\circ$ e também por Abdelrazek *et al.* (2015) com os picos de $21,4^\circ$ e $23,8^\circ$.

Figura 11 (a) DRX do AE; (b) DRX da PCL.



A Figura 12 apresenta o difratograma da HAL, revelando quatro picos característicos do fármaco em 2θ iguais a $12,50^\circ$, $14,70^\circ$, $18,17^\circ$ e $19,63^\circ$. Não consta na literatura nenhuma informação sobre a DRX de HAL.

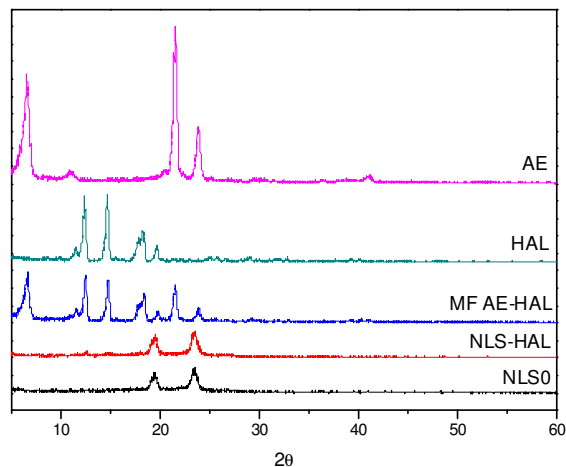
Figura 12: DRX da HAL.



A DRX das NLS (Figura 13) mostrou desaparecimento dos picos da HAL, indicando a amorfização do fármaco nas nanopartículas e redução significativa na intensidade do pico em 23,79° referentes ao AE. Nas NLS a manutenção dos picos da AE em menor intensidade pode representar a presença de cristais muito finos na superfície da nanopartícula, fato este que foi relatado por Kelidari *et al.* (2015) ao desenvolver NLS carregadas com espironolactona.

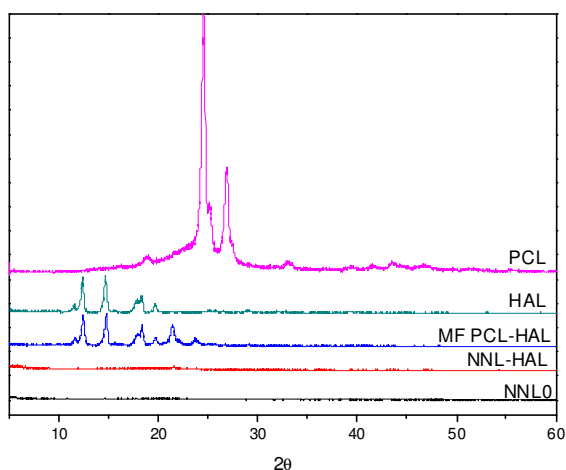
Além disso, foi observado um deslocamento do pico em 21,57° do AE nas NLS carregadas e inertes para 19,49° indicando modificação da estrutura cristalina do AE e também uma possível amorfização do lipídio durante o processamento para obtenção das NLS, já que houve o desaparecimento do pico em 6,72°.

Figura 13: DRX das NLS. AE: ácido esteárico; HAL: halcinonida; MF AE-HAL: mistura física; NLS-HAL: NLS carregada; NLS0 – NLS inerte.



Já nas>NNL houve total amorfização da HAL e da PCL, indicando que o método utilizado para obtenção das nanopartículas foi ideal para a incorporação da HAL (Figura 14).

Figura 14: DRX das>NNL. PCL: poli(ε-caprolactona); HAL: halcinonida; MF PCL-HAL: mistura física;>NNL-HAL:>NNL carregada;>NNL0 –>NNL inerte.



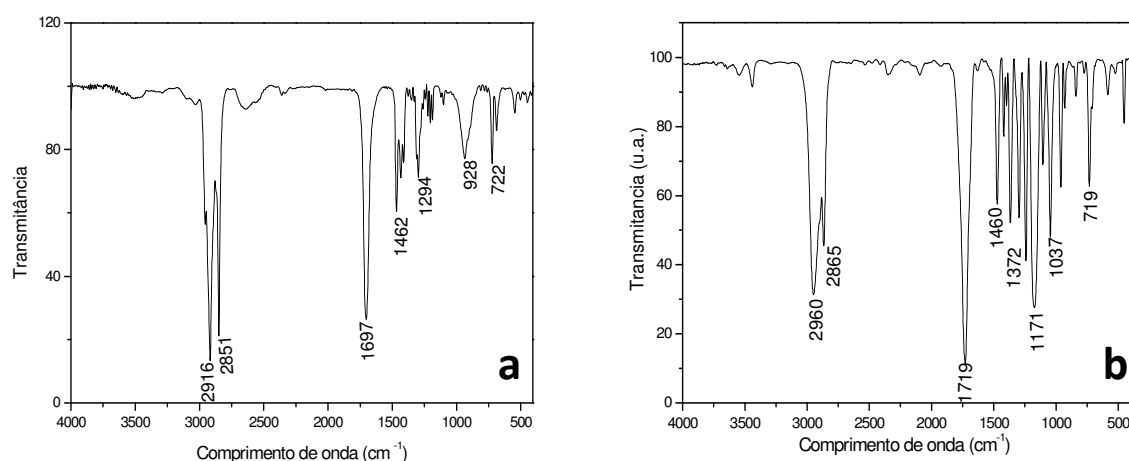
5.4.5 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

FTIR é uma técnica para a identificação, elucidação estrutural, determinação da pureza e quantificação de substâncias orgânicas, bem como no controle e acompanhamento de reações (LOPES & FASCIO, 2004).

O espectro do AE obtido por FTIR (Figura 15a) mostra o estiramento dos grupamentos simétricos C–H₃ e C–H₂, representado pelas bandas 2916 e 2851 cm⁻¹ respectivamente. A banda 1697 cm⁻¹ representa o estiramento do grupo C=O. A alocação para vibração no plano de curvatura do grupo funcional O–H está representada pelas bandas 1462 e 1294 cm⁻¹. A banda 928 cm⁻¹ mostra a vibração fora do plano de curvatura do grupamento O–H e a banda 722 cm⁻¹ é referente à vibração oscilante do grupo O–H. O espectro do AE obtido está de acordo com outros relatados por Latibari *et al.* (2015) e Chen *et al.* (2013).

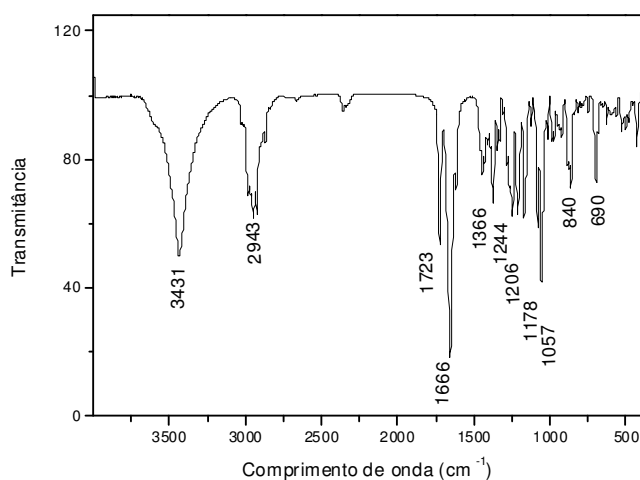
No espectro da PCL (Figura 15b) foram identificadas as bandas 2960 e 2865 cm⁻¹ referentes ao grupamento C–H₂ assimétrico e simétrico respectivamente. A banda 1719 cm⁻¹ representa a vibração de estiramento do grupo C=O, as ligações C–H₂ são representadas pelas bandas 1460, 1372 e 719 cm⁻¹ e as bandas 1171 e 1037 cm⁻¹ se referem ao estiramento da fase amorfa C–O e à vibração de estiramento do grupamento C–O–C, respectivamente. As bandas da PCL encontradas estão de acordo com as relatadas por Catauro *et al.* (2016) e Abdelrazek *et al.* (2015).

Figura 15: Espectro FTIR de: (a) AE; (b) PCL.



Em relação à caracterização da HAL por FTIR a literatura não traz informações. Sendo assim, as principais bandas características deste fármaco foram identificadas e descritas (Fig. 16): a banda 3431 cm^{-1} refere-se ao estiramento da ligação O–H e a banda 2943 cm^{-1} à ligação C–H₂. A ligação C=O é representada pela banda 1723 cm^{-1} , enquanto a banda 1666 cm^{-1} refere-se à ligação C=C. O grupamento C–H₃ é representado pela banda 1366 cm^{-1} , a banda em 1057 cm^{-1} é referente à ligação C–F e a ligação C–Cl é representada pela banda 690 cm^{-1} .

Figura 16: Espectro FTIR da HAL.

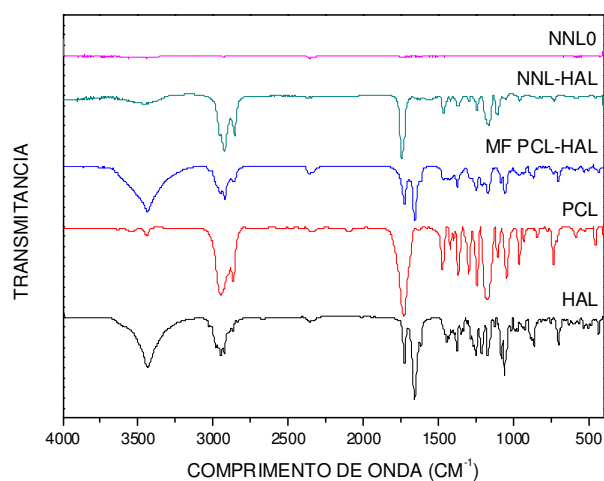


A HAL é um derivado da hidrocortisona, que apresenta apenas dois átomos de F e um de Cl a mais, e comparando os espectros da HAL e da hidrocortisona as mesmas bandas relativas aos grupamentos comuns da estrutura dos dois fármacos, com exceção das ligações C–F e C–Cl, foram encontrados. Essas bandas relativas aos grupamentos encontram-se citadas na literatura por Lam *et al.* (2012) e Hussain *et al.* (2013).

Nos espectros de NNL carregada e inerte (Figura 17) foi possível observar as bandas referentes ao triglicerídeo do ácido cáprico/caprílico utilizado em aproximadamente 70% composição das nanopartículas. As bandas identificadas para o triglicerídeo por Silverstein, Bassler & Morrill (1991) e que também estão presentes nas nanopartículas foram: 2921 e 2851 cm^{-1} referentes à deformação axial de CH₂, 1739 cm^{-1} relacionada à deformação

axial de ligação C=O, 1458 cm^{-1} referente à deformação angular de CH_3 e as bandas 1153 e 1107 cm^{-1} que dizem respeito à deformação axial da ligação C-O-C.

Figura 17: Espectros de FTIR de NNL. PCL: poli(ϵ -caprolactona); HAL: halcinonida; MF PCL-HAL: mistura física; NNL-HAL: NNL carregada; NNLO – NNL inerte.



As Figuras 18 e 19 são referentes à ampliação dos espectros das NNL de 4000 a 2000 cm^{-1} e 2000 a 400 cm^{-1} , respectivamente. Podem-se observar as bandas referentes ao triglicerídeo do ácido cáprico/caprílico, marcadas com as setas tanto nas NNL carregadas com HAL quanto nas inertes.

Figura 18: Espectro FTIR de NNL de 4000 a 2000 cm^{-1} . HAL: halcinonida; PCL: poli(ϵ -caprolactona); MF PCL-HAL: mistura física; NNL-HAL: NNL carregada; NNLO: NNL inerte.

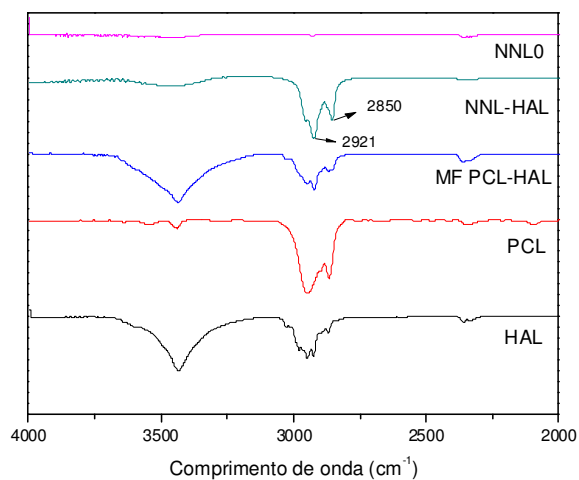
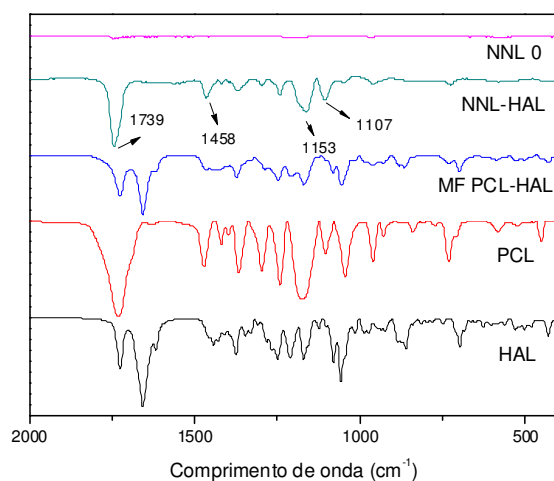
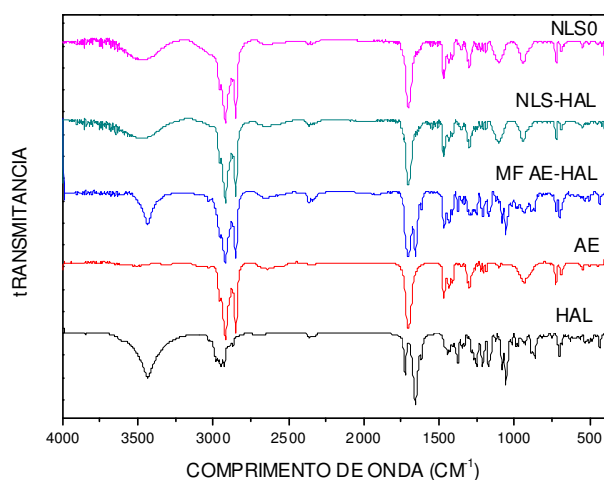


Figura 19: Espectro FTIR de NNL de 20000 a 400 cm^{-1} . HAL: halcinonida; PCL: poli(ϵ -caprolactona); MF PCL-HAL: mistura física; NNL-HAL: NNL carregada; NNLO: NNL inerte.



As NLS carregadas com HAL e inertes apresentaram espectros semelhantes com as bandas referentes ao AE devido ao fato de este compor aproximadamente 80 % da formulação das NLS (Figura 20). As bandas das misturas físicas correspondem às bandas do AE e da HAL (LOPES; FASCIO, 2004).

Figura 20. Espectro FTIR de NLS. AE: ácido esteárico; HAL: halcinonida; MF AE-HAL: mistura física; NLS-HAL: NLS carregada; NLS0 – NLS inerte.



As Figuras 21 e 22 são referentes à ampliação dos espectros das NLS de 4000 a 2000 cm⁻¹ e 2000 a 400 cm⁻¹, respectivamente. Podem-se observar as bandas referentes ao AE evidenciadas, marcadas com as setas tanto nas NLS carregadas com HAL quanto nas inertes.

Figura 21: Espectro FTIR de NLS em 4000 e 2000 cm⁻¹. AE: ácido esteárico; HAL: halcinonida; MF AE-HAL: mistura física; NLS-HAL: NLS carregada; NLS0 – NLS inerte.

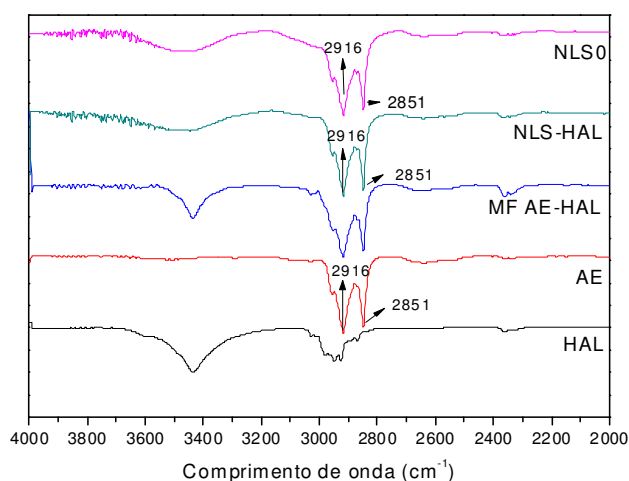
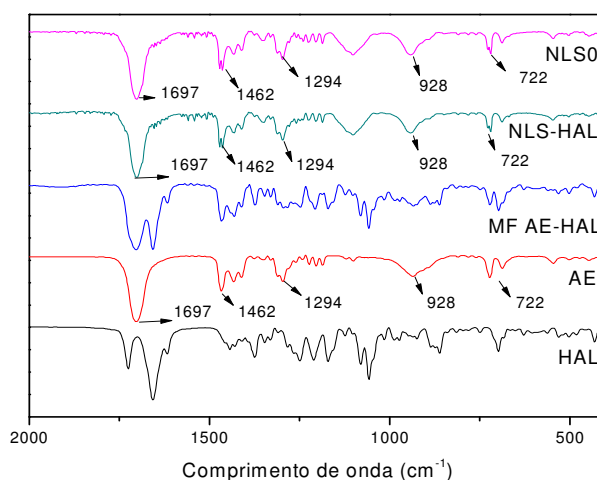


Figura 22: Espectro FTIR de NLS em 2000 e 400 cm^{-1} . AE: ácido esteárico; HAL: halcinonida; MF AE-HAL: mistura física; NLS-HAL: NLS carregada; NLS0 – NLS inerte.



5.4.6 Espectroscopia de Raman com Transformada de Fourier (FT-RAMAN)

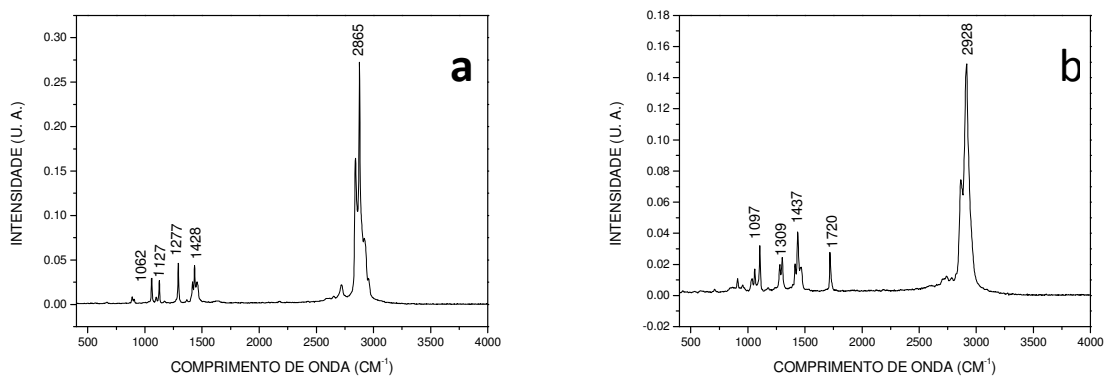
FT-Raman é uma técnica na qual a luz dispersa é utilizada para definir a natureza das moléculas dentro de um volume irradiado; é o espalhamento inelástico da luz de uma amostra (SMITH *et al.*, 2015). O comportamento das bandas Raman pode dar informações importantes relacionadas com a estrutural e/ou alterações de simetria na célula unitária. A análise das modificações pode determinar mudanças que ocorrem no cristal. Tais alterações moleculares podem ser compreendidas de duas formas diferentes: (i) a fase de transição sofrida pelo cristal e (ii) rotação ou torção da molécula na célula unitária (fase de transição conformacional originado pelo rearranjo das ligações de hidrogênio entre os grupos COOH dos dímeros) (SOUZA *et al.*, 2015).

Na análise do espectro do AE (Figura 23a) foram identificadas as bandas já relatadas por Souza *et al.* (2015): 1062 e 1127 cm^{-1} referente ao alongamento da ligação C–C, 1277 cm^{-1} indicando vibração de torção do CH_2 , 1428 cm^{-1} representando deformações das ligações CH_2 e CH_3 , e a banda 2865 cm^{-1} que é referente às vibrações de alongamento de grupos metil.

No FT-Raman do polímero PCL (Figura 23b) foram identificadas bandas em 1097 cm^{-1} referente ao alongamento da cadeia, 1309 e 1437 cm^{-1} correspondentes as vibrações de deformação do grupo CH_2 , 1720 cm^{-1} que se refere ao componente cristalino da vibração C=O e a banda mais proeminente

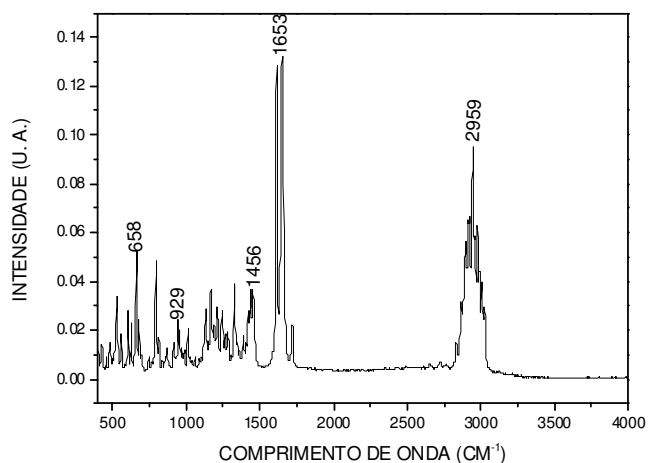
da PCL em 2928 cm^{-1} que se refere ao grupamento CH_2 . Essas bandas estão de acordo com as encontradas por Kotzianova *et al.* (2014) e por Carbone *et al.* (2015).

Figura 23: Espectro FT-Raman de: (a) AE, (b) PCL.



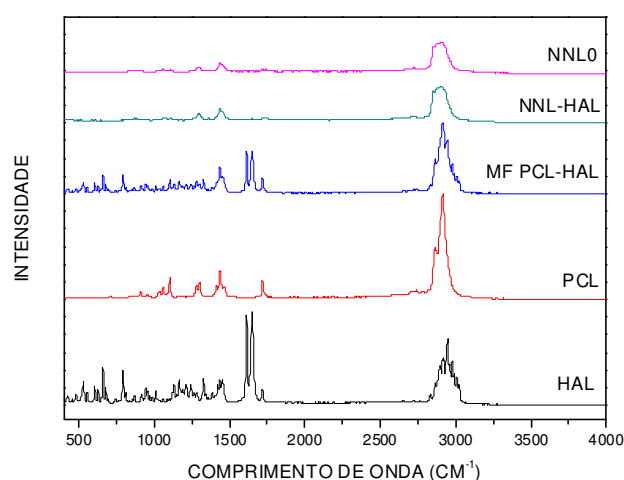
O espectro de HAL (Figura 24) revelou como principais bandas os comprimentos de onda de 658 cm^{-1} que indica a ligação C-Cl, 929 cm^{-1} referente ao grupamento C—C, 1456 cm^{-1} referente à vibração da ligação C=C da cadeia aromática, 1653 cm^{-1} que indica o estiramento da ligação C=C e 2959 cm^{-1} que representa o estiramento do grupo C - H. Não existem relatos na literatura sobre FT-Raman de HAL.

Figura 24: Espectro FT- Raman da HAL.



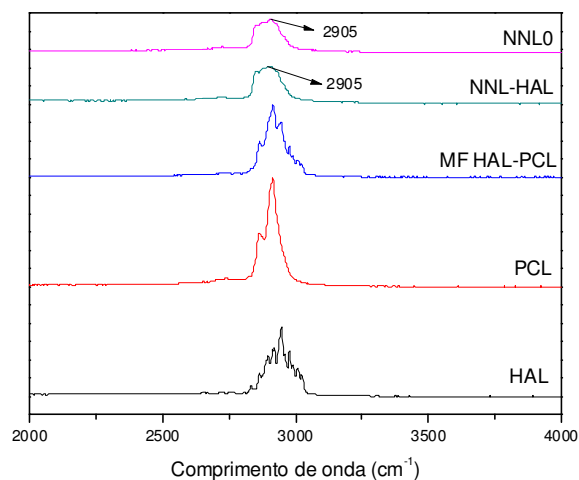
O espectro das NNL (Figura 25) apresenta as bandas referentes ao triglicerídeo do ácido cáprico/caprílico, condizente com o espectro observado por Anantachaisilp *et al.* (2010), com bandas em 2905 e 2777 cm^{-1} . Devido à grande proporção dessa matéria-prima utilizada na formulação os picos do fármaco não foram evidenciados.

Figura 25: Espectro FT- Raman de NNL. PCL: poli(ϵ -caprolactona); HAL: halcinonida; MF PCL-HAL: mistura física; NNL-HAL: NNL carregada; NNL0 – NNL inerte.



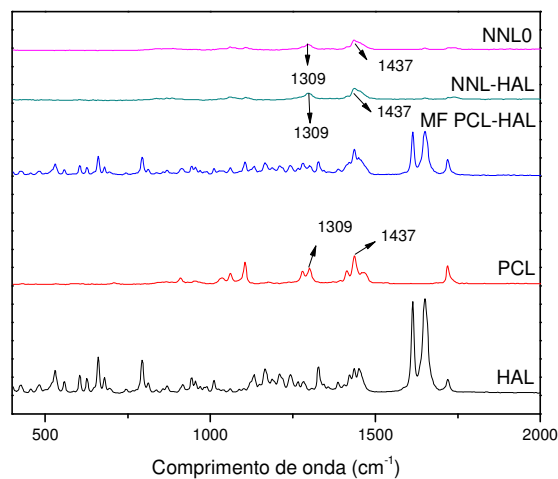
As Figuras 26 e 27 são referentes à ampliação dos espectros das NNL de 4000 a 2000 cm^{-1} e 2000 a 400 cm^{-1} , respectivamente. Na Figura 26 pode-se observar a banda referente ao triglicerídeo do ácido cáprico/caprílico evidenciada, marcadas pelas setas tanto nas NNL carregadas com HAL quanto nas inertes.

Figura 26: Espectro FT- Raman de NNL em 4000 e 2000 cm^{-1} . PCL: poli(ϵ -caprolactona); HAL: halcinonida; MF PCL-HAL: mistura física; NNL-HAL: NNL carregada; NNL0 – NNL inerte.



Na Figura 27 pode-se observar as bandas referentes a PCL nas NNL carregadas e inertes, marcadas pelas setas.

Figura 27: Espectro FT- Raman de NNL em 2000 e 400 cm^{-1} . PCL: poli(ϵ -caprolactona); HAL: halcinonida; MF PCL-HAL: mistura física; NNL-HAL: NNL carregada; NNL0 – NNL inerte.



Nas NLS (Fig. 28) verifica-se a presença de picos bem definidos referentes ao AE, componente de maior proporção na formulação, omitindo os picos referentes ao fármaco, como pode ser comprovado ao analisar separadamente os espectros entre 4000 e 2000 cm^{-1} e 2000 e 400 cm^{-1} pelas Figuras 29 e 30, respectivamente, tanto das NLS carregadas com HAL quanto nas inertes, conforme marcado pelas setas.

Figura 28: Espectro FT-Raman de NLS. AE: ácido esteárico; HAL: halcinonida; MF AE-HAL: mistura física; NLS-HAL: NLS carregada; NLS0 – NLS inerte.

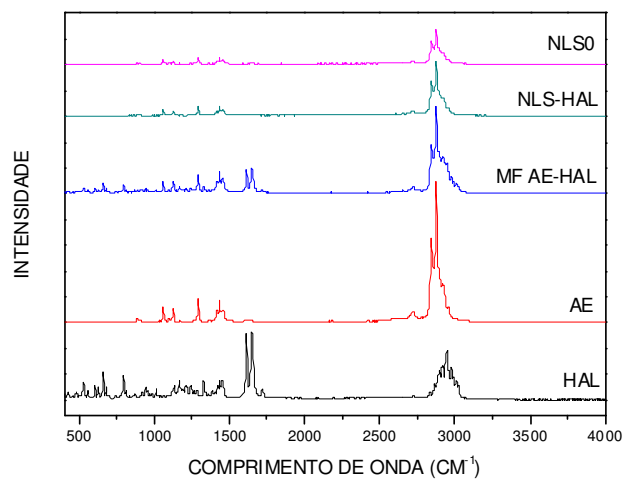


Figura 29: Espectro FT-Raman de NLS em 4000 e 2000 cm⁻¹. AE: ácido esteárico; HAL: halcinonida; MF AE-HAL: mistura física; NLS-HAL: NLS carregada; NLS0 – NLS inerte.

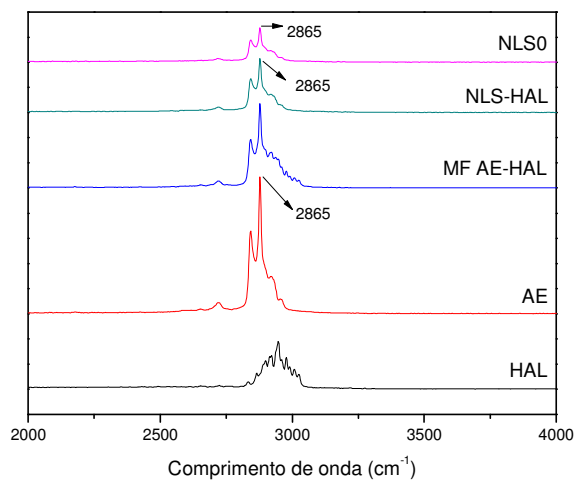
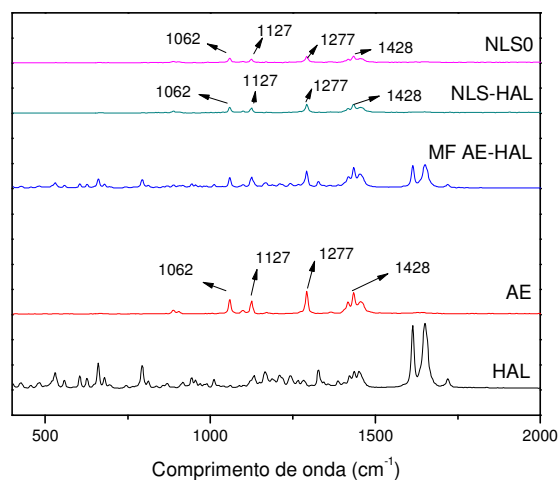


Figura 30: Espectro FT-Raman de NLS em 2000 e 400 cm^{-1} . AE: ácido esteárico; HAL: halcinonida; MF AE-HAL: mistura física; NLS-HAL: NLS carregada; NLS0 – NLS inerte.



5.4.7 Análise térmica

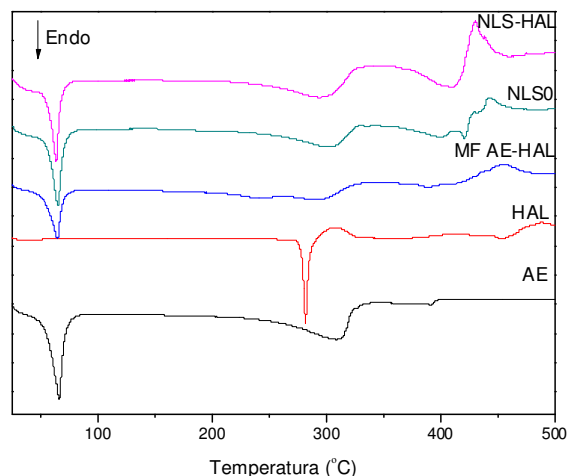
DSC é um dos métodos mais comuns utilizados para estudar as interações físico-químicas entre fármaco e polímero em nanopartículas (RESCIGNANO *et al.*, 2015; BERNABEU *et al.*, 2014). Esta técnica nos permite elucidar se o fármaco está em estado amorfo ou cristalino e se o procedimento de nanoencapsulação modifica ligeiramente a temperatura de fusão do polímero (BERNABEU *et al.*, 2014).

A TGA é uma técnica útil para a definição de estabilidade térmica e de ativação de energia relacionados com a cinética de decomposição do estado sólido das nanopartículas (DOGAN, TEMIZKAN & KAYA, 2015). Na análise de TGA a variação de massa de uma determinada amostra em uma atmosfera controlada é registrada continuamente como uma função da temperatura ou do tempo. As curvas TGA permitem conhecer as alterações que o aquecimento pode provocar nos materiais e determinam também a que temperatura os materiais começam a se decompor, ou seja, a estabilidade térmica do material e por fim ainda permite acompanhar o andamento das reações de desidratação, oxidação, combustão, decomposição entre outras (DIAS, 2013).

A Figura 31 mostra a curva DSC das NLS. HAL apresentou temperatura de fusão de 277,14 °C. AE fundiu a 56,5 °C, conforme descrito na literatura por Djefel *et al.* (2015), Wang *et al.* (2015) e Chen *et al.* (2013). O pico

de fusão da HAL desapareceu nas NLS carregadas, indicando que o fármaco está no estado amorfo ou dissolvido no núcleo lipídico.

Figura 31: Curva de DSC das NLS. AE: ácido esteárico; HAL: halcinonida; MF AE-HAL: mistura física; NLS-HAL: NLS carregada; NLS0 – NLS inerte.

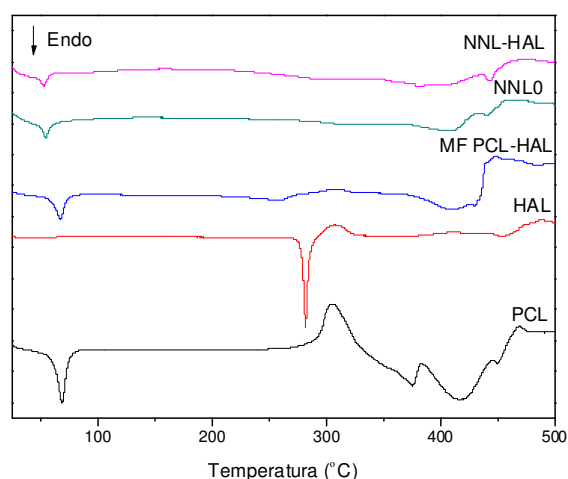


A DSC é frequentemente aplicada no estudo das NLS a fim de investigar o estado físico do lipídeo, devido às variações das propriedades da matriz lipídica durante a formação da dispersão coloidal. Mesmo quando lipídeos cristalinos são utilizados no preparo das dispersões, as partículas do lipídeo não necessariamente se apresentam com as mesmas propriedades após a formação da dispersão, especialmente quando o método utilizado exige aquecimento (LASSERA *et al.*, 2015).

Tanto as NLS inertes quanto as carregadas com o fármaco, apresentaram pico bem definido para o lipídeo, mas foi levemente deslocado a temperaturas mais baixas. O pico de fusão reduzido do lipídeo nas NLS sugere que a matriz de AE foi solidificada com êxito durante a preparação das nanopartículas, confirmando assim que foram obtidas adequadamente. O desvio do sinal endotérmico para temperaturas mais baixas pode estar relacionado com o tamanho de partícula, de acordo com a equação de Gibbs-Thomson, em que para um determinado tamanho de partícula, é possível observar uma diminuição da temperatura de fusão em comparação com o material puro (LASSERA *et al.*, 2015).

A curva de DSC das>NNL está apresentada na Figura 32. PCL é um polímero termoplástico com uma temperatura relativamente baixa de fusão (60 °C) e baixo índice de fluxo de fusão, que depende do peso molecular. É biocompatível e totalmente biodegradável com taxa mais lenta de degradação. Segundo Venkatraman *et al.* (2015) na análise de DSC, 40 °C pode ser considerada a temperatura imediatamente antes de começar a fusão da PCL, enquanto 50 °C e 55 °C são os pontos de início e pico de fusão, respectivamente. A fusão da PCL encontrada foi em 59 °C.

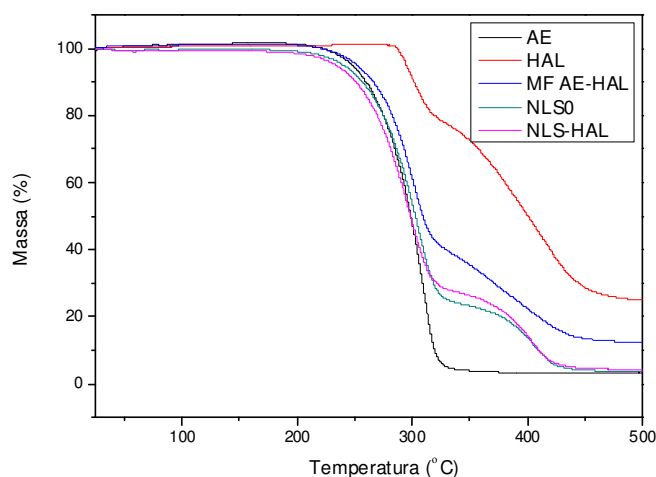
Figura 32: Curvas de DSC das>NNL. PCL: poli(ε-caprolactona); HAL: halcinonida; MF PCL-HAL: mistura física;>NNL-HAL:>NNL carregada;>NNL0 –>NNL inerte.



A curva DSC das>NNL mostrou a ausência de picos exotérmicos, indicando pouca ou nenhuma interação entre o fármaco e os outros excipientes, assim como descrito por Kumar, Verma & Singh (2015). As>NNL carregada com HAL e inertes apresentaram pico de fusão em 53 °C, correspondente à fusão do triglicerídeo do ácido cáprico/caprílico (ANANTACHAISILP *et al.* 2010).

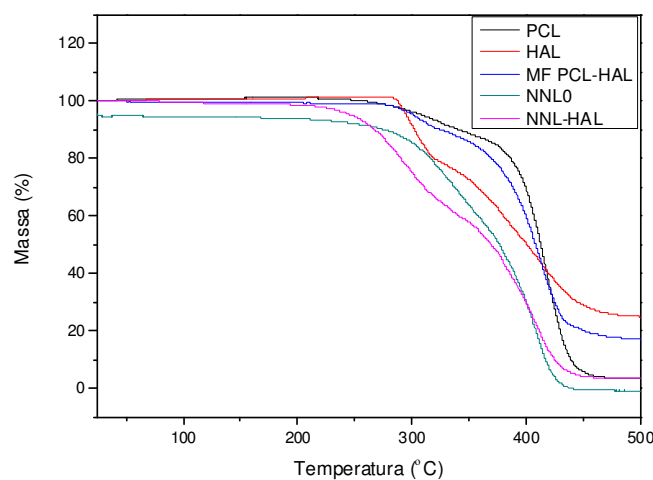
A Figura 33 representa as curvas de decomposição (TGA) das>NLS. A decomposição da HAL pura ocorreu em dois momentos distintos, iniciando em 283,4 °C e concluindo a decomposição com temperatura de 485,3 °C. A curva de TGA ilustra que o AE se degradou em um único passo iniciando na temperatura de 223 °C, de acordo com o relatado por Wang *et al.* (2015) e Latibari *et al.*(2015). A decomposição das>NLS seguiu a degradação do AE.

Figura 33: Curva de TGA das NLS. AE: ácido esteárico; HAL: halcinonida; MF AE-HAL: mistura física; NLS-HAL: NLS carregada; NLS0 – NLS inerte.



As curvas de TGA que representam as NNL e seus componentes estão descritas na Figura 34. A análise de TGA mostrou que o início da decomposição da PCL se deu em 274 °C, passando por 373,8 °C e completando a decomposição em 456,8 °C, demonstrando concordância com o descrito por Hoque *et al.* (2014), Kim *et al.* (2015) e Venkatraman *et al.* (2015). A curva da NNL carregada com HAL mostrou três fases de decomposição, iniciando em 185 °C, a segunda fase em 260 °C e última fase em 370 °C até 440 °C, restando menos de 10 % de massa. O perfil de decomposição das NNL foi semelhante ao da curva da PCL, contudo a decomposição das nanopartículas se iniciou em temperaturas mais baixas.

Figura 34: Curvas de TGA das NNL. PCL: poli(ϵ -caprolactona); HAL: halcinonida; MF PCL-HAL: mistura física; NNL-HAL: NNL carregada; NNLO – NNL inerte.

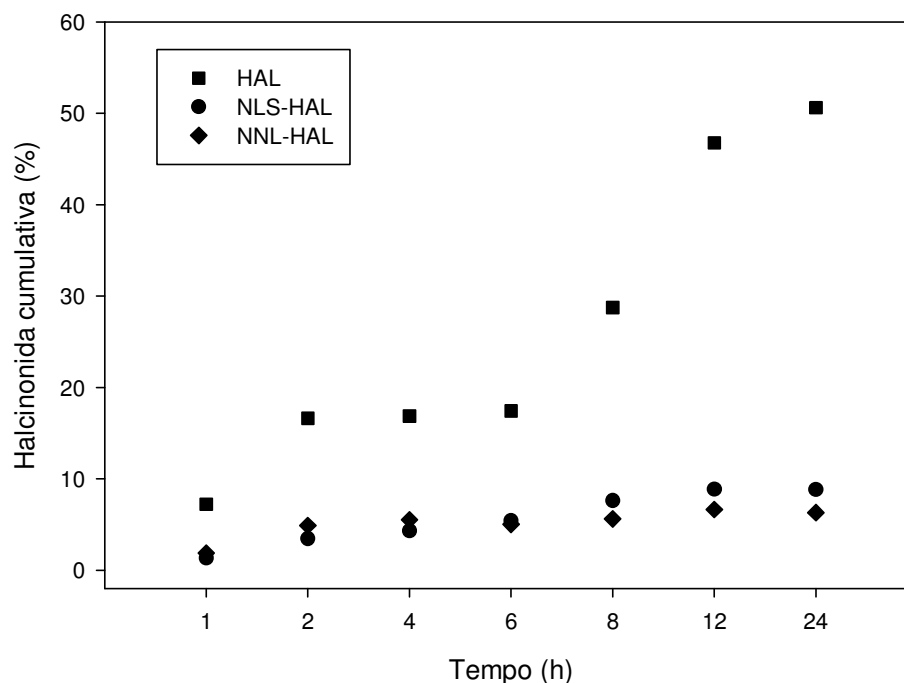


5.5 Estudos de permeação cutânea *in vitro* da HAL a partir das NNL e NLS

Os estudos de permeação cutânea *in vitro* foram realizados em células verticais de difusão com membranas sintéticas que apresentam alta similaridade com a pele humana. O fármaco livre e as NLS e NNL carregadas com HAL foram analisadas e o perfil de permeação da HAL está demonstrado na Figura 35.

Pode-se observar que em relação ao fármaco livre, em até 6 horas de análise cerca de 18 % da HAL permeou para o compartimento receptor, enquanto que ao final de 24 horas 50 % da HAL permeou pela membrana. Uma vez que a membrana utilizada apresenta similaridade à pele humana, este resultado mostra indícios de que a HAL seria capaz de permear através do estrato córneo devido ao seu caráter lipofílico.

Figura 35: Perfil da permeação cutânea *in vitro* da HAL livre e a partir das NNL e NLS.



Em relação às nanopartículas, não houve diferença entre a permeação cutânea de NLS e NNL e em 24 h não mais que 9 % da HAL foram permeados para o meio receptor. Esse resultado indica que, apesar da natureza lipídica das nanopartículas que poderia promover a permeação cutânea do fármaco, o efeito reservatório promovido pelas NLS e NNL foi fundamental para o controle da liberação da HAL, uma vez que o perfil de permeação se mostrou constante a partir das nanopartículas, e o fármaco permaneceu na região cutânea.

5.6 Avaliação *in vivo* da resposta inflamatória e da toxicidade da HAL a partir das NNL e NLS

A resposta inflamatória e a toxicidade da HAL durante os processos de cicatrização das lesões na pele foram analisadas em animais após sofrerem lesão e retirada de parte da epiderme. As avaliações realizadas foram: análise macroscópica e da medida da área da lesão durante 18 dias.

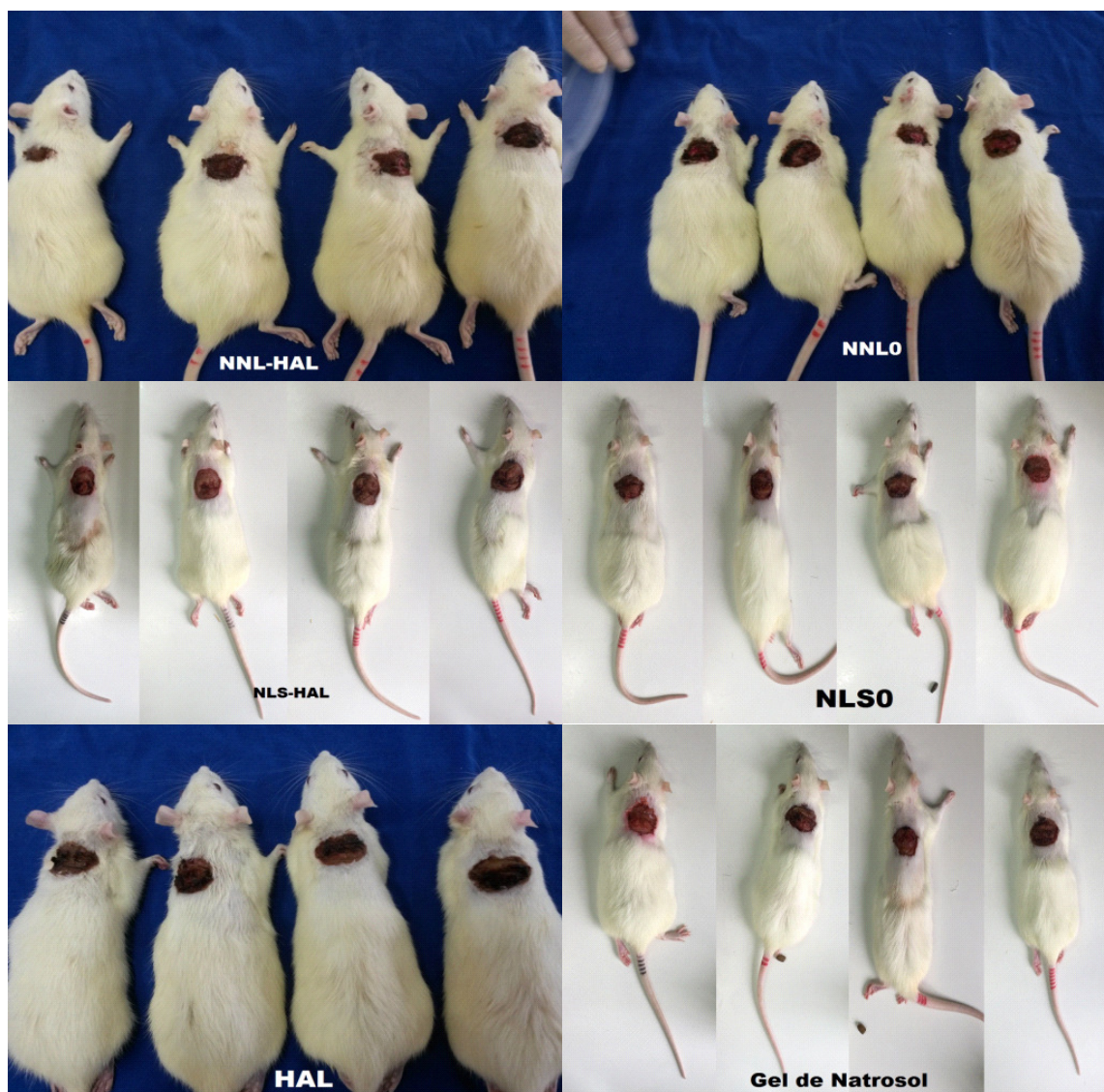
Na avaliação macroscópica descritiva da fase inflamatória da cicatrização, os grupos NNL e NLS carregadas com HAL apresentaram lesões mais lisas com bordos delgados, sem rubor na região periférica da lesão e ainda apresentavam-se não exsudativas até o 6º dia de avaliação. Essa observação demonstra o efeito anti-inflamatório da HAL. Os grupos NNL e NLS inertes (sem HAL) e o grupo controle de gel sem nanopartículas apresentaram visualmente lesões exsudativas, avermelhadas e com bordos edemaciados até o 6º dia de avaliação, resposta essa já esperada, pois durante a fase inflamatória do processo de cicatrização ocorre a liberação local de histamina, serotonina e bradicinina que causam vasodilatação e aumento de fluxo sanguíneo no local e, conseqüentemente, sinais inflamatórios como calor e rubor e também a permeabilidade capilar aumenta causando extravasamento de líquidos para o espaço extracelular, e conseqüente edema (TAZIMA, VICENTE & MORIYA, 2008).

O grupo da HAL livre incorporado no gel, apresentou lesões exsudativas e até o terceiro dia se mantiveram com o aspecto de feridas vivas. Após o quarto dia as lesões começaram a apresentar-se excessivamente crostosas e ampliaram a área da lesão inicial. Nessa fase inicial de avaliação pode-se observar que a HAL incorporada no gel acarretou em efeitos deletérios a cicatrização. Wang et al. (2013) em sua revisão compila trabalhos que demonstram o efeito negativo dos corticoides na cicatrização de pele; esse efeito pode ser explicado pela inibição na atuação das células inflamatórias que são necessárias para o progresso do processo cicatricial, conforme demonstrado por Guichard et al. (2015).

Até o 6º dia da avaliação os tratamentos com NNL e NLS carregadas com HAL apresentaram efeitos benéficos, como ausência de exsudato e de vermelhidão, além de uma melhor aparência das lesões. Esses resultados indicam que a HAL presente nas nanopartículas foi capaz de modular a inflamação da fase inflamatória da cicatrização. Já quando a HAL livre foi incorporada no gel essa modulação da inflamação não foi observada, fato este que pode ser resultado da alta dose do fármaco disponível para absorção nos animais do grupo da HAL livre, diferente dos grupos que receberam as nanopartículas, que são sistemas reservatórios, onde a HAL está encapsulada e é liberada de forma controlada.

A Figura 36 mostra as imagens dos animais de todos os grupos que receberam tratamento com as respectivas legendas. As fotos foram registradas no 3º dia após a realização da lesão, quando a fase inflamatória da cicatrização está completando e se tem o início da fase de proliferação.

Figura 36: Imagens dos animais tratados no 3º dia após sofrer a lesão. NNL-HAL e NLS-HAL: nanopartículas carregadas com HAL; NNLO e NLSO: nanopartículas inertes; HAL: fármaco livre.

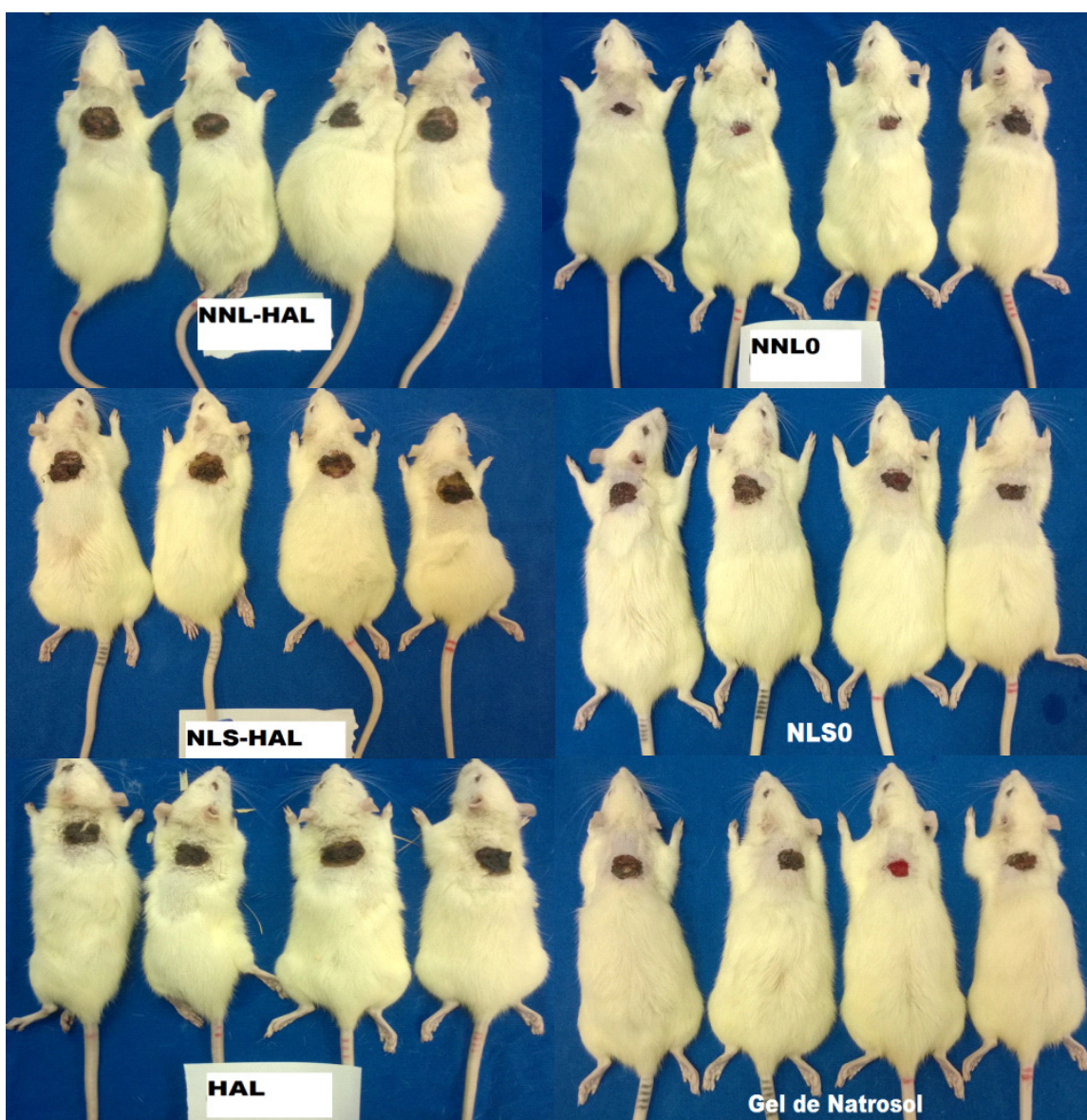


Entre o 6º e o 9º dias de avaliação as lesões dos grupos das NNL e NLS carregadas e inertes e o grupo controle (gel) não apresentaram macroscopicamente diferença, contudo nos animais do grupo HAL livre era possível observar os efeitos deletérios da HAL na cicatrização. Nesse momento

do experimento os animais estavam saindo da fase inflamatória da cicatrização e iniciando a fase fibroblástica e de deposição da matriz extracelular, conforme descrevem Balbino, Pereira e Curi (2005), fase em que os efeitos deletérios dos corticoides podem ser mais bem evidenciados.

A Figura 37 mostra as imagens dos animais de todos os grupos que receberam tratamento com as respectivas legendas. As fotos foram registradas no 9º dia após a realização da lesão, quando a fase de proliferação está finalizando, iniciando a maturação dos tecidos.

Figura 37: Imagens dos animais tratados no 9º dia após sofrer a lesão.>NNL-HAL e NLS-HAL: nanopartículas carregadas com HAL;>NNL0 e NLS0: nanopartículas inertes; HAL: fármaco livre.



Após o 9º dia de avaliação foi visível a melhora da cicatrização nos grupos controles (NNL e NLS inertes e gel) e até o final do experimento as lesões destes animais sempre tiveram avaliação macroscópica melhor que os animais que receberam formulações contendo as nanopartículas carregadas com HAL, indicando que a presença do fármaco após a fase inflamatória causou retardo na cicatrização.

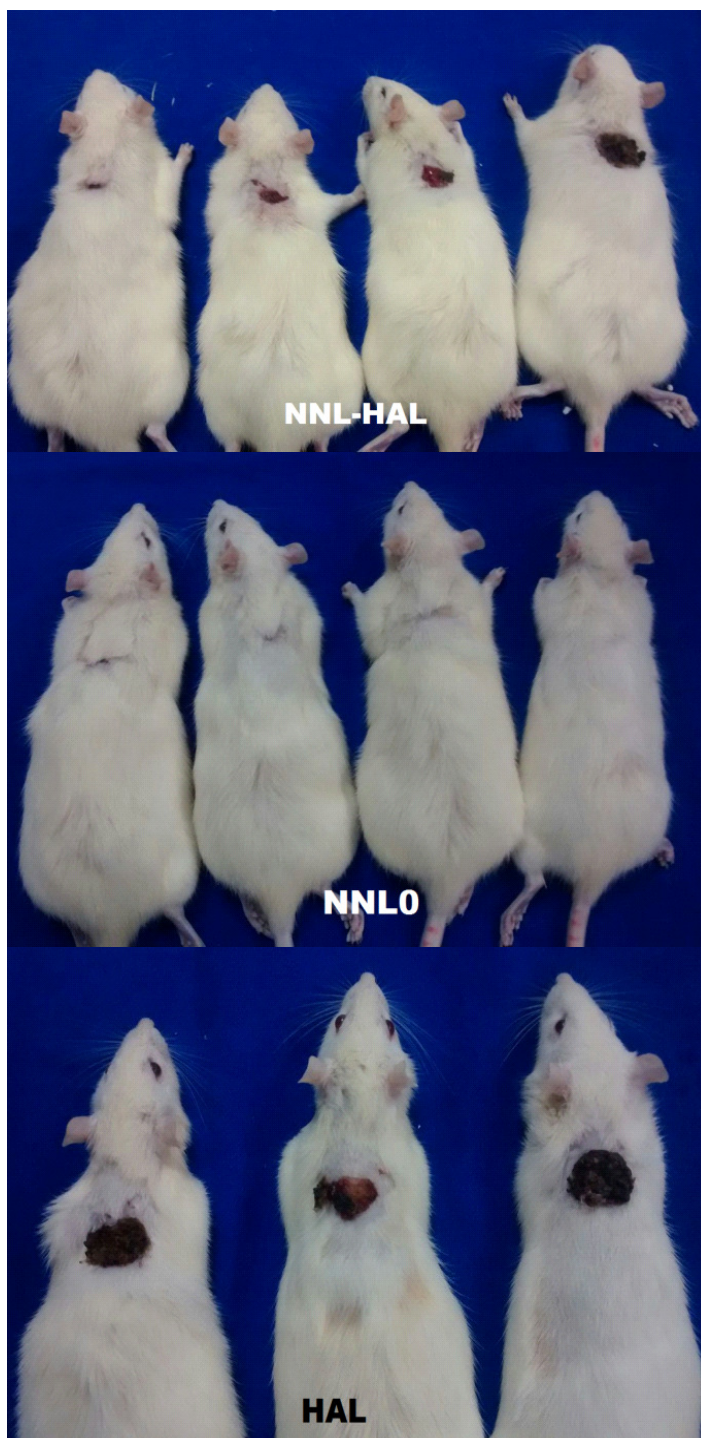
Entre os animais que receberam HAL, as lesões nos grupos NNL e NLS mostraram-se melhores do que as do grupo HAL livre. Entre os grupos NNL e NLS evidenciou-se diferença macroscópica e qualitativa entre eles a partir do 9º dia, sendo observado que o grupo NNL com HAL apresentou melhor retração e aspecto macroscópico das lesões na pele dos animais. Esse efeito pode ser resultado da natureza polimérica das NNL que auxilia na retenção do fármaco dentro das nanopartículas nas regiões inflamadas da pele controlando a liberação do fármaco nestes locais, o que modula o efeito terapêutico e reduz os efeitos secundários sistêmicos. Já as NLS poderia interagir com os componentes lipídicos da pele aumentando a probabilidade de absorção sistêmica da HAL (ABDEL-MOTTALEB *et al.*, 2012).

O processo de cicatrização se mostrou pior nos grupos tratados com as nanopartículas carregadas com HAL, comparado com as inertes, devido ao fato do anti-inflamatório inibir a inflamação, interferindo no processo de cicatrização da pele, como relatado por Hussni *et al.* (2004). De acordo com os resultados até o 6º dia de avaliação, a continuidade do tratamento atrapalhou o processo da cicatrização, indicando que a HAL poderia ser utilizada apenas como moduladora da inflamação na fase inicial da cicatrização, melhorando os aspectos iniciais da lesão cutânea e, possivelmente, reduzindo a dor local.

Os resultados obtidos mostram que a HAL foi absorvida e passou a exercer efeitos sistêmicos e não somente locais na lesão cutânea, pois no grupo da HAL livre, a partir do 9º dia, alguns animais começaram a apresentar efeitos tóxicos do fármaco e três deles foram a óbito durante o experimento por pneumonia. Outros animais deste grupo desenvolveram conjuntivite. Esses efeitos podem estar relacionados a baixa da imunidade. Senyigit e Ozer (2012) descreveram essas reações adversas que podem ocorrer no organismo decorrente da baixa da imunidade pelo uso de glicocorticoides tópicos.

A figura 38 mostra os animais que receberam tratamento com as NNL carregadas e inertes e o fármaco livre no último dia do experimento (18º dia), exemplificando os resultados discutidos.

Figura 38: Imagens dos animais tratados com NNL carregada com HAL, NNL inerte e HAL livre no 18º dia após sofrer a lesão.



A medida das áreas das lesões na pele dos animais foi realizada até o 18º dia após a realização da lesão; e os valores das áreas médias estão apresentados na Tabela 8. Essas medidas demonstram como ocorreu o processo de retração das lesões durante o tratamento. As áreas dos grupos das NNL e NLS inertes (controle) apresentaram retração da lesão significativamente melhor que os grupos tratados com HAL, e entre os grupos tratados, NNL e NLS, não houve diferença estatística significativa.

Tabela 8: Área média das lesões dos grupos tratados.

<i>Grupo</i>	<i>D0 (cm² ± DP)</i>	<i>D3 (cm² ± DP)</i>	<i>D6 (cm² ± DP)</i>	<i>D9 (cm² ± DP)</i>	<i>D12 (cm² ± DP)</i>	<i>D15 (cm² ± DP)</i>	<i>D18 (cm² ± DP)</i>
NNL-HAL	4,72 ± (0,64) ^a	5,23 ± (0,69) ^a	4,13 ± (0,69) ^a	4,30 ± (0,87) ^a	3,93 ± (0,88) ^a	3,62 ± (1,53) ^a	2,39 ± (1,37) ^a
NLS-HAL	5,30 ± (0,98) ^a	6,61 ± (1,28) ^a	5,97 ± (0,68) ^a	5,91 ± (0,54) ^b	4,73 ± (1,29) ^a	3,68 ± (0,93) ^a	2,78 ± (1,15) ^a
NNL0	4,47 ± (0,47) ^a	4,15 ± (1,07) ^a	3,90 ± (1,24) ^a	1,82 ± (1,19) ^c	0,51 ± (0,34) ^b	0,452 ± (0,25) ^b	0,09 ± (0,08) ^b
NLS0	5,00 ± (0,95) ^a	5,25 ± (0,40) ^a	4,18 ± (0,71) ^a	2,48 ± (0,95) ^c	0,51 ± (0,21) ^b	0,26 ± (0,13) ^b	0,03 ± (0,94) ^b
HAL	4,95 ± (0,70) ^a	4,90 ± (0,24) ^a	4,74 ± (0,57) ^a	4,80 ± (0,73) ^{ab}	4,09 ± (0,55) ^a	4,72 ± (0,32) ^a	3,60 ± (0,57) ^a
Gel de natrosol	5,24 ± (0,65) ^a	5,78 ± (0,57) ^a	4,79 ± (0,60) ^a	2,22 ± (1,04) ^c	0,64 ± (0,15) ^b	0,38 ± (0,15) ^b	0,15 ± (0,15) ^b

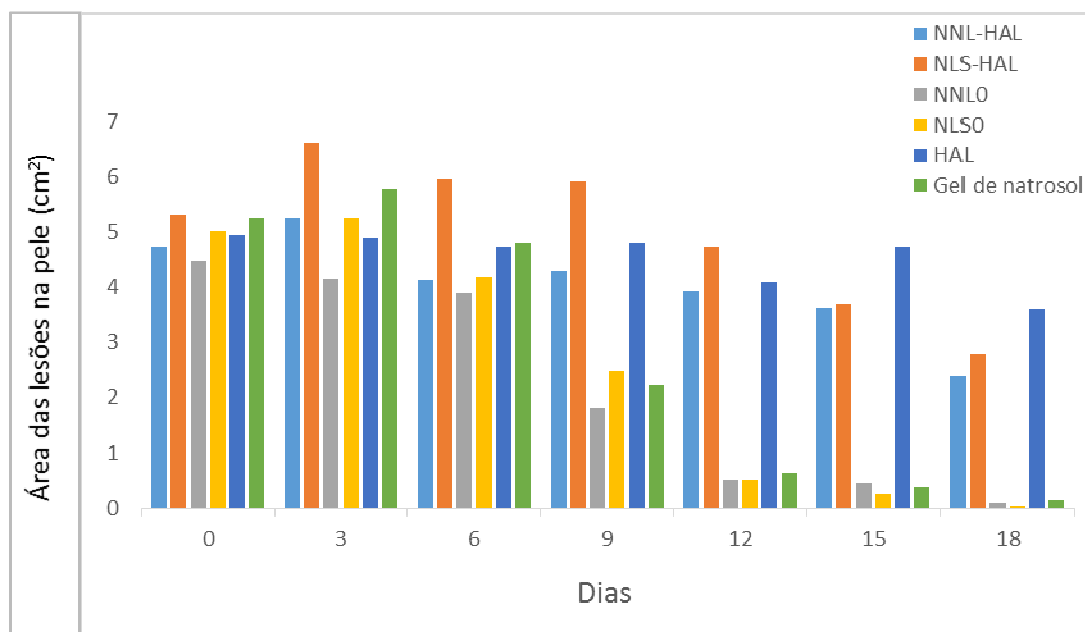
D: dia; DP: desvio padrão. Letras iguais indicam que não há diferença estatística significativa entre as amostras ($p > 0,05$) por ANOVA seguido de Teste de Tukey.

NNL-HAL e NLS-HAL: nanopartículas carregadas com HAL; NNL0 e NLS0: nanopartículas inertes; HAL: fármaco livre.

As áreas das lesões do grupo HAL livre nos 15º e 18º dias apresentavam-se, em média, 1,0 cm² maiores do que os grupos NNL e NLS carregadas com o fármaco, contudo essa diferença não foi estatisticamente significativa.

A retração das áreas das lesões durante todo o tratamento pode ser visualizada na Figura 39.

Figura 39: Representação gráfica da evolução do processo de cicatrização de acordo com a área das lesões.>NNL-HAL e NLS-HAL: nanopartículas carregadas com HAL;>NNLO e NLS0: nanopartículas inertes; HAL: fármaco livre.



Os grupos controle (>NNL e NLS inertes e gel) não apresentaram diferença entre si em nenhum momento da avaliação, indicando que a formulação das nanopartículas não interferiu na cicatrização. A retração completa das lesões na pele nestes grupos ocorreu aos 18 dias.

Em relação às formulações contendo HAL, os sistemas nanoparticulados>NNL e NLS apresentaram melhor avaliação macroscópica da cicatrização da lesão, sem presença de vermelhidão e exsudato na fase inflamatória da cicatrização e não apresentaram alterações patológicas, como ocorreu com os animais tratados com HAL livre, demonstrando a redução da toxicidade do fármaco devido ao efeito reservatório proporcionado pelas nanopartículas.

6 CONCLUSÃO

Nanopartículas lipídicas sólidas e nanopartículas poliméricas de núcleo lipídico incorporadas com halcinonida foram obtidas e caracterizadas. Os estudos de caracterização mostraram que as nanopartículas apresentaram diâmetro médio variando entre 260 a 500 nm, índice de polidispersão abaixo de 0,37, potencial zeta próximo a -30 mV, pH ente 5,3 e 6,5, apresentaram estabilidade após armazenamento de 60 dias e formato esférico com superfície lisa.

A análise de difração de raios x demonstrou a amorfização do fármaco nos sistemas nanoestruturados. As análises espectroscópicas na região do infravermelho e Raman com Transformada de Fourier foram capazes de identificar as bandas características dos principais componentes das formulações: ácido esteárico, triglicerídeo do ácido cáprico/caprílico, poli(ϵ -caprolactona) e da halcinonida, indicando que não houve ligação química entre eles. A análise térmica revelou os picos da fusão do fármaco, dos lipídeos e do polímero e mostrou o desaparecimento do pico de fusão da HAL nas nanopartículas indicando que o fármaco está no estado amorfo ou dissolvido no núcleo lipídico.

O estudo de permeação *in vitro* mostrou que pouca quantidade do fármaco (9 %) foi permeada durante 24 horas, mostrando o efeito reservatório das nanopartículas, importante para o controle da liberação da halcinonida.

O estudo *in vivo* revelou que a halcinonida livre administrada sobre a lesão cutânea foi tóxica, por ser absorvida e produzir efeitos adversos sistêmicos. Já as nanopartículas contendo o fármaco foram capazes de modular a inflamação da cicatrização, evitando a formação de edema e exsudato, porém prejudicando as fases subsequentes do processo de cicatrização. No entanto, a incorporação da halcinonida nas nanopartículas foi capaz de reduzir a toxicidade do fármaco pelo controle da sua liberação, impedindo a absorção sistêmica do fármaco.

Em relação às amostras, as duas nanopartículas lipídicas desenvolvidas apresentaram resultados semelhantes, sendo que as nanopartículas poliméricas de núcleo lipídico mostraram melhores retração da lesão e aspecto macroscópico, possivelmente causado pela presença do

polímero que, além do núcleo lipídico, permite maior controle da liberação da halcinonida.

Dessa forma, este estudo permitiu concluir que apesar das nanopartículas serem capazes de reduzir a toxicidade da halcinonida, evitando os efeitos sistêmicos indesejáveis, pelo controle da liberação do fármaco, a administração desses sistemas durante todo o período da reparação da pele apresentou um efeito prejudicial à cicatrização da lesão cutânea, demonstrando que o tratamento indicado poderia ser a administração das nanopartículas somente durante a fase inflamatória, com o objetivo de modular os efeitos da inflamação, como o rubor da área lesionada, dor, edema e a presença de exsudato, conforme observado nos estudos em animais.

7 REFERÊNCIAS

ABDEL-MOTTALEB, M. M. A.; MOULARI, B.; BEDUNEAU, A.; PELLEQUER, Y.; LAMPRECHT, A. Nanoparticles enhance therapeutic outcome in inflamed skin therapy. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 82, p. 151-157, 2012).

ABDELRAZEK, E. M.; HEZMA, A. M.; EL-KHODARY, A.; ELZAYAT, A. M. Spectroscopic studies and thermal properties of PCL/PMMA biopolymer blend. **Egyptian Journal of Basic and Applied Science**, 2015.

ALMEIDA, E. G. F. Propriedades vibracionais dos ácidos esteárico e palmítico. 2014. 72f. Dissertação (Mestrado em Recursos Naturais da Amazônia, área de concentração: Bioprospecção e Manejo de Recursos Naturais da Amazônia). Universidade Federal do Oeste do Pará.

AMMAR, I.; BARDAA, S.; MZID, M.; SAHNOUN, Z.; REBAIL, T.; ATTIA, H.; ENNOURI, M. Antioxidant, antibacterial and *in vivo* dermal wound healing effects of *Opuntia* flower extracts. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 81, p. 483-490, 2015.

ANANTACHAISILP, S.; SMITH, S. M.; TREETONG, A.; PRATONTEP, S.; PUTTIPIPATKHACHORN, S.; RUKTANONCHAI, U. R. Chemical and structural investigation of lipid nanoparticles: drug–lipid interaction and molecular distribution. **Nanotechnology**, v. 21, 2010.

AZOUZ, L. H.; DAHMOUNE, F.; REZGUI, F.; G'SELL, C. Full factorial design optimization of anti-inflammatory drug release by PCL–PEG–PCL microspheres. **Materials Science and Engineering C**, v. 58, p. 412-419, 2016.

ARANA, L.; SALADO, C.; VEJA, S.; AIZPURUA-OLAIZOLA, O.; ARADA, I.; SUAREZ, T.; USOBIAGA, A.; ARRONDO, J. L. R.; ALONSO, A.; GONI, F. M.;

ALKORTA, I. Solid lipid nanoparticles for delivery of *Calendula officinalis* extract. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 135, p. 18-26, 2015.

BALBINO, C. A.; PEREIRA, L. M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, p. 27-51, 2005.

BARS, G. L.; DION, S.; GAUTHIER, B.; MHEDHBI, S.; POHLMAYER-ESCH, G.; COMBY, P.; VIVAN, N.; RUTY, B. Oral toxicity of Miglyol 812® in the Gottingen® minipig. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, p. 1-8, 2015.

BECK, R. C. R.; GUTERRES, S. S.; FREDDO, R. J.; MICHALOWSKI, C. B.; BARCELLOS, I.; FUNK, J. A. B. Nanoparticles Containing Dexamethasone: Physicochemical Properties and Anti-Inflammatory Activity. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 22, p. 11-15, 2003.

BERGH, M.; MAGNUSSON, K.; NILSSON, J.L.; KARLBERG, A.T. Contact allergenic activity of Tween 80 before and after air exposure. **Contact Dermatitis**, v.37,n.1, p.9-18, 1997.

BERNABEU, E.; HELGUERA, G.; LEGASPI, M. J.; GONZALEZ, L.; HOCHT, C.; TAIRA, C.; CHIAPPETTA, D.A. Paclitaxel-loaded PCL–TPGS nanoparticles: In vitro and in vivo performance compared with Abraxane®. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 113, p. 43-50, 2014.

BOARDMAN, C.; CHACHI, L.; GAVRILA, A.; KEENAN, C.R.; PERRY, M. M.; XIA, Y. C.; MEURS, H.; SHARMA, P. Mechanisms of glucocorticoid action and insensitivity in airways disease. **Pulmonary Pharmacology & Therapeutics**, v. 29, p. 129-143, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE 899 de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do guia para a validação de métodos analíticos. Diário Oficial da República Federativa

do Brasil. Brasília, 02 de julho de 2003. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/hotsite/genericos/legis/resolucoes/2003/899_03re_e.pdf>. Acesso em: 02 fev. 2015.

CARBONE, M. G. P.; DI MAIO, E.; MUSTO, P.; BRAEUER, A.; MENSITIERI, G. On the unexpected non-monotonic profile of specific volume observed in PCL/CO₂ solutions. **Polymer**, v.56, p. 252-255, 2015.

CARDOSO, C.R.B.; SOUZA, M.A.; FERRO, E.A.V.; FAVORETO JR, S.; PENA, J.D.O. Influence of topical administration of n-3 and n-6 essential and n-9 nonessential fatty acids on the healing of cutaneous wounds. **Wound Repair and Regeneration**, v.12, n. 2, p.235-243, 2004.

CATAURO, M.; BOLLINO, F.; PAPALE, F.; PICOLELLA, S.; PACIFICO, S. Sol-gel synthesis and characterization of SiO₂/PCL hybrid materials containing quercetin as new materials for antioxidant implants. **Materials Science and Engineering C**, v. 58, p. 945-952, 2016.

CESARETTI, I. U.R. Processo fisiológico da cicatrização de feridas. **Ver. Pelle Sana**, v.2, p.10-12, 1998.

CHANDIKA, P.; KO, S-C.; JUNG, W-K. Marine-derived biological macromolecule-based biomaterials for wound healing and skin tissue regeneration. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 77, p. 24-35, 2015.

CHARÃO, M. F.; BAIERLE, M.; GAUER, B.; GOETHEL, G.; FRACASSO, R.; PAESE, K.; BRUCKER, N.; MORO, A. M.; BUBOLS, G. B.; DIAS, B. B.; MATTE, U. S.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R.; GARCIA, S. C. Protective effects of melatonin-loaded lipid-core nanocapsules on paraquat-induced cytotoxicity and genotoxicity in a pulmonary cell line. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 784-785, p. 1-9, 2015.

CHEN, Z.; CAO, L.; SHAN, F.; FANG, G. Preparation and characteristics of microencapsulated stearic acid as composite thermal energy storage material in buildings. **Energy and Buildings**, v. 62, p. 469-474, 2013.

CORADINI, K.; LIMA, F. O.; OLIVEIRA, C. M.; CHAVES, P. S.; ATHAYDE, M. L.; CARVALHO, L. M.; BECK, R. C. R. Co-encapsulation of resveratrol and curcumin in lipid-core nanocapsules improves their in vitro antioxidant effects. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 88, p. 178-185, 2014.

DAL PIZOL, C. Desenvolvimento de nanopartículas lipídica sólida contendo um análogo de pirimidina e avaliação *in vitro* da atividade tumoral. 2014. 172f. Tese (Doutorado em Farmácia, na área de concentração de Fármaco-medicamentos). Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina.

DIAS, D.F. Síntese e caracterização de nanopartículas de FeCo pelo método sol-gel proteico. 2013. 50f. Monografia (Bacharel em Física, na área Física da matéria condensada). Universidade Federal do Ceará, Brasil.

DJEFEL, D.; MAKHLOUF, S.; KHEDACHE, S.; LEFEBURE, G.; ROYON, L. Preparation and characterization of stearic acid/ olive pomace powder composite as form-stable phase change material. **International Journal of Hydrogen Energy**, p. 1-7, 2015.

DOGAN, F.; TEMIZKAN, K.; KAYA, I. A novel shape-controlled synthesis of bifunctional organic polymeric Nanoparticles. **Polymer**, v. 70, p. 59-67, 2015.

DOLATABADI, J. E. N. *et al.* Formulation, characterization and cytotoxicity studies of alendronate sodium-loaded solid lipid nanoparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 117, p. 21-28, 2014.

DURÁN, N.; DURÁN, M.; TASIC, L.; MARCATO, P. D. Tecnologia de nanocristais em fármacos. **Química Nova**, v. 33, p. 151-158, 2010.

ELLIOT, C. G.; FORBES, T. L.; LEASK, A.; HAMILTON, D. W. Inflammatory microenvironment and tumor necrosis factor alpha as modulators of periostin and CCN2 expression in human non-healing skin wounds and dermal fibroblasts. **Matrix Biology**, 2015.

FIEL, L. A.; PAESE, K.; RIZZI, M.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R. A strategy to estimate the intrinsic flux of a poorly water soluble substance for comparison with its release from lipid-core nanocapsules. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 441, p. 716-724, 2014.

FILON, F. L.; MAURO, M.; ADAMI, G.; BOVENZI, M.; CROSER, M. Nanoparticles skin absorption: New aspects for a safety profile Evaluation. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 72, p. 310-322, 2015.

FRIEDRICH, R. B.; KANN, B.; CORADINI, K.; OFFERHAUS, H. L.; BECK, R. C. R.; WINDBERGS, M. Skin penetration behavior of lipid-core Nanocapsules for simultaneous delivery of resveratrol and curcumin. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 78, p. 204-213, 2015.

GAINZA, G.; VILLULLAS, S.; PEDRAZ, J. L.; HERNANDEZ, R. M.; IRGATUA, M. Advances in drug delivery systems (DDSs) to release growth factors for wound healing and skin regeneration. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, 2015.

GHADIRI, M.; FATEMI, S.; VATANARA, A.; DOROUD, D.; NAJAFABADI, A. R. DARABI, M.; RAHIMI, A. A. Loading hydrophilic drug in solid lipid media as nanoparticles: Statistical modeling of entrapment efficiency and particle size. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 424, p. 128-137, 2012.

GOMES, M. L. S.; KLEIN, T.; SIMINONATO, M.; NADAL, J. M.; ZANIN, S. M. W.; BORSATO, D. M.; FARAGO, P. V. A Simple RP-HPLC/UV Method for Determination of Cilostazol in Polymeric Nanoparticles Suspensions:

Development and Validation. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 34, p. 803-809, 2015.

GUICHARD, A.; HUMBERT, P.; TISSOT, M.; MURET, P.; COURDEROT-MASUYER, C.; VIENNET, C. Effects of topical corticosteroids on cell proliferation, cell cycle progression and apoptosis: In vitro comparison on HaCaT. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 479, p. 422-425, 2015.

HATANO, Y. New insight into the pathogenesis of atopic dermatitis from analysis of the mutual association between permeability barrier dysfunction and allergic inflammation. **Dermatologica Sinica**, v.33, p. 74-77, 2015.

HENGGE, U. R.; RUZICKA, T.; SCHWARTZ, R. A.; CORK, M. J. Adverse effects of topical glucocorticosteroids. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 54, p. 1-15, 2006.

HOQUE, M. E.; MENG, T. T. H.; CHUAN, Y. L.; CHOWDHURY, M.; PRASAD, R. G. S. V. Fabrication and characterization of hybrid PCL/PEG 3D scaffolds for potential tissue engineering applications. **Materials Letters**, v. 131, p. 255-258, 2014.

HUSSAIN, Z.; KATAS, H.; AMIN, M. C. I. M.; KUMOLOSASI, E.; BUANG, F.; SAHUDIN, S. Self-assembled polymeric nanoparticles for percutaneous co-delivery of hydrocortisone/hydroxytyrosol: An ex vivo and in vivo study using an NC/Nga mouse model. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 444, p. 109-119, 2013.

HUSSNI, C. A.; GIANINI, C. G.; ALVES, A. L. G.; NICOLETTI, J. L. M.; THOMASSIAN, A.; CROCCI, A. J.; SEQUEIRA, J. L. Cicatrização cutânea por segunda intenção em equinos tratados com vedaprofeno. **Archives of Veterinary Science**, v. 9, p. 87-92, 2004.

JEPPS, O. G.; DANK, Y.; ANISSIMOV, Y. G.; ROBERTS, M. S. Modeling the human skin barrier — Towards a better understanding of dermal absorption. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, p. 152-168, 2013.

JESUS, M. B.; ZUHORN, I. S. Solid lipid nanoparticles as nucleic acid delivery system: Properties and molecular mechanisms. **Journal of Controlled Release**, v. 201, p. 1-13, 2015.

KELIDARI, H. R.; SAEEDI, M.; AKBARI, J.; MORTEZA-SEMNANI, K.; GILL, P.; VALIZADEH, H.; NOCHODCHIA, A. Formulation optimization and in vitro skin penetration of spironolactone loaded solid lipid nanoparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.128, p. 473-479, 2015.

KIM, S. Y.; HWANG, J-Y.; SEO, J-W.; SHIN, U. S. Production of CNT-taxol-embedded PCL microspheres using an ammonium-based room temperature ionic liquid: As a sustained drug delivery system. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 442, p. 147-153, 2015.

KIRSCHBAUM, J.; POET, R.; BUSH, K.; PETRIE, G. High-performance liquid chromatography of the topical anti-inflammatory steroid halcinonide. **Journal of Chromatography**, v. 190, p. 481-485, 1980.

KLEIN, T.; LONGHINI, R.; MELLO, J. C. P. Development of an analytical method using reversed-phase HPLC-PDA for a semipurified extract of *Paullinia cupana* var. *sorbilis* (guaraná). **Talanta**, v.88, p. 502-506, 2012;

KOTZIANOVA, A.; REBICEK, J.; MOJZES, P.; POKORNY, M.; PALACKY, J.; HRBAC, J.; VELEBNY, V. Analysis of composite nanofibrous layers by confocal Raman Microscopy. **Polymer**, v.55, p.5036-5042, 2014.

KULKAMP, I. C.; PAESE, K.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R. Estabilização do ácido lipóico via encapsulação em nanocápsulas poliméricas planejadas para aplicação cutânea. **Química Nova**, v. 32, p. 2078-2084, 2009.

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

KREUTER J. Nanoparticles – a historical perspective. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 331, p. 1-10, 2007.

KUMAR, V. D.; VERMA, P. R. P.; SINGH, S. K. Development and evaluation of biodegradable polymeric nanoparticles for the effective delivery of quercetin using a quality by design approach. **LWT - Food Science and Technology**, v. 61, p. 330-338, 2015.

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

LASSERA, S.; BASIT, A.; SOZIO, P.; MARINELLI, L.; FORNASARI, E.; CACCIATORE, I.; CIULLA, M.; TURKEZ, H.; GEYIKOGLU, F.; DI STEFANO, A. Solid lipid nanoparticles loaded with lipoyl–memantine codrug: Preparation and characterization. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 485, p. 183-191, 2015.

LATIBARI, S. T.; MEHRALI, M.; MEHRALI, M.; AFIFI, A. B. M.; MAHLIA, T. M. I.; AKHIANI, A. R.; METSELAAR, H. S. C. Facile synthesis and thermal performances of stearic acid/titania core/ shell nanocapsules by sol-gel method. **Energy**, v.85, p. 635-644, 2015.

LI, Z.; TAN, B. H. Towards the development of polycaprolactone based amphiphilic block copolymers: molecular design, self-assembly and biomedical applications. **Materials Science and Engineering C**, v. 45, p. 620-634, 2014.

LI, Z.; WANG, H.; YANG, B.; SUN, Y.; HUO, R. Three-dimensional graphene foams loaded with bone marrow derived mesenchymal stem cells promote skin

wound healing with reduced scarring. **Materials Science and Engineering C**, v. 57, p. 181-188, 2015.

LOPES, W. A.; FASCIO, M. Esquema para interpretação de espectros de substâncias orgânicas na região do infravermelho. **Química Nova**, v. 27, p. 670-673, 2004.

MARENGO, E.; CAVALLI, R.; CAPUTO, O.; RODRIGUEZ, L.; GASCO, M.R. Scale-up of the preparation process of solid lipid nanospheres. Part I. **Int. J. Pharm.**, v.205, n.1-2, p.3-13, 2000.

MARQUES, I.; LOPES, C. M.; SOUTO, E. B. Novos Sistemas Terapêuticos Nanotecnológicos. **Revista da Faculdade de Ciências da Saúde**, Porto: Edições Universidade Fernando Pessoa, ISSN 1646-0480.6, p. 60-68, 2009.

MEHNERT, W.; MADER, K. Solid lipid nanoparticles - Production, characterization and applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, p. 83-101, 2012.

MOMOH, F. U.; BOATENG, J. S.; RICHARDSON, S. C. W.; CHOWDHRY, B. Z.; MITCHELL, J. C. Development and functional characterization of alginate dressing as potential protein delivery system for wound healing. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 81, p. 137-150, 2015.

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

MU, X.; YU, H.; ZHANG, C.; CHEN, X.; CHENG, Z.; BAI, R.; WU, X.; YU, Q.; WU, C.; DIAO, Y. Nano-porous nitrocellulose liquid bandage modulates cell and cytokine response and accelerates cutaneous wound healing in a mouse model. **Carbohydrate Polymers**, v. 136, p. 618-629, 2016.

NEGI, J. S.; CHATTOPADHYAY, P.; SHARMA, A.K.; RAM, V. Development of solid lipid nanoparticles (SLNs) of lopinavir using hot self nano-emulsification

(SNE) technique. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 48, p. 231-239, 2013.

NEMEN, D.; LEMOS-SENNA, E. Preparação de caracterização de suspensões coloidais de nanocarreadores lipídicos contendo resveratrol destinados à administração cutânea. **Química Nova**, v.34, p. 408-413, 2011.

OLIVEIRA, A. M.; JAGER, E.; JAGER, A.; STEPÁNEK, P.; GIACOMELLI, F. C. Physicochemical aspects behind the size of biodegradable polymericnanoparticles: A step forward. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 436, p. 1092-1102, 2013.

OTANG, W. M.; AFOLAYAN, A. J. Antimicrobial and antioxidant efficacy of Citrus limon L. peel extracts used for skin diseases by Xhosa tribe of Amathole District, Eastern Cape, South Africa. **South African Journal of Botany**, v. 102, p.46-49, 2016.

PARK, M.; SHIN, H. K.; KIM, B-S.; KIM, M. J.; KIM, I-S.; PARK, B-Y.; KIM, H-Y. Effect of discarded keratin-based biocomposite hydrogels on the wound healing process in vivo. **Materials Science and Engineering C**, v. 55, p. 88-94, 2015.

PARVEEN, S.; MISRA, R.; SAHOO, S.K. Nanoparticles: a boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging. **Nanomedicine**, v.8, p. 147-166, 2012.

PINTO REIS, C.; NEUFELD R.J., RIBEIRO, A.J., VEIGA F. Nanoencapsulation I. Methods for Preparation of Drug-Loaded Polymeric Nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine** v. 2, p. 8-21, 2006.

PRADHAN, M.; SINGH, D.; MURTHY, S. N.; SINGH, M. R. Design, characterization and skin permeating potential of Fluocinolone acetonide loaded nanostructured lipid carriers for topical treatment of psoriasis. **Steroids**, v. 101, p. 56-63, 2015.

RESCIGNANO, N.; FORTUNATI, E.; ARMENTANO, I.; HERNANDEZ, R.; MIJANGOS, C.; PASQUINO, R.; KENNY, J. M. Use of alginate, chitosan and cellulose nanocrystals as emulsion stabilizers in the synthesis of biodegradable polymeric nanoparticles. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 445, p. 31-39, 2015.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, set./out. 2004.

SAGIRI, S. S.; SINGH, V. K.; PAL, K.; BANERJEE, I.; BASAK, P. Stearic acid based oleogels: A study on the molecular, thermal and mechanical properties. **Material Science and Engineering C**, v.48, p. 688-699, 2015.

SAKATA, S.; UCHIDA, K.; KAETSU, I.; KITA, Y. Programming control of intelligent drug releases in response to single and binary environmental stimulation signals using sensor and electroresponsive hydrogel. **Radiat. Phys. Chem.**, Amsterdam, v.76, p.733-737, 2007.

SAVIAN, A. L.; RODRIGUES, D.; WEBER, J.; RIBEIRO, R. F.; MOTTA, M. H.; SCHAFFAZICK, S. R.; ADAMNS, A. I. H.; ANDRADE, D. F.; BECK, R. C. R.; SILVA, C. B. Dithranol-loaded lipid-core nanocapsules improve the photostability and reduce the in vitro irritation potential of this drug. **Materials Science and Engineering C**, v. 46, p. 69-76, 2015.

SCHACKE, H.; DOCKE, W-D.; ASADULLAH. Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 96, p. 23-43, 2002.

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

SHAFFAZICK, S.R. Desenvolvimento tecnológico e a valiação da atividade antioxidante de sistemas nano e microparticulado contendo melatonina. 2006. 242f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas – Produção e Controle de Qualidade de Produtos Farmacêuticos). Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre – RS.

SENYIGIT, T. & OZER, O. Corticosteroids for Skin Delivery: Challenges and New Formulation Opportunities. **Glucocorticoids – New Recognition of Familiar Friend**, Ed. Dr. Xiaoxiao Qian, 2012.

SEVERINO, P.; PINHO, S. C.; SOUTO, E. B.; SANTANA, M. H. A. Polymorphism, crystallinity and hydrophilic–lipophilic balance of stearic acid and stearic acid–capric/caprylic triglyceride matrices for production of stable nanoparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, V. 86, 0. 125-130, 2011.

SHAH, B.; KHUNT, D.; BHATT, H.; MISRA, M.; PADH, H. Application of quality by design approach for intranasal delivery of rivastigmine loaded solid lipid Nanoparticles: Effect on formulation and characterization parameters. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 78, p. 54-66, 2015.

SHAHZAD, Y.; LOUW, R.; GERBER, M.; DU PRESSIS, J. Breaching the skin barrier through temperature modulations. **Journal of Controlled Release**, v. 202, p. 1-13, 2015.

SILVA, C. O.; RIJO, P.; MOLPECERES, J.; FIGUEIREDO, I. V.; ASCENSÃO, L.; FERNANDES, A. S.; ROBERTO, A.; REIS, C. P. Polymeric nanoparticles modified with fatty acids encapsulating betamethasone for anti-inflammatory treatment. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 493, p. 271-284, 2015.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRIL, T. C. **Spectrometric identification of organic compounds**. Wiley, New York, 1991. 430p. 5ª Edição.

SMITH, G. P. S.; McGOVERIN, C. M.; FRASER, S. J.; GORDON, K. C. Raman imaging of drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 89, p. 21-41, 2015.

SONG, J.; GAO, H.; ZHU, G.; CAO, X.; SHI, X.; WANG, Y. The preparation and characterization of polycaprolactone/grapheme oxide biocomposite nanofiber scaffolds and their application for directing cell behaviors. **Carbon**, v. 95, p. 1039-1050, 2015.

SOUTO, E. B.; SEVERINO, P.; SANTANA, M. H. A. Preparação de Nanopartículas Poliméricas a partir da Polimerização de Monômeros - Parte I. **Polímeros**, v. 22, p. 96-100, 2012.

SOUZA, F. F.; FREIRE, P. T. C.; MENEZES, A. S.; PINHEIRO, G. S.; CARDOSO, L. P.; ALCANTARA JR, P.; MOREIRA, S. G. C.; MELO, F. E. A.; MENDES FILHO, J.; SARAIVA, G. D. Low-temperature phase transformation studies in the stearic acid: C form. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 148, p. 280-288, 2015.

TAHERI, A.; FELDMAN, S. R. Halcinonide: a review of its clinical merits. **Current Clinical solutions**, 2012.

TAZIMA, M. F. G. S.; VICENTE, Y. A. M. V. A.; MORIYA, T. Biologia da ferida e cicatrização. *Medicina*, v. 41, p. 259-264, 2008).

VENKATRAMAN, S. S.; SHEN, Z.; ZHU, G.; CUI, H.P. Shape/temperature memory phenomena in un-crosslinked poly-ε-caprolactone (PCL). **European Polymer Journal**, v. 72, p. 282-295, 2015.

WANG, J. LIU, W. TU, Q. SONG, N. ZHANG, Y. NIE, N. Folate-decorated hybrid polymeric nanoparticles for chemically and physically combined paclitaxel loading and targeted delivery. **Biomacromolecule**, v. 10, p. 228-234, 2010.

WANG, G.; XU, W.; HOU, Q.; GUO, S. A simple sonochemical method for fabricating poly(methyl methacrylate)/stearic acid phase Change energy storage nanocapsules. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 27, p. 403-407, 2015.

WANG, Y.; JI, H.; SHI, H.; ZHANG, T.; XIA, T. Fabrication and characterization of stearic acid/polyaniline composite with electrical conductivity as phase Change materials for thermal energy storage. **Energy Conversion and Management**, v. 98, p. 322-330, 2015.

WEELS, T.; BASKETTER, D.A.; SCHRODER, K.R. In vitro skin irritation: facts and futures. State of the art review of mechanisms and models. **Toxicol. In Vitro**, v.18, n.3, p.231-243, 2004.

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

WOODRUFF, M. A.; HUTMACHER, D. W. The return of a forgotten polymer – Polycaprolactone in the 21st century. **Progress in Polymer Science**, v. 35, p. 1217-1256, 2010.

WOUK, A. F. P. F.; DINIZ, J. M.; CÍRIO, S. M.; SANTOS, H.; BALTAZAR, E. L.; ACCO, A. Membrana biológica (Biofill®) – Estudo comparativo com outros agentes promotores da cicatrização da pele em suínos: Aspectos clínicos, histopatológicos e morfométricos. **Archives of Veterinary Science**, v. 3, p. 31-37, 1998.

<http://www.abcam.com/Halcinonide-ab145820.html> Acessado em 15/06/2015.

<http://www.fagron.com.br/Produtos/Detalhes?Codigo=51751&Nome=TRIGLICE RIDES%20AC.CAPRICO%20CAPR> Acessado em 10/01/2016.

http://www.mapric.com.br/anexos/boletim322_17092007_160310.pdf Acessado em 10/01/2016.