

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

LUCIANE STANKIEWSKI

DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS
CONTENDO COLECALCIFEROL

PONTA GROSSA
2017

LUCIANE STANKIEWSKI

DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS
CONTENDO COLECALCIFEROL

Dissertação apresentada como requerimento parcial para 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^a. Dr^a. Josiane Padilha de Paula.

PONTA GROSSA
2017

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

S784 Stankiewski, Luciane
Desenvolvimento tecnológico
denanopartículas poliméricas
contendocolecalciferol/ Luciane
Stankiewski. PontaGrossa, 2017.
91f.

Dissertação (Mestrado em
CiênciasFarmacêuticas - Área de
Concentração:Fármacos, Medicamentos e
BiociênciasAplicadas à Farmácia),
UniversidadeEstadual de Ponta Grossa.
Orientador: Prof. Dr. Josiane
Padilhade Paula.

1.Aplicação tópica.
2.Colecalciferol.3.Nanopartículas
poliméricas. 4.Permeaçãocutânea. I.Paula,
Josiane Padilha de.

II.

Universidade Estadual de Ponta Grossa.
Mestrado em Ciências Farmacêuticas.
III.T.

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS –
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: FÁRMACOS, MEDICAMENTOS E BIOCÊNCIAS
APLICADAS À FARMÁCIA, NÚMERO DA ATA 05/2017, DA MESTRANDA LUCIANE
STANKIEWSKI REALIZADO NO DIA 10 DE MARÇO DE 2017, NA UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE PONTA GROSSA.

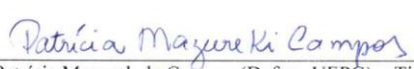
Aos dez dias de março de dois mil e dezessete, às 09h00min no Auditório do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Bloco M, sala 115, da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) em seção pública sob a presidência da Professora Doutora Josiane Padilha de Paula, reuniu-se a Banca Examinadora de defesa da Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas da mestranda Luciane Stankiewski na linha de pesquisa: Desenvolvimento e Controle de Fármacos, Medicamentos e Correlatos, constituída pelas demais Doutoradas (membros titulares): Patrícia Mazurek de Campos (UEPG/PR) e Eliana Aparecida Fagundes Queiroz Bortolozo (UTFPR/PR). Iniciados os trabalhos, a presidência deu conhecimento aos membros da banca e à candidata das normas que regem a defesa de dissertação de Mestrado e definiu-se a ordem a ser seguida pelos examinadores para arguição. O título do trabalho foi: “DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS CONTENDO COLECALCIFEROL.” Encerrado a defesa, a banca pronunciou-se APROVADA a dissertação, considerado como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. A aluna deverá entregar, no prazo de até 30 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.

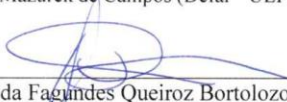
Observações (se necessário): _____

Alteração de título: sim ☐ não ☒

Novo título: _____


Josiane Padilha de Paula¹ - (Defar – UEPG) - Presidente


Patrícia Mazurek de Campos (Defar - UEPG) – Titular


Eliana Aparecida Fagundes Queiroz Bortolozo (UTFPR) – Titular

Ponta Grossa, 10 de março de 2017.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por sua bondade infinita, sempre me abençoando e dando forças em todos os momentos da minha vida, permitindo que eu conseguisse alcançar mais uma vitória em minha vida.

À minha orientadora Prof^a. Dr^a.Josiane Padilha, pela oportunidade, generosidade, conselhos, sugestões, carinho, por me conduzir com muita paciência para a conclusão deste trabalho. Por ter me acolhido de braços abertos e ser uma referência pessoal e profissional.

À professora Prof^a. Dr^a.Traudi Klein, pela ajuda, conselhos, sugestões, apoio e amizade.

À Prof^a. Dr^a.Patrícia Mazureki, pela enorme contribuição no momento da minha qualificação e defesa com suas sugestões e correções.

Aos professores Flávio Luís Beltrame, Josélia Daher, Priscileila Ferrari, Paulo Vitor Farago, Daniel Fernandes, Maiza Althaus, Giovane Favero, Gilson Franco e Luís Antônio Esmerino, pela participação e colaboração nas disciplinas ministradas.

Aos meus colegas de laboratório, Joel e Angélica, que sempre estiveram dispostos a ajudar, incentivar, trocando conhecimentos e nos tornando uma verdadeira equipe.

Aos meus colegas de turma, Loanda, Luiza, Joel e Angélica, por sempre estarem dispostos a me ajudar em tudo que foi preciso, com companheirismo e amizade.

À Jessica Schemin, pela paciência, companheirismo e ajuda mútua neste trabalho.

Ao secretário e secretária do Programa de Pós Graduação, Jonas e Luzia, pela atenção e excelente atendimento prestado durante estes anos.

Aos funcionários do C-LABMU, por serem tão atenciosos comigo, me auxiliando em diversos testes, sempre me tratando com muita gentileza e amizade.

Aos meus pais Pedro Stankiewski e Anizia Nazar Stankiewski, que sempre estiveram ao meu lado, me apoiando, incentivando, e sendo meu refugio nos momentos mais difíceis.

À minha irmã Franciele Stankiewski, pelo apoio, pela ajuda e incentivo.

À minha amiga Fabiula Franke, por estar sempre ao meu lado com muita paciência, sendo meu ombro amigo nas horas mais difíceis desta fase da minha vida, sempre disponível a me ajudar.

Aos meus amigos Suelen e Guilherme, que sempre entenderam a importância do mestrado para mim, estando sempre ao meu lado me incentivando, me apoiando e compreendendo minha ausência em vários momentos.

As bioquímicas, Fabiula, Gabrielle, Luciane, Julianna e Barbara, por me substituírem várias vezes em minhas atividades no LAPAC, permitindo assim que eu pudesse dar continuidade os meus experimentos e aulas.

À Bárbara, Clarissa, Vanessa Bobec e Amanda, por me esclarecerem diversas dúvidas e auxiliarem nas interpretações de resultados, estando sempre à disposição.

Aos meus chefes do Laboratório Pontagrossense de Análises Clínicas: Eduardo Pietruchinski, Jeanine Margraf Bittencourt, Márcia Venâncio Marcon, por me liberarem da rotina do laboratório para que esse trabalho pudesse ser concluído.

Enfim, agradeço a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento e finalização desse trabalho.

RESUMO

A vitamina D é um composto lipossolúvel, de origem vegetal (vitamina D₂ ou ergocalciferol) ou animal (vitamina D₃ ou colecalciferol), responsável pela homeostase do cálcio, além de apresentar efeito pleiotrópico. A maior fonte de colecalciferol é a exposição da pele à radiação solar. A deficiência da vitamina D é considerada um problema de saúde mundial, sendo que a hipovitaminose D pode ser corrigida com a exposição aos raios solares, alimentação ou administração por via oral do colecalciferol. Atualmente a exposição aos raios solares é limitada, a quantidade de ingestão através da alimentação não é suficiente e a reposição por via oral pode apresentar falhas, devido à deficiente adesão do paciente ao tratamento. Assim, com o propósito de elaborar sistemas de liberação modificada, e formulação estável contendo a vitamina D, para sua proteção contra degradação, devida sua labilidade, o objetivo deste trabalho foi obter e caracterizar suspensões de nanopartículas poliméricas contendo colecalciferol, para administração pela via transdérmica. Para tanto, as formulações obtidas foram caracterizadas através de: tamanho médio, potencial zeta, índice de polidispersão, estabilidade da suspensão, eficiência de encapsulação da vitamina D, microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo, difração de raios X, espectroscopia na região do infravermelho, calorimetria diferencial de varredura, análise termogravimétrica e estudo *in vitro* da permeação cutânea. Foi desenvolvido e validado um método analítico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência para quantificação do fármaco. As nanopartículas poliméricas foram preparadas pela técnica de nanoprecipitação utilizando o polímero poli (ϵ -caprolactona), com 0,100 g de colecalciferol, na proporção polímero:fármaco (2:1). A formulação apresentou eficiência de encapsulação de aproximadamente 98%, valores de pH de 6,0, tamanho médio de 269,1 nm, índice de polidispersão menor que 0,22 e potencial zeta de -33,0 mV. As imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura revelaram formato esférico com superfície lisa e homogeneidade das nanopartículas. Os resultados obtidos por difração de raios X revelam uma diminuição da cristalinidade do fármaco encapsulado no sistema nanoestruturado. Pela análise de espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier foi identificado pelas bandas, que não ocorreram interações químicas entre o fármaco e o polímero utilizado, porém foi demonstrado a encapsulação do colecalciferol. A análise termogravimétrica revelaram os picos de fusão do fármaco e do polímero utilizados e a temperatura da sua degradação. A formulação de colecalciferol com poli (ϵ -caprolactona) apresentou-se estável após 60 dias de armazenamento. Os resultados da permeação *in vitro* das nanopartículas poliméricas contendo colecalciferol apresentaram 21,5% de permeação do fármaco. Portanto, o uso de nanopartículas poliméricas pode ser uma estratégia promissora na reposição do colecalciferol, através da aplicação tópica para promoção de níveis adequados à saúde humana.

Palavras-chave: aplicação tópica, colecalciferol, nanopartículas poliméricas, permeação cutânea.

ABSTRACT

Vitamin D is a lipid-soluble compound of plant origin (vitamin D₂ or ergocalciferol) or animal (vitamin D₃ or cholecalciferol), responsible for calcium homeostasis, in addition to a pleiotropic effect. The major source of cholecalciferol for humans is the skin exposure to solar radiation. Vitamin D deficiency is considered a global health problem being that, hypovitaminosis D can be corrected by skin exposure to sunlight, food or oral administration of cholecalciferol. Currently the skin exposure to sunlight is limited and the amount ingested through the diet is not enough and oral replacement may present flaws, due to poor adherence of the patient to the treatment. Thus, in order to elaborate modified release systems, and to protect the drug due its lability, resulting in a more stable formulation, the objective of this work was to obtain and characterize suspensions of polymeric nanoparticles, for administration by the transdermal route of the cholecalciferol. Therefore, the formulations were obtained and performed the physical-chemical characterization through: medium size, zeta potential, polydispersity index, pH, suspension stability, vitamin D encapsulation efficiency, field scanning electron microscopy, diffraction X-ray spectroscopy, differential scanning calorimetry, thermogravimetric analysis and in vitro study of skin permeation study. An analytical method was developed and validated by high-performance liquid chromatograph for quantification of the drug. Polymeric nanoparticles were prepared by the nanoprecipitation technique using the poly (ϵ -caprolactone) polymer, with 0.100 g of cholecalciferol, in the ratio of polymer: drug (2: 1). The formulation had mean particle size of 269.1 nm, zeta potential of -33.0 mV, polydispersity index less than 0.22, and pH 6.0. The formulation of cholecalciferol with poly (ϵ -caprolactone) was stable after 60 days of storage. The encapsulation efficiency was approximately 98%, the images obtained by scanning electron microscopy revealed spherical shape with smooth surface and homogeneity of the nanoparticles. The results obtained by X-ray diffraction reveal a decrease in the crystallinity of the drug encapsulated in the nanostructured system. Fourier transform infrared spectroscopy was identified by bands that there were no chemical interactions between the drug and the polymer used, but the encapsulation of cholecalciferol was demonstrated. Thermogravimetric analysis revealed the melting peaks of the drug and polymer and also the temperatures of their degradation. The result of the in vitro skin permeation demonstrated the polymeric nanoparticles 21.5% cholecalciferol permeation. Thus, the use of polymeric nanoparticles can be a promising strategy in the replacement of cholecalciferol through topical application to promote appropriate levels to the human health.

Keywords: topical application, cholecalciferol, polymeric nanoparticles, skin permeation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Diferenças entre as fórmulas esteroquímicas das vitaminas D2 e D3.....	18
Figura 2 -	Vias para penetração de moléculas através da pele.....	27
Figura 3 -	Esquema representativo da célula vertical de difusão.....	29
Figura 4 -	Representação da escala nanométrica.....	31
Figura 5 -	Representação esquemática e nanoesferas poliméricas.....	33
Figura 6 -	Estrutura química da PCL.....	35
Figura 7 -	Fluxograma das etapas realizadas no desenvolvimento da pesquisa.....	40
Figura 8 -	Representação do método de obtenção das suspensões de nanopartículas poliméricas.....	41
Figura 9 -	Dispositivo de ultrafiltração utilizado para eficiência de encapsulação das nanopartículas poliméricas.....	48
Figura 10 -	Suspensão de NP0 (A) e NPCOL (B).....	50
Figura 11 -	Fotomicrografia da NPCOL.....	54
Figura 12 -	Fotomicrografia da NP0.....	54
Figura 13 -	Difratograma do colecalciferol.....	56
Figura 14 -	Difratograma do PCL (A), colecalciferol (B) e das NPCOL (C).....	56
Figura 15 -	Espectro IVTF do polímero PCL.....	58
Figura 16 -	Espectro IVTF do colecalciferol.....	59
Figura 17 -	Espectro IVTF das NPCOL.....	60
Figura 18 -	Espectro IVTF comparativo das NPCOL, NP0 e colecalciferol.....	60

Figura 19 -	Termograma obtido por DSC do colecalciferol, NPCOL e NP0....	61
Figura 20 -	Curva de TGA do colecalciferol (A); NP0 (B) e NPCOL (C) e comparativo (D).....	63
Figura 21 -	Representação gráfica da curva analítica média para a determinação do colecalciferol em metanol 98% obtida por CLAE ($\lambda = 265$ nm).....	66
Figura 22 -	Suspensão de NP0 (A) e NPCOL (B), após 60 dias de armazenamento.....	70
Figura 23 -	Perfil da permeação cutânea “ <i>in vitro</i> ” do colecalciferol livre e das nanopartículas poliméricas de colecalciferol.....	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Epidemiologia da hipovitaminose D em várias faixas etárias, percentagens e localização mundial.....	21
Tabela 2 -	Doses de manutenção diárias de colecalciferol recomendadas para população geral e para população de risco para deficiência.....	22
Tabela 3 -	Composição das formulações de nanopartículas poliméricas.....	42
Tabela 4 -	Resultados obtidos das formulações de NP0 e NPCOL.....	51
Tabela 5 -	Resumo dos parâmetros da curva de calibração.....	65
Tabela 6 -	Resultado de ANOVA para linearidade do método.....	66
Tabela 7 -	Dados da repetibilidade e precisão intermediária para análise do colecalciferol.....	67
Tabela 8 -	Teor de colecalciferol encapsulado e eficiência de encapsulação método indireto.....	69
Tabela 9 -	Comparação dos resultados obtidos das NP0 e NPCOL tempo=0 e 60 dias de armazenamento.....	70
Tabela 10 -	Teor de colecalciferol encapsulado e eficiência de encapsulação nanopartículas recém-preparadas e após 60 dias – método indireto.....	72
Tabela 11 -	Permeação cutânea do colecalciferol livre e nanoencapsulado.....	73

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CLAE	Cromatografia Líquida Alta eficiência
COL	Colecalciferol
DA	Dermatite Atópica
DM	Diâmetro Médio
DSC	Calorimetria Diferencial de Varredura
DP	Desvio Padrão
DPR	Desvio Padrão Relativo
EE	Eficiência de Encapsulação
FEG	Microscopia Eletrônica de Varredura por Emissão de Campo
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
IVTF	Infravermelho com Transformada de Fourier
KBr	Brometo de Potássio
kV	Kilovolts
LD	Limite Inferior de Detecção
LQ	Limite Inferior de Quantificação
mV	Milivolts
nm	Nanômetros
NPCOL	Nanopartículas de Colecalciferol
NP0	Nanopartículas Poliméricas Inertes
NPs	Nanopartículas Poliméricas
PCL	Poli (ϵ – caprolactona)
PDI	Índice de Polidispersão
PZ	Potencial Zeta
VDR	Receptor Nuclear da Vitamina D
TGA	Análise Termogravimétrica
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
UV	Ultravioleta
UVB	Ultravioleta B
1 α ,25(OH)2D3	1 α ,25 dihidroxivitamina D3 ou Calcitriol
25OHD3	25-hidroxivitamina D, Calcidiol ou Colecalciferol

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	15
2.	REVISÃO DA LITERATURA.....	17
2.1	VITAMINA D.....	17
2.1.1	Estrutura e Características Físico-Químicas da Vitamina D.....	17
2.1.2	Metabolismo da Vitamina D.....	19
2.1.3	Hipovitaminose D.....	20
2.1.4	Tratamento da Hipovitaminose D.....	22
2.1.5	Ação da Vitamina D.....	23
2.1.5.1	Ossos e músculos.....	24
2.1.5.2	Gravidez.....	24
2.1.5.3	Sistema cardiovascular.....	24
2.1.5.4	Câncer.....	25
2.1.5.5	Diabete Mellitus.....	25
2.1.5.6	Dermatite atópica (DA).....	25
2.1.5.7	Permanência de pacientes em UTI.....	26
2.2	VIATRANSDÉRMICA.....	26
2.2.1	Estratégias para Aumentar a Permeação Cutânea.....	28
2.2.2	Permeação <i>in vitro</i> de Produtos Transdérmicos.....	29
2.3	Nanotecnologia.....	30
2.3.1	Nanotecnologia Farmacêutica.....	31
2.3.2	Nanopartículas Poliméricas.....	32

2.3.3	Polímeros.....	33
2.3.4	Poli (ϵ -caprolactona) - PCL.....	34
2.3.5	Nanotecnologia Aplicada a Sistemas Transdérmicos.....	35
3	OBJETIVOS.....	37
3.1	OBJETIVO GERAL.....	37
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	37
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	38
4.1	EQUIPAMENTOS.....	38
4.2	REAGENTES E SOLVENTES.....	38
4.3	OUTROS MATERIAIS.....	39
4.4	DESENHO EXPERIMENTAL.....	40
4.5	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	40
4.5.1	Obtenção da Suspensão das Nanopartículas Poliméricas.....	40
4.5.2.	Caracterização das Suspensões de Nanopartículas Poliméricas.....	42
4.5.2.1	Determinação do pH.....	42
4.5.2.2	Determinação do diâmetro médio das nanopartículas, do índice de polidispersão (PDI) e do potencial zeta (PZ).....	42
4.5.2.3	Análises morfológicas e de superfície por microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (<i>Field Emission Gun Scanning Electron Microscopy</i> – FEG).....	43
4.5.2.4	Análise por difração de raios X.....	43
4.5.2.5	Avaliação por espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (IVTF).....	43

4.5.2.6	Análise térmica.....	44
4.6	DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE).....	44
4.6.1	Equipamentos e Condições Cromatográficas.....	46
4.6.2	Preparo das Soluções Padrão.....	45
4.6.3	Validação do Método para a Quantificação do Colecalciferol Incorporado às Nanopartículas.....	45
4.6.4	Análise Estatística da Validação do Método Analítico por CLAE.....	46
4.7	DETERMINAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO (EE)	47
4.8	ESTUDO DE ESTABILIDADE.....	48
4.9	ESTUDO “in vitro” DE PERMEAÇÃO CUTÂNEA A PARTIR DE NANOPARTÍCULAS DE COLECALCIFEROL.....	48
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	50
5.1	OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARA TRIAGEM DAS SUSPENSÕES DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS.....	50
5.2	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA POR EMISSÃO DE CAMPO de campo (FEG-SEM).....	53
5.3	DIFRAÇÃO DE RAIOS X.....	54
5.4	ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (IVTF)...	57
5.5	ANÁLISE TÉRMICA.....	61
5.6	DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO DE QUANTIFICAÇÃO DO COLECALCIFEROL POR CLAE.....	63

5.6.1	Validação do Método Analítico.....	64
5.6.1.1	Especificidade.....	64
5.6.1.2	Linearidade.....	65
5.6.1.3	Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ).....	67
5.6.1.3	Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ).....	67
5.6.1.3	Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ).....	67
5.6.1.4	Precisão.....	67
5.6.1.5	Exatidão.....	67
5.6.1.6	Robustez.....	68
5.7	DETERMINAÇÃO DO TEOR DO COLECALCIFEROL NAS NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS E EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO.....	68
5.8	ESTUDO DE ESTABILIDADE DAS SUSPENSÕES DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS.....	69
5.9	PERMEAÇÃO CUTÂNEA.....	72
6	CONCLUSÕES.....	75
	REFERÊNCIAS.....	76

1INTRODUÇÃO

A nanotecnologia é um campo multidisciplinar e devido ao seu enorme potencial de aplicações tem atraído o interesse de inúmeras áreas de pesquisa em todo o mundo, com resultados de grande impacto no desenvolvimento tecnológico e econômico.

As tecnologias de liberação controlada de fármacos representam uma das áreas mais promissoras das ciências farmacêuticas. A nanotecnologia farmacêutica compreende a pesquisa e o desenvolvimento de sistemas nanoestruturados com objetivo de veicular substâncias com potencial terapêutico e aumentar a eficácia dos fármacos no organismo através de liberação controlada ou direcionada, oferecendo inúmeras vantagens quando comparadas com sistemas tradicionais de formas farmacêuticas (SOUTO; MULLER, 2008). Entretanto, alguns desafios ainda devem ser superados para que a nanotecnologia possa realmente cumprir seu papel nos contextos socioeconômico e tecnológico mundial.

A vitamina D é um composto lipossolúvel de origem vegetal (vitamina D₂ ou ergocalciferol) ou animal (vitamina D₃ ou colecalciferol), que é responsável principalmente pela manutenção do equilíbrio do metabolismo ósseo (DELUCA, 2004). Atua em mais de 200 genes (MOCELLIN, 2011), apresenta ação não-calcêmica na homeostase e metabolismo extra-ósseo (NORMAN, 2006).

Sabe-se que a deficiência de vitamina D já tomou proporções epidêmicas em diversas partes do mundo, atingindo as mais variadas idades, raças e classes econômicas (HOLICK, 2004). Vários fatores influenciam os níveis séricos deficientes da vitamina D como: envelhecimento, pigmentação cutânea, tempo de exposição solar, latitude e uso de bloqueador solar (HOLICK et al., 2011). A sua deficiência desencadeia diversas patologias, como por exemplo: o comprometimento do metabolismo ósseo (HOLICK, 1994), probabilidade do indivíduo desenvolver diabetes mellitus (RAAB et al., 2014), doenças cardiovasculares, alguns tipos específicos de câncer (DOBNIG et al., 2008), maior permanência de pacientes em Unidade de Terapia Intensiva (HIGGINS et al., 2012), complicações gestacionais (MULLIGAN et al., 2010), dentre outras patologias.

A manutenção de níveis séricos adequados de vitamina D pode ser obtida por ingestão de alimentos que contenham esta vitamina, entretanto estudos comprovam que a quantidade ingerida diariamente não supre as necessidades para manter os

níveis séricos suficientes (PEDROSA; CASTRO, 2005). Outra forma mais eficaz de manutenção da vitamina D é a exposição da pele aos raios solares, sendo que o tempo de exposição e a proporção do corpo expostas aos raios solares, para que ocorra uma síntese cutânea adequada da vitamina, são questões difíceis de serem definidas (HOLICK, 2007). A reposição através de medicamentos por via oral também é uma alternativa muito utilizada atualmente (PREMAOR; FURLANETTO, 2006), mas muitos pacientes não aderem ao tratamento devido ao paladar desagradável, esquecimento e/ou desconforto estomacal. A utilização de sistemas terapêuticos transdérmicos, é uma estratégia utilizada para facilitar à penetração e a absorção do fármaco através da pele, com objetivo de atingir níveis adequados na circulação sanguínea para exercer efeitos sistêmicos (FÖRSTER et al., 2009).

A administração tópica do colecalciferol nanoencapsulado é uma alternativa para a reposição deste hormônio, por oferecer maior comodidade ao paciente e melhor à adesão ao tratamento. Além do que, a nanoencapsulação tende a proteger o fármaco contra a hidrólise, oxidação, fotólise e umidade, mantendo o produto estável (LUO; TENG; WANG, 2012).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 VITAMINA D

A vitamina D foi descoberta em 1920, sendo considerada importante para a homeostase do cálcio, particularmente no intestino e nos ossos. Em 1969, o receptor nuclear da vitamina D (VDR) foi descoberto, impulsionando inúmeros estudos sobre sua influência no sistema endócrino, e sua ação não-calcêmica na homeostase e metabolismo extra-ósseo (NORMAN, 2006).

A vitamina D tem efeitos pleiotrópicos em uma variedade de doenças não esqueléticas. Estudos demonstraram que cerca de 3% do genoma humano é regulado de uma maneira direta ou indireta pelo sistema endócrino da vitamina D, confirmando sua ampla gama de ações no organismo (BOUILLON et al., 2008).

Está comprovado que adequadas concentrações séricas da vitamina D têm sido associadas à redução significativa do risco de desenvolvimento de diversos tipos de câncer (próstata, ovário, esôfago, estômago, cólon, reto, vesícula biliar, pâncreas, pulmão, mama, útero, bexiga, rim, pele, tireoide, sistema hematopoiético) (DELUCA, 2004), infecções bacterianas, artrite reumatoide, doença de Crohn, doenças periodontais, esclerose múltipla, asma, diabetes mellitus tipo 1 e 2, síndrome metabólica, acidentes vascular cerebral, doenças periféricas, doenças cardiovasculares, hipertensão (DOBNIG et al., 2008), doença renal crônica, tuberculose, infecções virais (CHESNEY, 2010), comprometimento cognitivo, doença de Alzheimer, depressão e morte prematura (GLADE, 2013). Além de todas estas patologias às quais a vitamina D está associada, estudos demonstraram que a deficiência desta vitamina aumenta a morbidade e a mortalidade de pacientes de Unidade de Terapia Intensiva (UTI) (HIGGINS et al., 2012).

2.1.1 Estrutura e Características Físico-químicas da Vitamina D

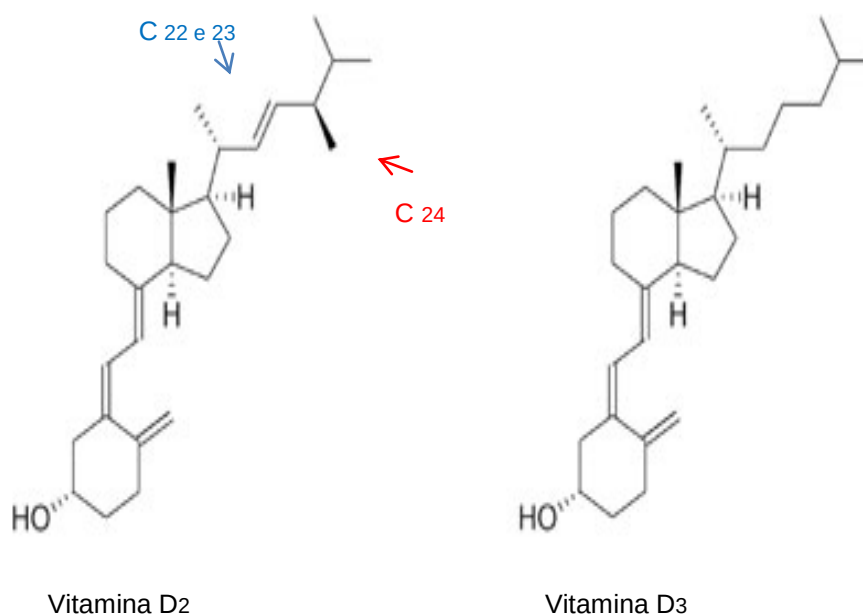
A vitamina D apresenta-se sob duas formas: vitamina D₂ ou ergocalciferol, encontrada em alguns alimentos como, por exemplo: cogumelos *shitake*, salmão, produtos lácteos e cereais fortificados, gema de ovo, entre outros (PEREIRA; ALMEIDA, 2008); vitamina D₃ ou colecalciferol, que é sintetizada na pele após a

exposição à luz solar. Os raios solares ultravioleta (UV) convertem a pró-vitamina D3 em coledalciferol (HOLICK, 1981).

De acordo com IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*), os nomes oficiais da vitamina D são para a vitamina D2: 9,10 seco (5Z,7E)-5,7,10(19)22-ergostatetraeno-3 β -ol e para a vitamina D3 é 9,10 seco(5Z,7E)-5,7,10(19)-colestratrieno-3 β -ol (PENTEADO, 2003).

As estruturas das vitaminas D2 e D3 são muito semelhantes. A vitamina D2 possui um grupo metil no carbono 24, e uma dupla ligação entre os carbonos 22 e 23, o que não ocorre na vitamina D3. Além de apresentar um carbono a mais, pois possui 28 carbonos na sua estrutura comparado com a vitamina D3 (CASTRO, 2011; OKAMURA, et al., 1995) (Figura 1).

Figura 1 - Diferenças entre as fórmulas esteroquímicas das vitaminas D2 e D3.



Fonte: Castro, 2011.

A fórmula estrutural da vitamina D3 é C₂₇H₄₄O, massa molecular de 384,6 g/mol e ponto de fusão de 84,5 °C. Facilmente solúvel em etanol, acetona, gorduras, óleos, benzeno, clorofórmio e éter (BALL, 1988). Em água, sua solubilidade é estimada em torno de 1,3x10⁻⁵ mg/dL, a 25 °C (MEDEIROS, 2013). As características físicas das vitaminas (D2 e D3), quando puras, apresentam-se sob a forma de pequenos cristais brancos amarelados e sem odor (BALL, 1998).

Esta vitamina é muito sensível a fatores ambientais como luz, calor, oxigênio, podendo isomerizar ou oxidar rapidamente, afetando sua estrutura química e os benefícios fisiológicos (LUO; TENG; WANG, 2012).

2.1.2 Metabolismo da Vitamina D

A vitamina D obtida pela dieta, fármacos ou cutânea, é biologicamente inerte, para que se possa tornar ativa é necessário que ocorra a hidroxilação no fígado formando a 25-hidroxivitamina D e logo na sequência outra hidroxilação no rim, resultando na forma ativa da vitamina D, o 1,25-dihidroxivitamina D (REICHRATH, 2007).

A vitamina D₂, quando ingerida, é absorvida no intestino delgado sendo incorporada em quilomícrons e transportada até o fígado pela corrente sanguínea. A vitamina D₃ é sintetizada na pele, transportada na corrente sanguínea até o fígado, onde serão iniciadas as reações químicas (HOLICK et al., 2011).

Nos fibroblastos da derme ou queratinócitos da epiderme, o 7-desidrocolesterol é convertido pela ação dos raios Ultravioleta B (UVB) de comprimento de onda entre 290 nm e 315 nm (ASHWELL et al., 2010; PREMAOR; FURLANETTO, 2006). A pré-vitamina produzida forma homodímeros em aproximadamente 24 horas transforma-se em colecalfiferol (SUNN et al., 2001), sendo o metabólito majoritário da vitamina D no organismo. Os níveis séricos deste metabólito são utilizados para avaliação da concentração da vitamina D no organismo (HOLICK, 2007).

Ao entrar na corrente sanguínea a vitamina D₃ se liga α -proteína, chamada Proteína Ligadora da vitamina D (PREMAOR; FURLANETTO, 2006). No fígado, ocorre a hidroxilação no carbono 25, que é mediada pela enzima 25-hidroxilase, em que o colecalfiferol é convertido em 25(OH)D₃ ou calcidiol (PROSSER; JONES, 2004). O metabólito 25(OH)D₃ não possui atividade biológica necessária para realizar as funções da vitamina D, portanto é necessário que ocorra uma nova reação química. Este metabólito retorna a corrente sanguínea, onde é transportado até os rins, que é o principal órgão ativador da vitamina D. Pela ação da enzima vitamina D₃-1 α -hidroxilase, a 25(OH)D₃ é metabolizada em 1 α ,25-dihidroxivitamina D₃ ou calcitriol, que é a forma biologicamente ativa da vitamina D (GODAR et al., 2012; PROSSER; JONES, 2004; PEREIRA; ALMEIDA, 2008; PREMAOR;

FURLANETTO, 2006), e no metabólito inativo hidrossolúvel, a 24,25(OH)₂D (ácido calcitróico) que é excretado pela bile, através da ação da enzima 24 α -hidroxilase (DELUCA et al., 2004). Após estes processos biológicos, a 1,25(OH)₂D₃ é transportada para seus principais tecidos alvo (HOLICK, 2004).

A regulação da produção do calcitriol é dependente dos níveis baixos de cálcio e fósforo que estimulam sua produção, o paratormônio tende a subir seus níveis séricos quando a 25(OH)D₃ está em concentração baixa, provocando um aumento de calcitriol (LEVINE, 2003).

2.1.3 Hipovitaminose D

Inúmeros fatores afetam a produção da vitamina D pelo organismo. As mudanças no estilo de vida ocorridas nas últimas décadas são uma das principais explicações da carência vitamínica (ZITTERMANN et al., 2013). Além disso, em determinados horários (no início da manhã e no final da tarde) a exposição solar pode não gerar a síntese de vitamina D cutânea, devido à baixa incidência de raios solares (HOLICK, 2004).

A utilização e os benefícios do uso do filtro solar estão atualmente confrontando com a deficiência de vitamina D na população (MESQUITA et al., 2013), pois uma das suas funções é absorver a radiação UVB, mas com esta ação a produção de vitamina D fica prejudicada (MATSUOKA et al., 1987).

Indivíduos que possuem pele mais pigmentada necessitam de um tempo maior de exposição solar, isto está relacionado à melanina que atua como protetor solar natural reduzindo a produção de vitamina D na pele humana (ARABI et al., 2010; HOLICK et al., 2011).

Os idosos tem um aumento da vulnerabilidade à deficiência de vitamina D, o envelhecimento pode diminuir a capacidade da pele em produzir os precursores necessários para a síntese da vitamina D (HOLICK, 2007). Ainda, geralmente possuem uma menor exposição aos raios solares, além da má absorção devido às alterações na adiposidade, problemas digestivos, uso de certos medicamentos e comprometimento da função renal que pode levar a redução da síntese de calcitriol (CHERNIACK et al., 2008; GLOTH et al., 1995; HOLICK, 2007).

Alguns medicamentos: anticonvulsivantes, glucocorticóides, corticosteroides e rifampicina, podem aumentar o catabolismo da vitamina D ou diminuir sua absorção,

quando utilizado em longo prazo, o que pode causar hipovitaminose D (DEPLAS; DEBIASIS; ALCALAY, 2004).

Pacientes que possuem a síndrome nefrótica, tendem a apresentarem hipovitaminose devido a sua perda da proteína de ligação da vitamina D pela urina (HOLICK, 2007). Pacientes que apresentam alguns linfomas, hiperparatireoidismo e doenças granulomatosas possuem um aumento do metabolismo 25(OH)D₂ para 1,25(OH)₂D₃ (HOLICK et al., 2011; GREY et al., 2005).

A hipovitaminose D é considerada um problema de saúde pública mundial (MITHAL et al., 2010). Na tabela 1, pode-se observar alguns dados epidemiológicos em vários países, faixa etária e a percentagem de hipovitaminose.

Tabela 1: Epidemiologia da hipovitaminose D em várias faixas etárias, percentagens e localização mundial.

Localização	Público alvo	Ano	Percentagem de hipovitaminose (%)	Referências
China	Mulheres grávidas	2013	54,5 %	Song et al., 2013
Polônia	Mulheres saudáveis idade média 69 anos	2009	96%	Napiórkowska et al., 2009
Espanha	Jovens saudáveis idade média 27 anos	2009	83,6%	Calatayud, et al., 2009
Itália	Jovens idade entre 10 e 21	2014	82,2%	Vierrucini et al., 2014
Continente Africano	Mulheres com fraturas de vertebrae	2012	85,3%	El Maghraoui et al., 2012
Argentina	Idosos saudáveis	2004	98%	Oliveri et al., 2010
Guatemala	Idosos saudáveis	2010	96,3%	Sud et al., 2010
Brasil Minas Gerais	Adolescentes	2014	71%	Oliveira et al., 2014

Dados estatísticos estimam que um bilhão de pessoas em todo o mundo sejam acometidas (HOLICK, 2007). Muitos casos não são diagnosticados nem tratados adequadamente, ocasionando o que se chama de epidemia oculta (DAWSON-HUGHES et al., 2010). De acordo com dados apresentados na tabela

acima, podemos verificar a alta percentagem da hipovitaminose D, em várias faixas etárias e localização mundial, sendo considerada uma pandemia.

2.1.4 Tratamento da Hipovitaminose D

O colecalciferol ou vitamina D₃, é o metabólito que tem se mostrado mais efetivo para o tratamento e suplementação da hipovitaminose D. O ergocalciferol ou vitamina D₂, também pode ser usado como suplemento, mas possui a desvantagem de sua meia-vida mais rápida, consequentemente a posologia deverá ser diária. O colecalciferol tem a opção de posologia semanal, por apresentar sua meia-vida mais prolongada (GEMAR et al., 2011).

As quantidades de vitamina D são apresentadas como Unidade Internacional (UI), sendo que 40 UI equivale a 1 µg. A Tabela 2 apresenta as doses de manutenção diárias de vitamina D, de acordo com a faixa etária, para a população geral e para a população de risco de hipovitaminose D, de acordo com o *Institute of Medicine* (2011).

Tabela 2 - Doses de manutenção diárias de colecalciferol recomendadas para população geral e para população de risco para deficiência.

Faixas etárias	População geral (UI)	População de risco (UI)
0 – 12 meses	400	400 – 1.000
1 – 8 anos	400	600 – 1.000
9 – 18 anos	600	600 – 1.000
19 – 70 anos	600	1.500 – 2.000
> 70 anos	800	1.500 – 2.000
Gestantes 14 – 18 anos	600	600 – 1.000
Gestantes > 18 anos	600	1.500 – 2.000
Lactantes 14 – 18 anos	600	600 – 1.000
Lactantes > 18 anos	600	1.500 – 2.000

Fonte: Adaptada com base nas tabelas nutricionais do *Institute of Medicine* (2011).

A população de risco para deficiência de vitamina D inclui as crianças que são amamentadas ao seio sem suplementação ou exposição solar adequada, indivíduos pele mais pigmentada, insuficiência renal, síndrome nefrótica, uso de alguns medicamentos, obesidade, entre outras (MISRA et al., 2008).

Para indivíduos que apresentam hipovitaminose D com níveis séricos abaixo de 20 ng/dL deve ser realizado uma reposição do colecalciferol de ataque. A indicação para aumentar estes níveis é de uma dosagem de 50.000 UI/semana ou 7.000 UI/dia, estas doses devem ser administradas durante 6 a 8 semanas. Após este período um novo ciclo de ataque poderá ser necessário, caso os níveis de 25(OH)D₃ não forem atingidos. A cada ciclo, os valores séricos devem ser avaliados, devido à variação individual. Quando são atingidos os níveis plasmáticos, deve seguir uma dosagem de manutenção de acordo com a faixa etária e condições individuais de acordo com a tabela 2. Pacientes que possuem problemas de má-absorção digestiva, obesos e pacientes que utilizam anticonvulsivantes as dosagens poderão ser duas a três vezes maiores (HOLICK et al., 2011).

Na administração de vitamina D oral, 10.000 UI/dia, durante cinco meses, estudos comprovam que esta dosagem não causa toxicidade aos pacientes, que seria a hipercalcemia e hipercalciúria (HEANEY et al., 2003). São consideradas tóxicas concentrações de vitamina D superior a 90 ng/mL, sendo dificilmente alcançadas esta dosagem (VIETH, 1999), podendo ocorrer alguns casos raros, como por exemplo, doenças granulomatosas (sarcoidose, tuberculose e infecções fúngicas crônicas), alguns linfomas, em crianças com a Síndrome de Williams (HOLICK, et al.; 2011). A pré-vitamina D₃ é considerada uma molécula vulnerável a isomerização, originando o luminosterol e taquisterol, que são produtos biologicamente inativos, esta produção é importante para evitar a superprodução da vitamina D quando o indivíduo fica exposto por um tempo muito prolonga a radiação solar (MARQUES et al., 2010).

2.1.5 Ação da Vitamina D

As funções exercidas pelo colecalciferol ocorrem devido a sua ligação a VDR, que regulam a transição do DNA em RNA. O VDR é expresso em diversos tipos de células do organismo. Sua principal função esta relacionada à manutenção da homeostase do cálcio e do fósforo no metabolismo dos ossos e reabsorção renal de cálcio. Inúmeras células e tecidos no organismo possuem receptores de vitamina D, portanto, ela é considerada de extrema importância ao funcionamento normal do organismo (HOLICK, 1994). Algumas das principais ações da vitamina D estão descritas resumidamente abaixo:

2.1.5.1 Ossos e músculos

Uma das principais e mais conhecidas ações da vitamina D está relacionada ao controle da homeostase do cálcio e no metabolismo ósseo. Está envolvida na formação dos ossos, na reabsorção do cálcio, na mineralização e na manutenção das funções neuromusculares. A importância da vitamina D nos ossos e músculos está relacionada desde a formação do esqueleto durante a infância e adolescência, até a fase adulta, e, principalmente, nos idosos por evitar a perda excessiva de massa óssea (HOLICK, 1994).

2.1.5.2 Gravidez

Níveis adequados de colecalciferol durante a gravidez podem prevenir o nascimento prematuro, reduzir as infecções bacterianas através da indução da catelicidina em muitos tecidos, inclusive das células fetais e a placenta (HEWISON, 2011; LIU; HEWISON, 2012), bem como diminuir a pré-eclâmpsia, resistência à insulina, diabetes gestacional, vaginose bacteriana e parto cesáreo (MULLIGAN et al., 2010).

A deficiência da vitamina D durante a gestação pode afetar o recém-nascido, causando o raquitismo congênito, crânio tabes ou osteopenia (MULLIGAN et al., 2010). Nas primeiras 6-8 semanas de vida, o recém-nascido mantém os níveis séricos do colecalciferol que foi transferido pela placenta no útero materno e a concentração tende a diminuir a partir da oitava semana (HILLMAN, et al. 1974).

2.1.5.3 Sistema cardiovascular

A ação da vitamina D no sistema cardiovascular é devido a diversas localizações do VDR, incluindo o coração, paredes vasculares, rins e nas células imunes (HAUSSLER et al., 1998). O colecalciferol exerce diversos efeitos protetores contra doenças cardiovasculares, inibe várias etapas da inflamação (TIMMS et al., 2002), exerce efeitos anti-proliferativo e anti-hipertrófico das células miocárdicas, que são responsáveis pela insuficiência cardíaca congestiva, além de atuar como regulador da resposta à lesão endotelial, atuando como regulador endócrino negativo no sistema renina-angiotensina-aldosterona, sendo importante na

hipertensão (LI et al., 2002). Está envolvida na regulação da coagulação, diminuindo a formação de trombos e a atividade do fator tecidual (MATHIEU; ANDORINI, 2002).

2.1.5.4 Câncer

A vitamina D tem capacidade de afetar direta ou indiretamente a expressão de mais de 200 genes envolvidos na regulação do crescimento celular, no desenvolvimento de apoptose e na inibição dos processos de angiogênese e inflamação, assegurando um potencial anticarcinogênico (BOUILLON et al., 2006; MOCELLIN, 2011).

A expressão do VDR na maioria das células e mecanismos enzimáticos que produzem formas ativas da vitamina D tem mostrado evidências na patogenia de alguns cânceres. Diversas são as células em que o VDR está presente: mama, placenta, útero, testículos, próstata, coração, cérebro, fígado, células ósseas, renais e intestinais, células do sistema imune e sistema endócrino (DELUCA, 2004).

2.1.5.5 Diabetes Mellitus

O mecanismo biológico relacionados com a interação da vitamina D com a predisposição para o desenvolvimento do Diabetes Mellitus tipo 1 e Diabetes Mellitus tipo 2, ainda não estão completamente elucidados. Estudos atuais sugerem que o colecalciferol apresenta ação direta e indireta na homeostase glicídica, atuando nas células β -pancreáticas, as quais expressam a enzima 1α -hidroxilase e o receptor VDR (RAFAELLI et al., 2015). No tecido pancreático está presente o VDR e proteínas ligadoras de cálcio dependente de vitamina D, sabe-se que o desenvolvimento de Diabetes Mellitus tipo 2 envolve alterações na função das células β -pancreáticas e resistência à ação da insulina, onde a vitamina D pode atuar neste mecanismo (BLAND et al., 2004).

2.1.5.6 Dermatite atópica (DA)

Em conjunto com estratégias para minimizar os sintomas da Dermatite Atópica, está sendo sugerida a suplementação de vitamina D, pois estudos apontam efeitos imunomoduladores causado pelo colecalciferol (MAEDA et al., 2014).

Em pacientes com DA, a vitamina D está relacionado com a produção e o funcionamento de catelicidina, substância que esta envolvida diretamente com a resposta imunológica aos antígenos, como vírus, bactérias e fungos. Agindo sinergicamente com mediadores inflamatórios endógenos, sendo considerada fundamental para a defesa do hospedeiro contra infecções cutâneas e aumentando da secreção de moléculas sinalizadoras de células imunológicas ativadas (YU et al., 2007).

2.1.5.7 Permanência de pacientes em UTI

A suplementação pré-operatória de vitamina D em pacientes que serão submetidos a cirurgias eletivas, é uma opção a ser investigada. Níveis plasmáticos diminuídos de vitamina D estão associados diretamente com um maior tempo de internamento de paciente na UTI, aumentando o risco de infecção adquirida nesta unidade (HIGGINS et al., 2012).

Pacientes internado em UTI, geralmente recebem grande volume intravenoso, diminuindo os níveis de vitamina D sérica. Além do estresse ser considerado um fator que influencia na diminuição da vitamina D (ZEHNDER et al., 2008).

2.2 VIA TRANSDÉRMICA

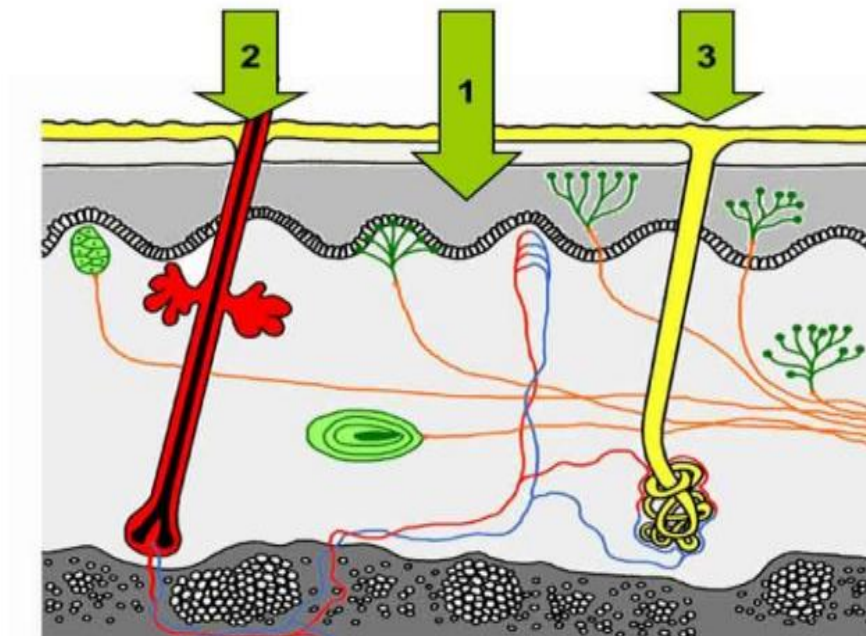
A via transdérmica oferece inúmeras vantagens quando comparadas com outras vias de administração de fármaco, pois aumenta claramente os benefícios clínicos e adesão ao tratamento (PAUDEL et al., 2010), impede a ocorrência do efeito de primeira passagem do fármaco, evita problemas gastrointestinais, minimiza o risco de surgimento de efeitos adversos ou nível subterapêutico, além de apresentar facilidade em suspender o tratamento quando surgem reações adversas (SILVA et al., 2010). Pode ser utilizada para diversas finalidades como: cosmética, dermocosmética ou farmacológica. Suas aplicações podem ser superficiais, dérmicas ou alcançar níveis sistêmicos (FÖRSTER et al., 2009).

Devido a sua grande superfície e por apresentar fácil acesso, a pele é considerada uma via de administração de fármacos de grande importância (MANCINI, 2014).

A absorção percutânea é a forma com que o fármaco atravessa as camadas da pele e alcança as correntes sanguínea e linfática. Pode ser dividida em penetração, permeação e absorção. A penetração é a entrada do fármaco até uma determinada camada da pele, já a permeação é a entrada do fármaco através de várias camadas com determinadas características funcionais e estruturais, e por fim a absorção é quando o princípio ativo atinge a corrente sanguínea (KIELHORN, et al., 2006).

As principais vias de permeação cutânea (Figura 2) são: apêndices cutâneos (glândulas sebáceas, folículos pilosos e glândulas sudoríparas) e via transepidérmica que é subdividida em intracelular e transcelular (JEPPS et al, 2013).

Figura 2: Vias para penetração de moléculas através da pele



1 – via transepidérmica; 2 – apêndice cutâneo – folículo piloso; 3 – apêndice cutâneo -glândula sudorípara

Fonte: Adaptada de Vieira, 2007.

A via anexial permite a penetração através dos anexos cutâneos (glândulas sudoríparas, folículos pilosos e glândulas sebáceas), apresenta uma penetração rápida de substâncias devido à superfície da epiderme ser permeável nestes locais, facilitando a permeação do fármaco (VIEIRA, 2007).

Na via transcelular, os compostos polares atravessam as membranas das células encontrando um meio hidrofílico. Na via intercelular, os compostos apolares, pela afinidade lipídica, difundem-se ao longo dos espaços intercelulares com uma

penetração mais lenta, é considerada a principal via de passagem, embora muitas moléculas atravessem a camada córnea por ambas (MOZER, 2001; VIEIRA, 2007).

Para que o fármaco alcance o nível sistêmico, é necessário que a formulação apresente características capazes de permear o estrato córneo e alcançar a derme (FÖRSTER et al., 2009). A permeação cutânea depende de alguns fatores, em especial das propriedades físico-químicas do fármaco de acordo com seu caráter lipofílico ou hidrofílico (CHORILLI et al., 2007) e da pele (espessura, temperatura, grau de hidratação, irrigação sanguínea, concentração lipídica, pH, integridade do estrato córneo e a atividade das glândulas sudoríparas e sebáceas) (SILVA et al., 2010).

2.2.1 Estratégias para Aumentar a Permeação Cutânea

Para que os ativos ultrapassem as barreiras e permeiem a pele se faz necessário o desenvolvimento de estratégias adequadas.

Alterar a função barreira da pele é uma estratégia utilizada uma vez que ocorre um aumento da sua permeabilidade aos ativos. Uma opção é a promoção da hidratação do estrato córneo; outra possibilidade é a alteração da estrutura lipídica do estrato córneo com a introdução de promotores de absorção como álcoois, ácidos e terpenos, os quais interagem com os lipídios, induzindo a abertura de poros resultando na passagem de moléculas polares (FÖRSTER et al., 2009; ANIGBOGU et al., 1995). Entretanto, existe uma grande desvantagem na incorporação destes produtos na formulação, uma vez que podem provocar irritação cutânea, devido ao seu mecanismo de alteração do estrato córneo (PAUDELet al., 2010).

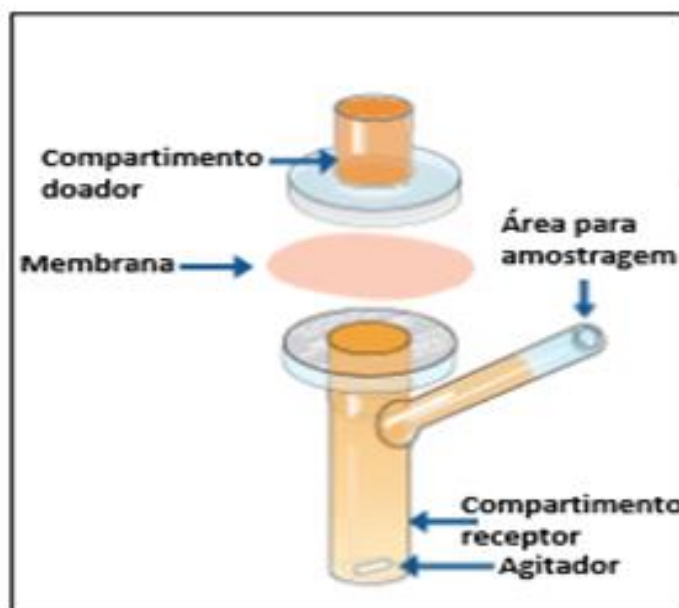
Uma estratégia que está sendo muito utilizada é o desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos, como as nanopartículas, microemulsões, nanoemulsões, lipossomas e ciclodextrinas. Esta tecnologia pode ser considerada uma excelente opção para a liberação tópica de fármacos, pois além de manter a estrutura molecular do fármaco, apresentam tamanho nanométricos com elevada área superficial, o que os torna promissores carreadores de fármacos para aplicações farmacêuticas. Resultando em um aumento significativo na biodisponibilidade além de poder ser desenvolvido para direcionar o fármaco diretamente no tecido ou órgão alvo (ZHAO et al, 2009).

2.2.2 Permeação *in vitro* de Produtos Transdérmicos

Para que possa ser comprovada a liberação do fármaco, a sua penetração nas camadas da pele e a sua ação sistêmica, após a aplicação tópica, estudos devem ser realizados para caracterizar o processo de difusão e permeação (SATO et al., 2007).

Célula vertical de difusão (Figura 3) é o modelo mais empregado para a realização do teste *in vitro* para permeação cutânea. Esta é composta de: compartimento doador (onde o fármaco é depositado), compartimento receptor (solução na qual o fármaco será difundido), e a membrana (que tem a função de barreira de absorção). O fármaco é aplicado na parte superior da membrana, no compartimento doador. É realizado um monitoramento da passagem do fármaco pela membrana no compartimento receptor, analisando a quantidade de fármaco que permeou em tempos diferentes (FRANZ, 1975).

Figura 3 - Esquema representativo da célula vertical de difusão



Fonte: SILVA et al., 2010

Para o estudo da permeação cutânea, pode ser utilizar membranas sintéticas, animal e humana. A pele humana deve ser preferida sempre que disponível, devendo estar íntegra e possuir o mínimo de vasos sanguíneos e gorduras (HENNING; SCHAEFER; NEUMANN, 2009). Na falta da pele humana, membranas animais podem ser utilizadas (suína, cobra, ratos, primatas, porco da índia)

(TOUITOU et al.; 1998). Sendo que, a pele suína é a que fisiologicamente mais se assemelha a pele humana, além da vantagem em relação a outras peles da facilidade de obtenção (SARTORELLI et al., 2000).

A temperatura esta intimamente relacionada à permeação, podendo afetar o processo de absorção, o fluido receptor deve permanecer a $32^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, correspondendo à temperatura da pele humana. Os sistemas *in vitro* utilizam um banho-maria ou um aquecedor de bloco sólido para manter o sistema na temperatura adequada. Não sendo necessário verificar a temperatura superficial da pele (OECD, 2004).

A solução receptora deverá estar em condições *sink* (meio de dissolução com concentração do fármaco equivalente até 10% da concentração de saturação) (KUU et al., 1989); deverá estar em constantemente agitação, a temperatura e a umidade devem ser controladas (OECD, 2004).

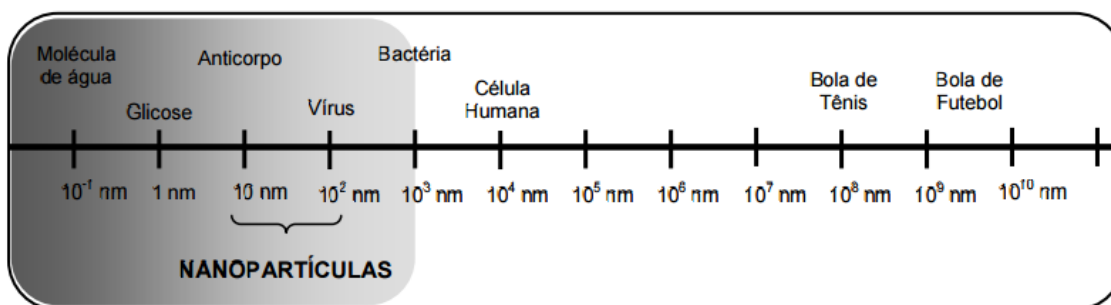
A escolha adequada da solução receptora varia de acordo com a característica lipofílico ou hidrofílico do fármaco. De acordo com OECD n° 428 (2004), a solubilidade do fármaco deve ser testada, evitando que a solução receptora se torne um fator limitante para o transporte do fármaco. Um tampão fosfato salino (PBS, pH 7,0 e 7,4) é o mais comumente utilizado. Diversos estudos utilizam outras soluções receptoras, quando o fármaco é insolúvel em água, a utilização de tensoativo ou solventes orgânicos é comumente utilizada para garantir a solubilidade adequada para a manutenção da condição *sink* (LIRA et al., 2004).

2.3 NANOTECNOLOGIA

Atualmente a nanotecnologia vem sendo aplicada em diversas áreas: microeletrônica, suplementos fotográficos, desenvolvimentos de ossos sintéticos, próteses dentárias, componentes automotivos, equipamentos esportivos, revestimentos de fibra óptica, neutralizadores de produtos químicos nocivos, cosméticos, medicamentos, entre outros (MEJIAS et al., 2009; BUZEA; BLANDINO; ROBBIE, 2007) e compreende a manipulação de materiais em escala nanométrica.

As nanopartículas são partículas de tamanho inferior a 1000 nm (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010). Na figura 4, uma representação da escala nanométrica de algumas estruturas em nanômetros.

Figura 4: Representação da escala nanométrica



Fonte: Buzea; Blandino; Robbie, 2007.

Muitos estudos relacionados à nanotoxicidade foram realizados observando os danos celulares que nanopartículas podem exercer nas células, devido ao seu acúmulo dentro das mesmas. Esta nanotoxicidade é dependente do local do contato, da dosagem e do tamanho das nanopartículas. Foi proposto que nanopartículas inferiores a 100 nm apresentam maior toxicidade e maior tempo de retenção intracelular, sendo, porém, mais tóxicas (BUZEA et al., 2007). Entretanto, mesmo existindo risco de toxicidade, as aplicações da nanotecnologia em vários ramos da ciência, principalmente na área da saúde, acabam por melhorar a qualidade de vida das pessoas. Existe uma grande expectativa em relação ao desenvolvimento de novos meios de diagnósticos e tratamentos mais eficazes (MEJIAS et al., 2009; BUZEA; BLANDINO; ROBBIE, 2007).

2.3.1 Nanotecnologia Farmacêutica

A nanotecnologia farmacêutica surgiu em 1960 com a técnica de transformação de líquidos em pós com tamanhos de partículas micrométricas. A microencapsulação já apresentava um vasto potencial em diversas áreas, como, por exemplo, alimentícia, têxtil e cosmética. Somente no final da década de 1960, que Peter Speiser desenvolveu as primeiras nanopartículas na área farmacêutica, com objetivo inicial de produção de vacinas e não visando a liberação de fármacos, o que é amplamente utilizada na atualidade (KREUTER, 2007).

Ainda, está relacionada ao desenvolvimento, caracterização e aplicação de sistemas de liberação de fármacos em escala nanométrica ou micrométrica (SAKATA et al., 2007). Compreende diferentes sistemas nanoestruturados como: nanopartículas poliméricas, nanopartículas lipídicas sólidas, lipossomas e nanoemulsões (LU et al., 2004).

O tamanho subcelular destas estruturas permite uma maior ação intracelular se comparada a outros sistemas particulados (ABDEL-MOTTLEB; NEUMANN; LAMPRECHT, 2010).

Desta forma, a nanotecnologia farmacêutica vem sendo empregada com vários objetivos: facilitar a chegada do fármaco no tecido alvo, mascarar sabor e/ou odor de um fármaco quando este é aplicado por via oral, proteger o fármaco de enzimas digestivas, reduzir a hepatotoxicidade, reduzir a biotransformação, melhorar a biodisponibilidade, gerar a redução das doses diárias e aumentar eficácia terapêutica de fármacos (ALVES et al., 2007; MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010). Além de diminuir a toxicidade do fármaco, proteger contra degradação antecipada do ativo no organismo, gerar administração mais segura, realizar manutenção do nível sérico terapêutico, diminuir os problemas relacionados à dissolução do fármaco em água e aumento da adesão do paciente ao tratamento (FREITAS; MARCHETTI, 2005).

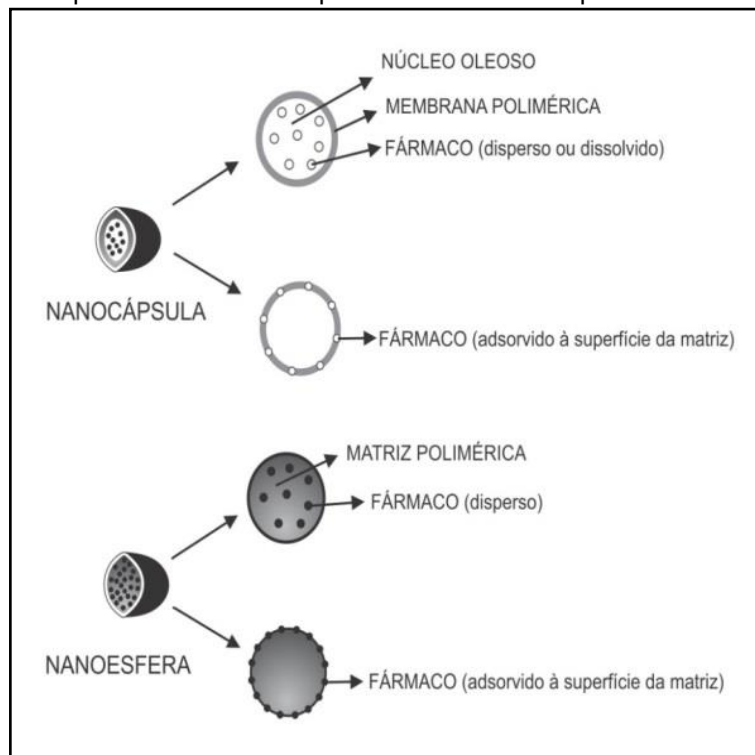
2.3.2 Nanopartículas Poliméricas

A aplicação das nanopartículas poliméricas em produtos farmacêuticos, visando o desenvolvimento de fármacos mais seguros e eficazes está sendo amplamente utilizado (KAMALY et al., 2012).

As nanopartículas poliméricas são definidas como sistemas coloidais sólidos que se subdividem em nanocápsulas e nanoesferas, as quais diferem entre si de acordo com a sua composição e organização estrutural (Figura 5) (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010).

As nanocápsulas são sistemas vesiculares onde o fármaco sólido ou líquido está presentes no interior aquoso ou oleoso, circundando por uma membrana polimérica (QUINTANAR-GUERREIRO et al., 1998). Nanoesferas são definidas como sistemas matriciais onde o fármaco encontra-se adsorvido à superfície ou encapsulado no interior da matriz de forma uniforme (SOPPIMATH et al., 2001).

Figura 5 - Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas.



Fonte: Adaptado de KUMARI; YADAV; YADAV, 2010.

2.3.3 Polímeros

A escolha adequada do tipo de nanossistema e o polímero que será utilizado para produzir os sistemas de liberação controlada do fármaco devem ser criteriosa, levando em consideração as características físico-químicas dos polímeros, fármacos, excipientes, via de administração e o tecido-alvo. Com estes cuidados, podem-se alcançar perfis de concentração de fármaco constante, redução significativa de reações adversas, diminuição das dosagens dos fármacos e posologia de tratamentos medicamentosos (SADRIEH et al., 2010).

O tamanho, as características superficiais, a carga, a lipofilia e a existência de determinados grupos funcionais dos polímeros, determinam a interação dos sistemas de liberação com as estruturas biológicas, pela interação e estabelecimento da afinidade desejada (DESAI, 2012; MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010).

Os polímeros podem ser classificados em não-biodegradáveis e biodegradáveis, conforme o seu comportamento no organismo (BUZEA; BLANDINO; ROBBIE, 2007; RAFFIN et al., 2003).

Polímeros não-biodegradáveis, não são metabolizados pelo organismo e os fármacos são liberados por difusão com velocidade de liberação determinada pela solubilidade do polímero no meio externo. Exemplos mais comuns deste tipo de polímeros são: PEG – polietilenoglicol, Poli N-acrilolamida, Polivinileno e o Polimetilmetacrilato (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010; RAFFIN et al., 2003).

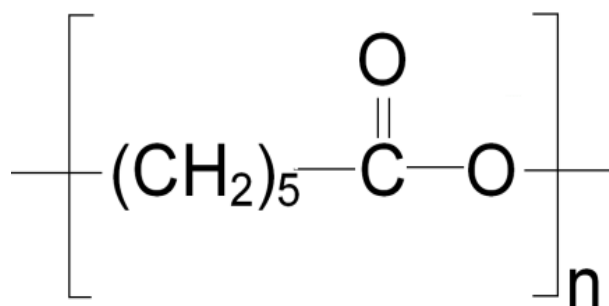
Os polímeros biodegradáveis podem ser metabolizados pelo organismo. A liberação de fármaco das nanopartículas formadas por estes polímeros são através da degradação ou erosão da nanopartículas, o que permite uma liberação do fármaco mais prolongada, um maior contato do fármaco com o local de ação além de garantir uma menor toxicidade (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010; RAFFIN et al., 2003). As nanopartículas formam uma barreira física ao redor do fármaco. No momento que elas entram em contato com fluidos biológicos tal barreira se dissolve, desintegra e se desagrega, liberando o ativo. Esta liberação pode ocorrer por três mecanismos diferentes: difusão do fármaco pelo polímero desencadeado por reações químicas ou enzimáticas, degradação do polímero por osmose ou intumescimento do sistema (LANGER, 1998).

Estes polímeros biodegradáveis podem ser subdivididos em não-reabsorvíveis e absorvíveis. Polímeros considerados não-absorvíveis são metabolizados e excretados pelo organismo sem serem aproveitados pelo mesmo. O polímero que representa esta classe é o PACA – polialquilcianoacrilato e seus derivados. Os polímeros biodegradáveis reabsorvíveis são metabolizados em moléculas e podem ser aproveitados pelo organismo e transformados em outro metabólito. Podem ser citados como exemplo desta classe de polímeros o PLA – poliácido láctico, PLGA – poli ácido láctico-co-ácido-glicólico e a PCL – poli- ϵ -caprolactona (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010; RAFFIN et al., 2003; SCHAFFAZICK et al., 2002).

2.3.4 Poli (ϵ -caprolactona) - PCL

A PCL é um poliéster alifático de cadeia linear, semicristalino e de caráter hidrofóbico. É sintetizada por meio de polimerização por abertura do anel ϵ -caprolactona, para obtenção da unidade repetitiva (WESSLER, 2006). Sua estrutura química está representada na Figura 6.

Figura 6: Estrutura química da PCL



Fonte: Adaptado de Pereira et al. (2014).

É largamente utilizada na aplicação de sistema de liberação de fármacos sendo escolhida por suas propriedades de biocompatibilidade, biodegradabilidade, biodisponibilidade, permeabilidade e atoxicidade. A PCL não acidifica a formulação, forma sistemas estáveis e apresenta degradação lenta. Sua faixa de fusão encontra-se entre 59°C e 64°C. Sendo solúvel em clorofórmio, diclorometano, tolueno, tetracloreto de carbono, benzeno, ciclohexanona e 2-nitropropano, em temperatura ambiente. Pouco solúvel em acetona, 2-butanona, acetato de etila, dimetilformamida e acetonitrila, insolúvel em álcoois isopropanol, 1-butanol, 2-butanol, 1- propanol, éter de petróleo e éter dietílico (SINHA et al., 2004; CHAWLA; AMIJI, 2012).

A PCL é degradada por hidrólise de suas ligações ésteres, com estes produtos de degradação sendo reaproveitados pelo metabolismo (REZWAN et al., 2006). Promove a liberação do fármaco por um período mais prolongado, apresenta ainda a grande vantagem de ter baixo custo de produção (AL HAUSHEY et al., 2007).

Devido a sua versatilidade, PCL pode ser combinada com vários outros polímeros, entre eles estão: amido, hidroxiapatita, quitosana e polímeros sintéticos (DASH; KONKIMALLA, 2012) formando ligações cruzada, o que melhora consideravelmente as suas propriedades (SINGH et al., 2006).

2.3.5 Nanotecnologia Aplicada a Sistemas Transdérmicos

A via transdérmica é considerada uma importante rota de administração de fármacos, entretanto, os sistemas de liberação de fármacos através desta via necessitam vencer vários obstáculos que a pele apresenta, com objetivo de proteger o organismo de agentes invasores (CEVC; VIERL, 2010; LENZ, 2010).

A aplicação tópica de nanopartículas reduz a irritabilidade cutânea que alguns fármacos podem causar, devido ao sistema nanoestruturado envolver o fármaco nas nanopartículas, evitando a exposição direta do fármaco na pele (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010).

De acordo com estudos realizados, para que as nanopartículas possam garantir um fluxo transdérmico eficiente, estas devem possuir tamanho inferior a 500 nm, além de apresentar características eletronicamente e molecularmente adequadas onde ocorra interação entre as nanopartículas e a epiderme (CEVC, 2010). O caráter lipofílico ou hidrofílico das nanopartículas também são características muito importantes para obtenção de uma aplicação transdérmica ideal, podendo facilitar a permeação cutânea e aumentar a taxa de liberação do fármaco, dependendo do método de preparação e matérias-primas utilizadas (ABDEL-MOTTLEB; NEUMANN; LAMPRECHT, 2010).

Existe uma grande expectativa da reposição da vitamina D pela via percutânea utilizando a nanotecnologia por apresentar inúmeras vantagens, destacando-se a manutenção dos níveis sanguíneos por uma via de administração não invasiva, mais confortável para o paciente e melhor adesão ao tratamento. Além do que o encapsulamento da vitamina D em PCL promove proteção ao fármaco da oxidação, hidrólise e fotólise.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e caracterizar nanopartículas poliméricas contendo colecalciferol, e avaliar a sua permeação cutânea, visando a sua reposição por aplicação tópica.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter nanopartículas poliméricas de PCL contendo colecalciferol por meio de deposição interfacial do polímero (nanoprecipitação);
- Caracterizar as nanopartículas poliméricas carregadas com colecalciferol por análises físico-químicas, morfológicas, espectroscópicas e térmicas;
- Desenvolver e validar um método de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para quantificação do colecalciferol;
- Determinar a eficiência de encapsulação do fármaco nas nanopartículas produzidas;
- Investigar a estabilidade das nanopartículas poliméricas;
- Avaliar a permeação cutânea *in vitro* das nanopartículas poliméricas contendo colecalciferol.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 EQUIPAMENTOS

- Agitador Magnético com aquecimento (SOLAB, modelo SL-91);
- Balança semi-analítica de prato único (SHIMADZU, modelo UX420H);
- Balança Termogravimétrica (SHIMADZU, modelo TGA-50);
- Banho de Ultrassom – (MAXICLEAN 1600A – UNIQUE);
- Bomba de vácuo (FISATOM, modelo 801);
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência (MERCK-HITACHI, modelo Lachorom D-7000);
- Degaseificador e injetor manual (RHEODYNE);
- Destilador de água – Sistema Osmose Reversa (QUIMIS);
- Difrátômetro de raios X (RIGAKU, modelo Ultima IV);
- Espectrofotômetro infravermelho com transformada de Fourier (SHIMADZU, modelo IR Prestige-21);
- Espectrofotômetro de auto-correlação a laser (MALVERN INSTRUMENTS, modelo Zetasizer Nanoseries ZS90,);
- Espectrofotômetro de UV (BYOSYSTEMS, modelo BTS-330);
- Evaporador Rotativo (FISATOM, modelo 801, São Paulo, Brasil);
- Metalizador (SHIMADZU, modelo IC-50 Ion Coater);
- Microscópio eletrônico de Varredura (SHIMADZU, modelo SSX-550);
- Potenciômetro digital de bancada (HANNA INSTRUMENTS, modelo HI 21);
- Sistema de ultra purificação de água (Milli-Q®, MILLIPORE, Bedford);
- Equipamento de Termogravimetria – Calorimetria exploratória diferencial simultâneas – NETZCH STA 409 PC/PG;
- Ultra centrífuga refrigerada (HITACHI, modelo Himac CR21GII).

4.2 REAGENTES E SOLVENTES

- Colecalciferol (vitamina D₃) – C₂₇H₄₄O, peso molecular: 384,64 g/mol, teor de pureza 97,0% a 103,0% (GALENA, São Paulo, Brasil);

- Poli (ϵ -caprolactona) (PCL, M_n 45000 g.mol^{-1} , SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO, Estados Unidos);
- Água ultrapura (Milli-Q[®] - MILLIPORE, Bedford, Estados Unidos);
- Acetona P.A (VETEC QUÍMICA FINA);
- Monoestearato de sorbitano etoxilado (polissorbato 80, Tween[®]80, DELAWARE, Porto Alegre, Brasil);
- Brometo de potássio grau espectroscópico (KBr) (SIGMA ALDRICH);
- Solução Cloreto de Sódio 0,9% (ISOFARMA);
- Metanol grau cromatografia líquida (MERCK);
- Triglicerídes de ácidos caprílicos/ cápricos (VETEC QUÍMICA FINA).

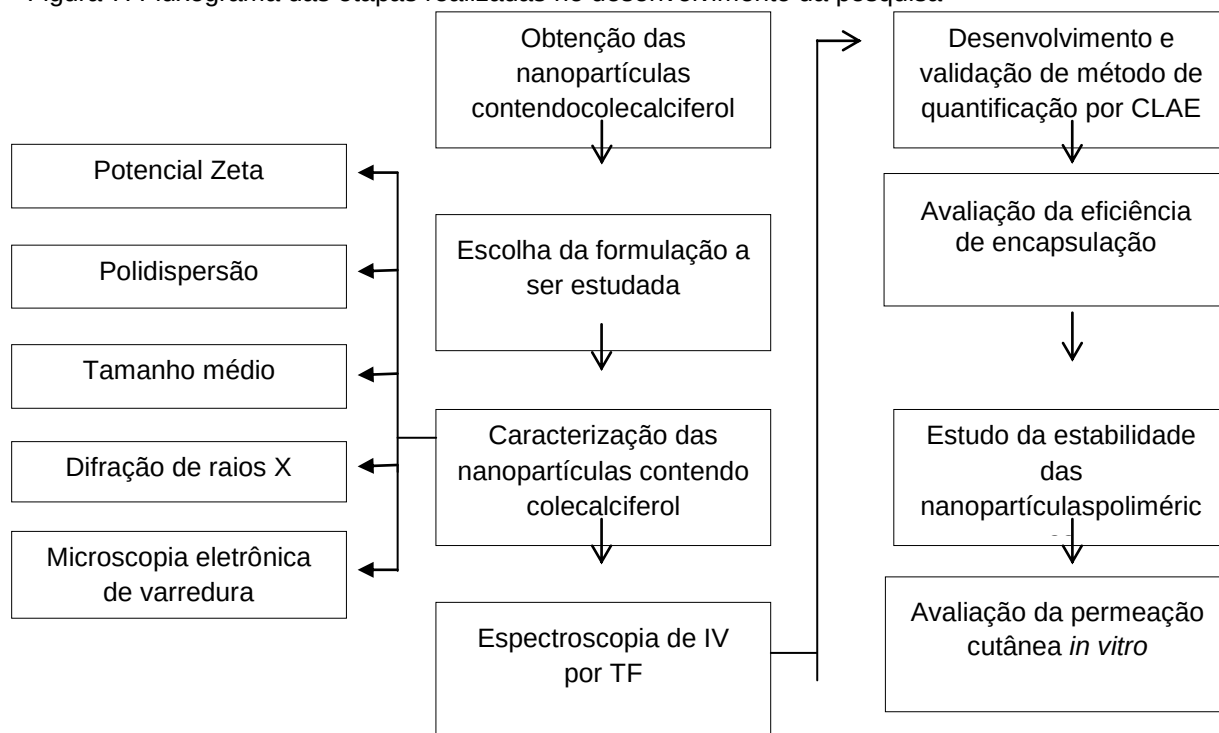
4.3 OUTROS MATERIAIS

- Filtro para seringa de Nylon 0,45 μm 13 mm (FILTRILO);
- Membrana de filtração Nylon 0,45 μm 25 mm (UNIFIL);
- Coluna de fase reversa GL Sciences Inertsil[®] ODS3 (150 mm x 4,6 mm, 5 μm);
- Pré-coluna de fase reversa GL Sciences Inertsil[®] ODS3 (10 mm x 4 mm, 5 μm).

4.4 DESENHO EXPERIMENTAL

As etapas realizadas no desenvolvimento da pesquisa estão esquematizadas no fluxograma abaixo (Figura 7):

Figura 7: Fluxograma das etapas realizadas no desenvolvimento da pesquisa



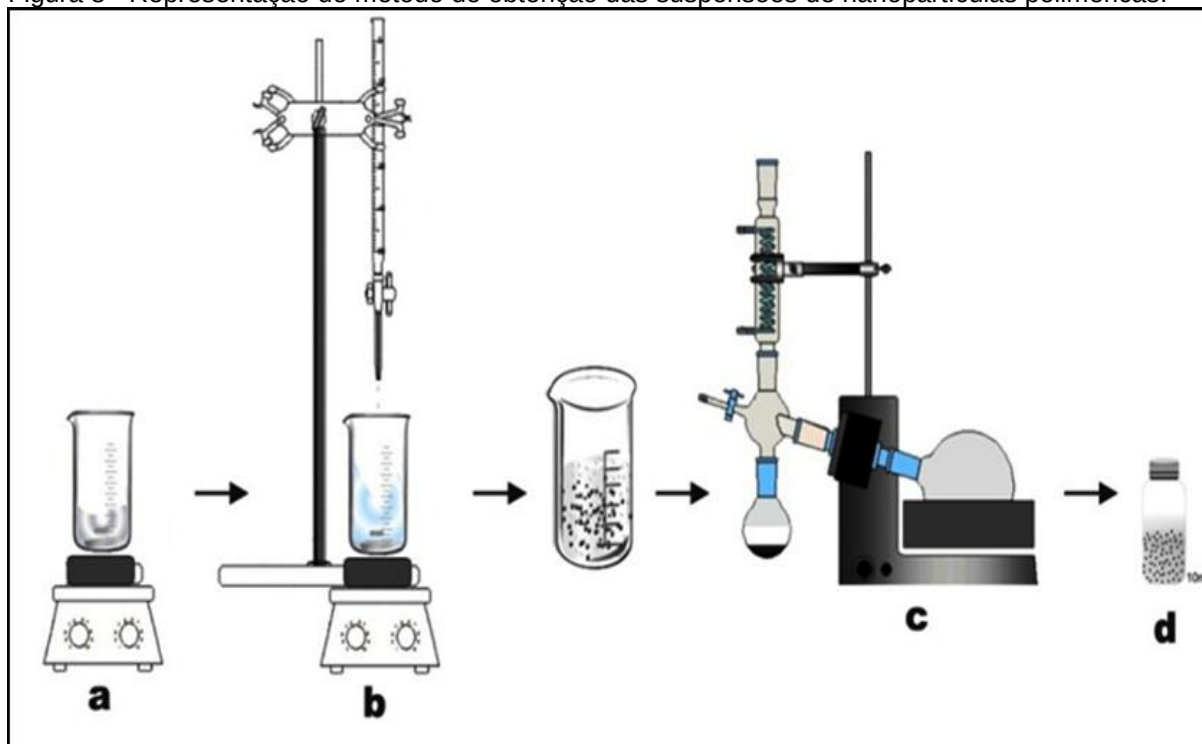
4.5 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.5.1 Obtenção da Suspensão das Nanopartículas Poliméricas

As suspensões foram preparadas pelo método de deposição interfacial do polímero pré-formado, desenvolvido e descrito por Fessi et al., (1989) (Tabela 3). Resumidamente, um volume de 27 mL fase orgânica preparada pela dissolução do polímero PCL (ε -caprolactona), colecalciferol e acetona a 45°C, foi vertida, por gotejamento, com auxílio de uma seringa com agulha, sobre fase aquosa (40 mL) contendo o Tween® 80 (0,077 g), sob agitação magnética moderada em temperatura ambiente. As nanopartículas foram imediatamente formadas após difusão do solvente orgânico. O sistema foi mantido em agitação magnética por 10 minutos após o término do gotejamento e mantida em repouso durante 60 minutos. Após este período, o solvente orgânico e parte da fase aquosa foram removidos por

rotaevaporação, ajustando o volume final em 10 mL, obtendo uma suspensão contendo uma concentração de $10,0 \text{ mg.mL}^{-1}$ de colecalciferol(Figura 8). As suspensões foram preparadas em triplicata, com o fármaco. E para fins comparativos foi preparada uma suspensão sem adição do fármaco, como controle negativo.

Figura 8 - Representação do método de obtenção das suspensões de nanopartículas poliméricas.



a) Preparo da fase orgânica; b) método: deposição interfacial do polímero pré-formado; c) rotaevaporação; d) suspensão de nanopartículas poliméricas.

Fonte: GOMES, 2015.

Tabela 3 - Composição das formulações de nanopartículas poliméricas

Formulação	Fase Orgânica				Fase Aquosa	
	COL (g)	PCL (g)	COL:PCL	Acetona (mL)	Tween 80 [®] (g)	Água Purificada (mL)
NP0 - 1	-	0,200	-	10	0,100	40
NP0 - 2	-	0,300	-	10	0,100	40
NP0 - 3	-	0,500	-	10	0,100	40
NP0 - 4	-	0,200	-	27	0,077	43
NP0 - 5	-	0,300	-	27	0,077	43
NP0 - 6	-	0,500	-	27	0,777	43
NPCOL - 7	0,100	0,200	1:2	10	0,100	40
NPCOL - 8	0,100	0,300	1:3	10	0,100	40
NPCOL - 9	0,100	0,500	1:5	10	0,100	40
NPCOL - 10	0,100	0,200	1:2	27	0,077	43
NPCOL - 11	0,100	0,300	1:3	27	0,077	43
NPCOL - 12	0,100	0,500	1:5	27	0,077	43

NP0: nanopartículas poliméricas inertes; NPCOL: nanopartículas poliméricas contendo colecalciferol.

A escolha da melhor composição foi feita em função da avaliação de tamanho médio, índice de polidispersão e potencial zeta.

4.5.2 Caracterização das Suspensões de Nanopartículas Poliméricas

4.5.2.1 Determinação do pH

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 e para estudo de estabilidade. Os resultados representam a média em triplicata.

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

O diâmetro médio das nanopartículas e o índice de polidispersão (distribuição de tamanho) foram medidos (n=3) por espectroscopia de correlação de fótons, por intensidade, após a diluição de uma alíquota de suspensão de

nanopartículas em água ultra purificada (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 (n=3) utilizado para a análise do tamanho de partículas e PDI.

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

As avaliações morfológicas e de superfície das nanopartículas poliméricas foram realizadas com auxílio de um microscópio eletrônico de varredura por emissão de campo (TESCAN, modelo Mira 3, Brno, República Tcheca). Uma alíquota da suspensão das nanopartículas poliméricas puras, foram fixadas em suportes metálicos e levadas para secar em estufa a 36°C durante 30 minutos. Após, foram submetidas à metalização com ouro em aparelho metalizador IC-50 Coater (SHIMADZU). Foram empregadas eletromicrografias com voltagens de aceleração de 10 e 15 kV.

4.5.2.4 Análise por difração de raios X

As suspensões de nanopartículas poliméricas foram liofilizadas para realização da análise por difração de raios X. O colecalciferol, o polímero PCL, e as nanopartículas contendo o colecalciferol não receberam tratamento prévio à análise. As amostras foram examinadas em difratômetro de raios X (RIGAKU, modelo Ultima IV), scan de 2°.min⁻¹ e 2 θ de 5° a 80°, radiação K α de cobre (λ =1.5418Å), corrente de 40 mA e voltagem 30 kV, para a observação de possíveis picos indicativos de cristalinidade.

4.5.2.5 Avaliação por espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (IVTF)

As suspensões de nanopartículas poliméricas contendo o fármaco e as nanopartículas inertes foram liofilizadas e analisadas por espectroscopia na região do infravermelho, em pastilha com Brometo de Potássio (KBr), empregando 4 mg de

cada amostra e 196 mg de KBr grau espectroscópico (2% m/m) em equipamento IR Prestige-21 (SHIMADZU), 32 scans.min⁻¹, com resolução de 4 cm⁻¹. Os espectros obtidos por infravermelho com transformada de Fourier das amostras preparadas foram avaliados frente aos espectros do fármaco puro, do polímero utilizado e das nanopartículas poliméricas contendo colecalciferol.

4.5.2.6 Análise térmica

Para estudo da estabilidade térmica das amostras liofilizadas foi realizado a análise termogravimétrica (TGA), com aquecimento de 500 °C e a calorimetria diferencial de varredura (DSC) por aquecimento até 200 °C em equipamento da NETZCH STA 409 PC/PG. Aproximadamente 10 mg de cada amostra (PCL, colecalciferol, nanopartículas poliméricas inertes e nanopartículas poliméricas contendo colecalciferol) foram acondicionadas em cadinhos de platina. As curvas termogravimétricas foram obtidas sob fluxo de nitrogênio (20.mL⁻¹) a uma taxa de aquecimento de 10 °C.min⁻¹.

4.6 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

O método cromatográfico foi desenvolvido e validado para quantificar o colecalciferol incorporado nas nanopartículas, bem como utilizado para a avaliação da eficiência de encapsulação das formulações e o teor do fármaco encapsulado.

4.6.1 Equipamentos e Condições Cromatográficas

As análises por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foram realizadas em cromatógrafo Merck-Hitachi (Lachrom D-7000), equipado com detector UV L-7400, bomba L-7100, degaseificador e injetor manual Rheodyne (volume de injeção de 20 µL) e *software* Chromquest. As amostras foram injetadas com seringa de 100 µL (Hamilton, Microliter, 710).

Foi utilizada coluna de fase reversa GL Sciences Inertsil[®] ODS3 (150 mm x 4,6 mm, 5 µm), acoplada a pré-coluna GL Sciences Inertsil[®] ODS3 (10 mm x 4 mm, 5 µm). A eluição foi realizada à temperatura ambiente, em modo isocrático, com fase

móvel constituída de metanol:água (98:2 v/v), com fluxo de 1,200 mL.min⁻¹. O tempo de análise foi de 10 minutos e detecção em 265 nm.

4.6.2 Preparo das Soluções Padrão

A solução padrão estoque de colecalciferol foi preparada em metanol 500 µg.mL⁻¹. As diluições foram realizadas utilizando metanol, obtendo soluções com concentração entre 10,0 e 80,0 µg.mL⁻¹, para compor os cinco pontos na curva de calibração (10,0; 15,0; 40,0; 70,0 e 80 µg.mL⁻¹). Antes de serem injetadas no cromatógrafo, as soluções foram filtradas em filtro para seringa de Nylon (0,45 µm x 13 mm) (FILTRILO, ALEMANHA).

4.6.3 Validação do Método para a Quantificação do Colecalciferol Incorporado às Nanopartículas

Para avaliar a melhor condição para a corrida cromatográfica, foi realizado um experimento em gradiente exploratório, variando a concentração de metanol de 5% a 100 % em 60 minutos. Após isso, as condições cromatográficas foram avaliadas para se obter uma melhor resolução do cromatograma de colecalciferol.

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 (BRASIL, 2003). Os parâmetros avaliados foram: especificidade, linearidade, limites inferiores de detecção, limites inferiores de quantificação, precisão, exatidão e robustez.

A seletividade foi determinada pela análise dos cromatogramas obtidos para as suspensões de nanopartículas sem o fármaco (controle negativo) e para as suspensões contendo o colecalciferol, com o objetivo de confirmar se os outros componentes da formulação, produtos de degradação ou componentes da matriz não interfeririam na quantificação do fármaco.

Para o estudo de linearidade do método, foi avaliada por regressão linear usando o método dos mínimos quadrados através da média dos pontos de três curvas de calibração, nas concentrações de: 10,0; 15,0; 40,0; 70,0 e 80,0 µg.mL⁻¹. A

inclinação e outros parâmetros das curvas de calibração foram calculados por regressão linear e análise de variância (ANOVA).

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram calculados em três curvas, média dos coeficientes lineares do intercepto no eixo y das equações das retas obtidas Desvio Padrão (DP) e média dos coeficientes angulares das equações das retas obtidas (S) das curvas de calibração, por meio das Equações 1 e 2.

$$LD = \frac{3 \times DP}{S} \quad (1)$$

$$LQ = \frac{10 \times DP}{S} \quad (2)$$

A precisão foi comprovada pela repetibilidade e precisão intermediária. A repetibilidade foi realizada a partir de seis amostras independentes, na concentração de 40,0 µg.mL⁻¹, no mesmo dia e nas mesmas condições experimentais. Para avaliação da precisão intermediária foram analisadas seis amostras (40,0 µg.mL⁻¹) no período da manhã e seis amostras no período da tarde, ambas no mesmo dia, e mais seis amostras analisadas no outro dia no período da manhã.

A exatidão foi determinada por análises de recuperação, adicionando-se a quantidade de 2 mg de COL à solução padrão de COL (500 µg.mL⁻¹). Alíquota de 70 µL da solução padrão COL (500 µg.mL⁻¹ e 700 µg.mL⁻¹) foi diluída para 1,5 mL com fase móvel, em triplicata.

A robustez foi avaliada nas amostras a 40 µg.mL⁻¹, por variações na taxa de fluxo para 1,195 e 1,205 mL.min⁻¹, e a concentração da fase móvel metanol:água para 97:3 (v/v) e 99:1 (v/v). Os resultados foram analisados utilizando o DPR comparando com os valores obtidos para a condição padrão (fluxo de 1,200 mL. min⁻¹ e fase móvel metanol:água 98:2 (v/v)).

4.6.4 Análise Estatística da Validação do Método Analítico por CLAE

A análise estatística foi realizada por Análise de variância (ANOVA), teste *t-student* e análise de resíduos, utilizando *software* Statística 8.0 (Statsoft, Inc.).

4.7 DETERMINAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO (EE)

A eficiência de encapsulação é a percentagem da massa do fármaco encapsulada nas nanopartículas, relativamente à quantidade inicial do fármaco que foi adicionada na preparação das nanopartículas (LI et al., 2011). A quantificação do colecalciferol encapsulado nas nanopartículas foi realizada pelo método indireto.

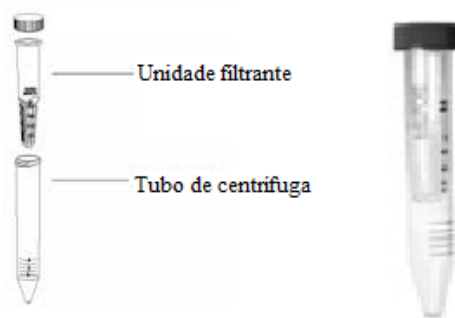
A eficiência de encapsulação do colecalciferol foi calculada pela equação 3.

$$EE\% = \frac{(COL_{inicial} - COL_{livre})}{COL_{inicial}} \times 100 \quad (3)$$

Onde, $COL_{inicial}$ corresponde à concentração do fármaco adicionada inicialmente à formulação e COL_{livre} corresponde à concentração do colecalciferol não incorporado às nanopartículas (fármaco livre), quantificadas por CLAE. Os valores de eficiência de encapsulação foram expressos como média $\pm$ DP. O teste foi realizado em triplicada.

As nanopartículas foram submetidas à ultrafiltração/ultracentrifugação em centrífuga (HITACHI, Himac CR21GII), a 22000 xg durante 30 minutos em temperatura ambiente. Este dispositivo utilizado para filtrar as nanopartículas (Amicon® 10.000 Mw, Milipore) é composto de dois compartimentos, contendo uma membrana de celulose regenerada de porosidade 100 kDa (Figura 9). (ZANG et al., 2008). Com a centrifugação, ocorreu a separação da fase aquosa (contendo o fármaco livre) da parte da suspensão coloidal (fármaco encapsulado). A porção aquosa resultante da centrifugação descrita acima foi utilizada para determinar a concentração do fármaco livre que não foi encapsulado ao sistema polimérico após a centrifugação. As amostras foram filtradas no filtro de seringa Nylon 0,45 μ m x 13 mm e analisadas por CLAE, em triplicata.

Figura 9: Dispositivo de ultrafiltração utilizado para eficiência de encapsulação das nanopartículas poliméricas



Fonte: ZANG et al., 2008

4.8 ESTUDO DE ESTABILIDADE

As suspensões de nanopartículas poliméricas foram armazenadas à temperatura ambiente (25 °C), protegidas da luz em frascos âmbar, durante sessenta dias. Após este período as suspensões foram analisadas determinando o pH, tamanho médio de partícula, índice de polidispersão, potencial zeta e eficiência de encapsulação com comparação com os valores encontrados logo após a preparação (tempo=0).

As análises estatísticas do estudo de estabilidade foram realizadas por ANOVA seguida do teste *t-student*. Com valor $p < 0,05$ considerado como indicativo de significância.

4.9 ESTUDO “IN VITRO” DE PERMEAÇÃO CUTÂNEA PARTIR DE NANOPARTÍCULAS DE COLECALCIFEROL

O estudo “*in vitro*” de permeação cutânea foi realizado em células de difusão vertical, com um compartimento receptor de 7 mL e uma área disponível para permeação de 1,77 cm². Foi utilizada pele humana de procedência cirúrgica (abdominoplastia), com modelo de pele total (derme, epiderme) e retirada do tecido adiposo, com auxílio de um bisturi cirúrgico, seguido de higienização com solução salina 0,9% e armazenamento em freezer a -20°C. Minutos antes do uso, as peles foram descongeladas a temperatura ambiente e higienizadas com solução salina.

Para obtenção da solução receptora ideal para a permeação das nanopartículas poliméricas contendo colecalciferol, realizou-se um estudo de solubilidade comparando a solubilidade do colecalciferol diante de diversas soluções e concentrações diferentes, até a obtenção da “*sink conditions*”, que é definida como: o volume do meio, pelo menos, três vezes maior do que o necessário para obter uma solução saturada do fármaco, evitando assim que se tenha uma velocidade de dissolução lenta.

A pele foi posicionada entre os compartimentos doador (com o estrato córneo voltado para o compartimento doador) e receptor das células verticais de difusão, evitando a formação de bolhas. No compartimento doador a suspensão de nanopartículas poliméricas contendo colecalciferol, uma concentração de 1000 µg, foi aplicada sobre a pele. Após a incorporação das nanopartículas no compartimento doador o sistema foi mantido sob constante agitação (500 rpm), por meio de uma pequena barra magnética. As células foram mantidas a uma temperatura de $\pm 32^{\circ}\text{C}$, em uma circulação de água termostatzada. As soluções receptoras foram degaseificadas por sonificação. Aliquotas de 0,3 mL foram retiradas do meio receptor nos tempos: 30 minutos, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 14, 18, 20 e 24 horas sendo que o volume retirado a cada tempo era repostado no meio receptor com o mesmo volume. Foi aplicado 1 mL da suspensão das nanopartículas contendo colecalciferol, representando 1000 µg do fármaco incorporados no sistema polimérico. E para verificação da permeação do colecalciferol puro 1000 µg foi dissolvido em triglicerídeos de ácido cáprico/caprilico e aplicado nas mesmas condições que as nanopartículas poliméricas contendo colecalciferol.

As amostras coletadas foram filtradas em filtros de Nylon 0,45 µm e quantificadas por CLAE, utilizando a curva analítica do fármaco obtida em solução receptora. Os testes foram realizados em triplicata.

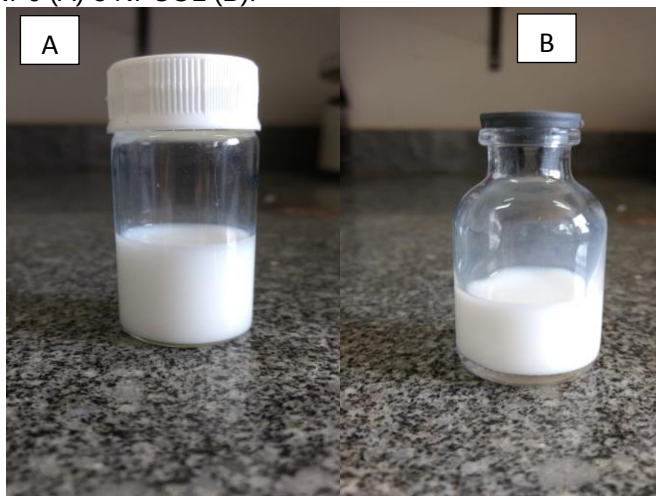
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 OBTENÇÃO E CARACATERIZAÇÃO PARA TRIAGEM DAS SUSPENSÕES DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS

A técnica utilizada para obtenção das nanopartículas poliméricas foi a nanoprecipitação. Esta técnica foi descrita pela primeira vez por Fessi et al. (1989), também chamada de deslocamento do solvente.

As suspensões de nanopartículas poliméricas obtidas apresentaram o aspecto de um líquido leitoso e opalescente com reflexo azulado, relacionado ao movimento browniano das estruturas coloidais (efeito *tyndall*) o que está de acordo com os resultados relatados para outros sistemas nanoparticulados (SCHAFFAZICK et al., 2003; MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010). Na Figura 10 podemos observar as nanopartículas poliméricas inertes e incorporadas com colecalciferol.

Figura 10: Suspensão de NP0 (A) e NPCOL (B).



Fonte: a autora

Os resultados obtidos para o diâmetro, potencial zeta, polidispersão e pH estão dispostos na tabela 4.

Tabela 4: Resultados obtidos das formulações de NP0 e NPCOL.

Nanopartículas	Diâmetro médio (nm) $\pm$ DP	Potencia Zeta (mV) $\pm$ DP	Polidispersão $\pm$ DP	pH $\pm$ DP
NP0 – 1	313,8 $\pm$ 6,04	-24,5 $\pm$ 1,09	1,01 $\pm$ 0,99	6,2 $\pm$ 0,02
NP0 – 2	488,0 $\pm$ 5,00	-28,9 $\pm$ 2,22	0,88 $\pm$ 0,77	6,0 $\pm$ 0,01
NP0 – 3	580,6 $\pm$ 5,43	-29,0 $\pm$ 2,55	0,89 $\pm$ 0,70	6,0 $\pm$ 0,10
NP0 – 4	244,7 $\pm$ 3,60	-31,9 $\pm$ 1,04	0,20 $\pm$ 0,06	6,0 $\pm$ 0,10
NP0 – 5	380,1 $\pm$ 4,40	-26,6 $\pm$ 3,09	0,68 $\pm$ 0,12	5,9 $\pm$ 0,04
NP0 – 6	489,6 $\pm$ 5,23	- 26,4 $\pm$ 2,09	1,23 $\pm$ 3,59	5,8 $\pm$ 0,13
NPCOL – 7	324,8 $\pm$ 5,11	-23,5 $\pm$ 2,00	0,87 $\pm$ 0,88	6,1 $\pm$ 0,04
NPCOL – 8	399,3 $\pm$ 4,77	-26,4 $\pm$ 1,01	0,77 $\pm$ 0,66	6,0 $\pm$ 0,09
NPCOL – 9	412,5 $\pm$ 3,33	-31,9 $\pm$ 2,23	0,99 $\pm$ 0,34	6,0 $\pm$ 0,10
NPCOL – 10	269,1 $\pm$ 3,72	- 33,0 $\pm$ 1,57	0,22 $\pm$ 0,01	6,1 $\pm$ 0,10
NPCOL – 11	360,1 $\pm$ 6,40	-28,6 $\pm$ 2,03	0,77 $\pm$ 0,05	5,9 $\pm$ 0,23
NPCOL – 12	402,8 $\pm$ 3,99	- 24,1 $\pm$ 1,90	0,89 $\pm$ 2,77	5,8 $\pm$ 0,20

NP0: Nanopartículas poliméricas inertes; NPCOL: Nanopartículas poliméricas de Colecalciferol;
DP:Desvio padrão.

Foram observadas diversas variações nas características físico-químicas das nanopartículas poliméricas obtidas nas diversas proporções testadas.

O diâmetro médio obtido para as NP0 variou de 244,7 $\pm$ 3,60 a 580,6 $\pm$ 5,43 enquanto para as NPCOL a variação foi de 269,1 $\pm$ 3,72 a 412,5 $\pm$ 3,33.

De acordo com Tan et al. (2009), a quantidade de solvente orgânico polar utilizado para a diluição do polímero e fármaco está relacionado diretamente no diâmetro médio das nanopartículas poliméricas. A medida que o volume de acetona diminui, observa-se resultados das nanopartículas poliméricas com dimensões maiores, isso se deve a viscosidade da fase orgânica, que dificulta a formação adequada de nanopartículas. A utilização de maior volume de acetona verificou-se a diminuição das nanopartículas poliméricas.

Em relação à concentração do polímero utilizado na formulação, uma maior concentração resulta em uma diminuição da velocidade de difusão do solvente e maior diâmetro médio das nanopartículas. Optando por uma baixa concentração polimérica, a velocidade de difusão do solvente aumenta, ocorrendo uma diminuição do tamanho médio das gotículas da dispersão e consequentemente a obtenção de nanopartículas poliméricas com tamanho reduzido (DERAKHSHANDEH et al., 2010).

O agente tensoativo utilizado na fase aquosa pode ser utilizado para obtenção de nanopartículas de menores dimensões. O aumento da concentração de tensoativo na fase externa, até à sua concentração micelar crítica, diminui as dimensões das nanopartículas (GIANNAVOLA et al., 2003).

Souza et al. (2012), produziram nanopartículas poliméricas de PCL e herbicida atrazina com tamanho médio de 297,0 nm, enquanto Lima e Albuquerque (2012), utilizando PCL contendo Megazol, obtiveram nanopartículas com diâmetro médio de 280 nm. Estes estudos corroboram os resultados encontrados no presente trabalho.

O potencial Zeta é um parâmetro importante para avaliar a estabilidade da suspensão coloidal, e indica o grau de repulsão entre partículas semelhantes na dispersão (CLOGSTON; PATRI, 2011). Quando as nanopartículas são preparadas em solução, ocorre a formação de uma dupla camada elétrica que cercam as nanopartículas.

Os resultados de potencial zeta para NP0 se apresentaram em um intervalo de $-24,5 \pm 1,09$ e $-31,9 \pm 1,0$ e para NPCOL $-23,5 \pm 2,00$ e $-33,0 \pm 1,57$. Estudos apontam que para obter uma estabilidade elétrica das partículas é necessário que o valor absoluto do PZ esteja próximo de ± 30 mV. Desta forma, as NP0-4 e NPCOL-10 apresentam maior tendência à estabilidade.

Outro fator importante a ser considerado é que nanopartículas com superfície negativa permanecem mais tempo na corrente sanguínea, enquanto nanopartículas carregadas positivamente tendem a ser depuradas mais rapidamente e se acumulam nos pulmões e fígado (LI; HUANG, 2008). Assim, a carga negativa obtida nas nanopartículas contendo colecalciferol, desenvolvidas neste trabalho, poderá promover uma maior permanência destas na circulação, resultando em uma liberação prolongada do fármaco.

As NP0 apresentaram índice de polidispersão entre $0,20 \pm 0,06$ e $1,23 \pm 3,59$, já para as NPCOL o índice de polidispersão variou de $0,22 \pm 0,01$ e $0,99 \pm 0,34$. O índice de polidispersão (PDI) pode apresentar uma variação entre 0 e 1, onde valores próximos a 0 indicam homogeneidade da dispersão, e valores próximos a 0,5 indicam uma alta heterogeneidade nos diâmetros das nanopartículas poliméricas (AVADI, 2010). As NP0-4 e NPCOL-10 apresentaram índice de polidispersão de $0,20 \pm 0,06$ e $0,22 \pm 0,01$, sendo consideradas, portanto, homogêneas.

O pH das suspensões foi de caráter ácido, com valores de $5,8 \pm 0,13$ e $6,2 \pm 0,02$ para NP0 e $5,8 \pm 0,10$ a $6,1 \pm 0,04$ para NPCOL. O polímero PCL possui presença do grupo éster, contribuindo na obtenção de suspensões poliméricas de caráter ácido, o que justifica o pH encontrado para as nanopartículas produzidas (DÚRAN et.al., 2006).

Diante dos resultados obtidos, as formulações NP0-4 e NPCOL-10, foram escolhidas para a continuidade aos estudos deste trabalho.

5.2 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA POR EMISSÃO DE CAMPO (FEG-SEM)

As fotomicrografias das NPCOLe NP0, apresentadas nas Figuras 11 e 12 respectivamente, mostram estruturas esféricas e de superfície lisa, não sendo observada a presença de cristais. As nanoestruturas foram similares entre si com tamanhos compatíveis com os resultados encontrados no método de espectroscopia de correlação de fótons.

Figura 11: Fotomicrografia da NPCOL

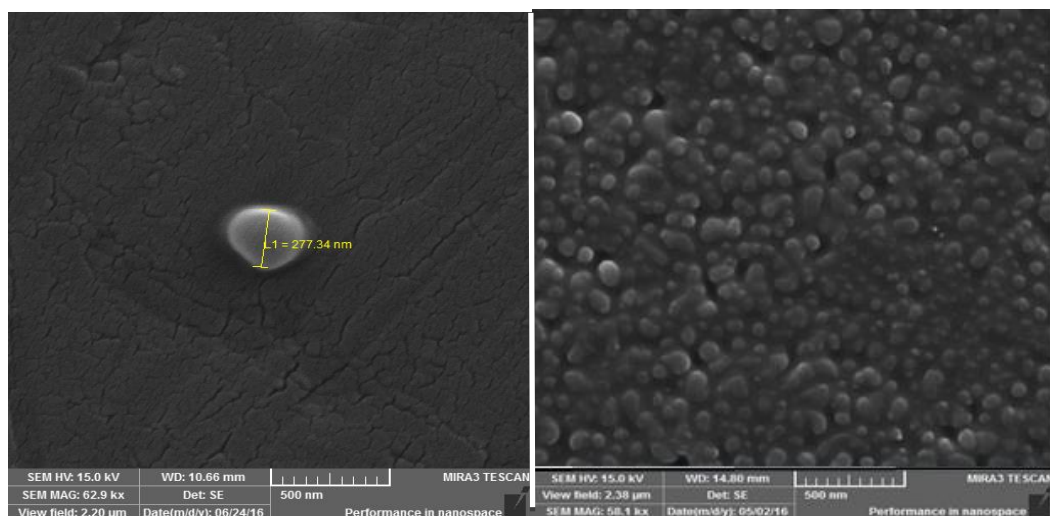
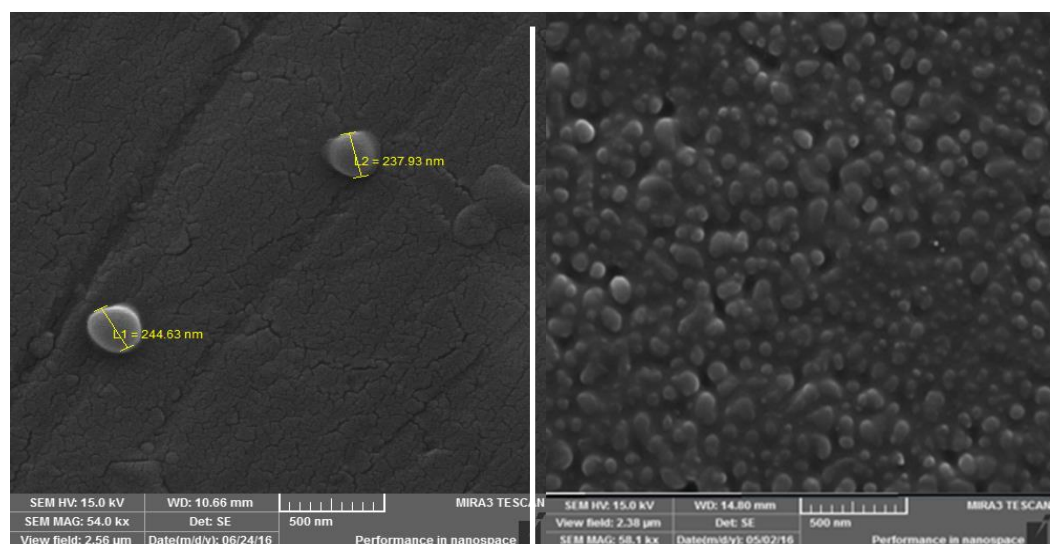


Figura 12: Fotomicrografia NPO



5.3 DIFRAÇÃO DE RAIOS X

A difração de raios X demonstra a característica da amostra quanto à cristalinidade ou amorfismo, sendo considerada uma informação de extrema importância quanto ao potencial de solubilidade e a velocidade de dissolução do fármaco. Quando a substância é cristalina, possuem picos bem definidos em relação às substâncias amorfas, entretanto, sólidos amorfos são mais solúveis devido à disposição aleatória de suas moléculas, precisando de pouca energia para separá-los, sendo sua dissolução mais rápida do que a forma cristalina (RIEKES et. al., 2011).

Na Figura 13 encontra-se o difratograma do fármaco puro (colecalfiferol), onde é possível a visualização de inúmeros picos em 2θ , sendo os principais visualizados em $5,21^\circ$, $6,87^\circ$, $9,04^\circ$, $15,52^\circ$ e $18,20^\circ$, indicando que o mesmo está em sua forma cristalina. Picos em 2θ semelhantes foram descritos por Medeiros (2013), nas suas análises com o fármaco puro.

Podemos observar na figura 14-A o resultado obtido da difração de raios X da PCL, com picos cristalinos, em $2\theta = 21,37^\circ$ e $23,79^\circ$. Sendo estes valores adequados e muito próximos aos já descritos na literatura por Aldelrazek et al. (2015) e Azous et al. (2016), que obtiveram picos do PCL de $21,4^\circ - 23,8^\circ$ e $21,3^\circ - 23,6^\circ$, respectivamente. A PCL pode apresentar característica amorfa ou semicristalina, dependendo das suas propriedades físicas que variam de acordo com a massa molar, densidade do polímero, estereoquímica, tratamento térmico recebido e a temperatura de transição vítrea, sendo estas características que determinam a sua utilização comercial (WOODRUFF; HUTMACHER, 2010).

Analisando-se o difratograma do polímero (Figura 14-A) notam-se dois picos de difração, os quais são visualizados em 2θ à $21,37^\circ$ e $23,79^\circ$, sendo que os mesmos aparecem também nos difratogramas para as nanopartículas inertes (Figura 14-B) e nas nanopartículas carregadas com o fármaco (Figura 14-C), indicando a encapsulação do colecalfiferol pela ausência dos demais picos presentes em seu difratograma.

Figura 13: Difratoograma do colecalciferol.

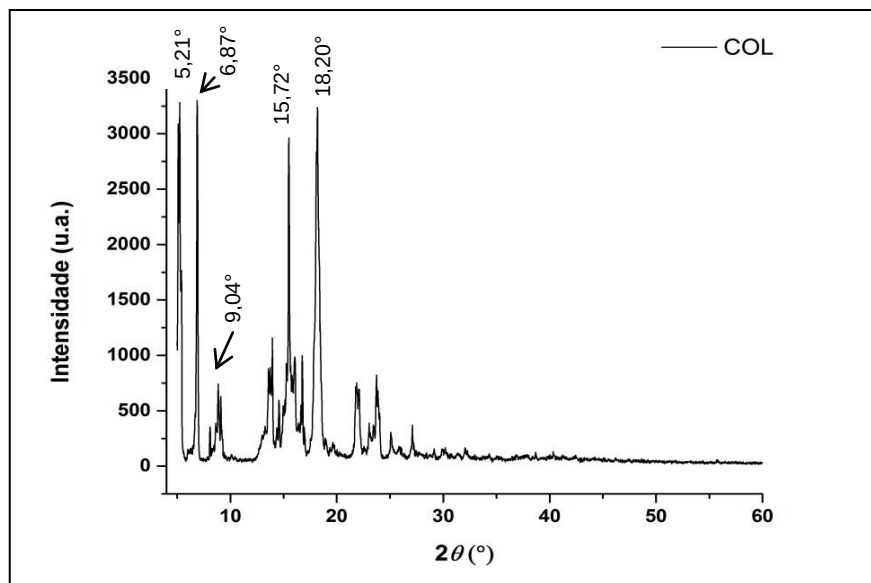
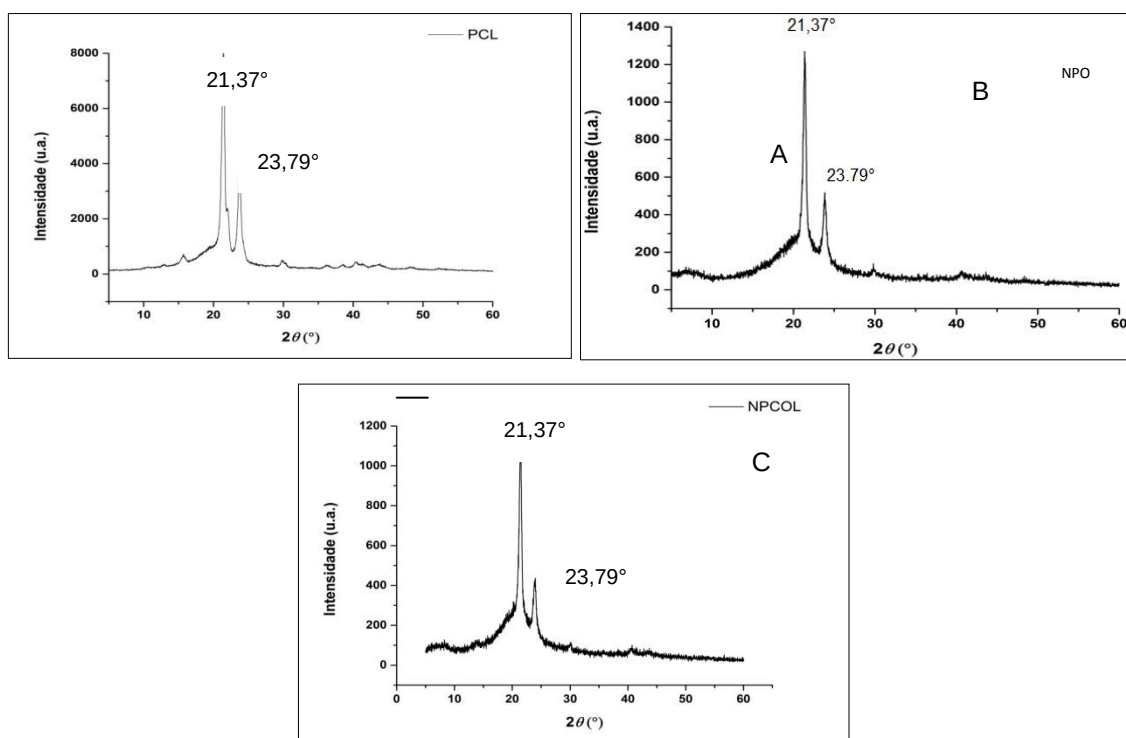


Figura 14: Difratoograma do PCL (A); NPO (B) e das NPCOL (C).



As formulações preparadas apresentaram grande redução da cristalinidade dos seus componentes, isso se deve ao processo de nanoencapsulação. O resultado encontrado sugere uma dispersão molecular entre o colecalciferol e o PCL, resultando em nanopartículas carregadas com colecalciferol de caráter amorfo, havendo, portanto, uma possível melhora na solubilidade em relação ao

colecalfiferol não encapsulado, alterando o aspecto da alta lipossolubilidade característica do colecalfiferol.

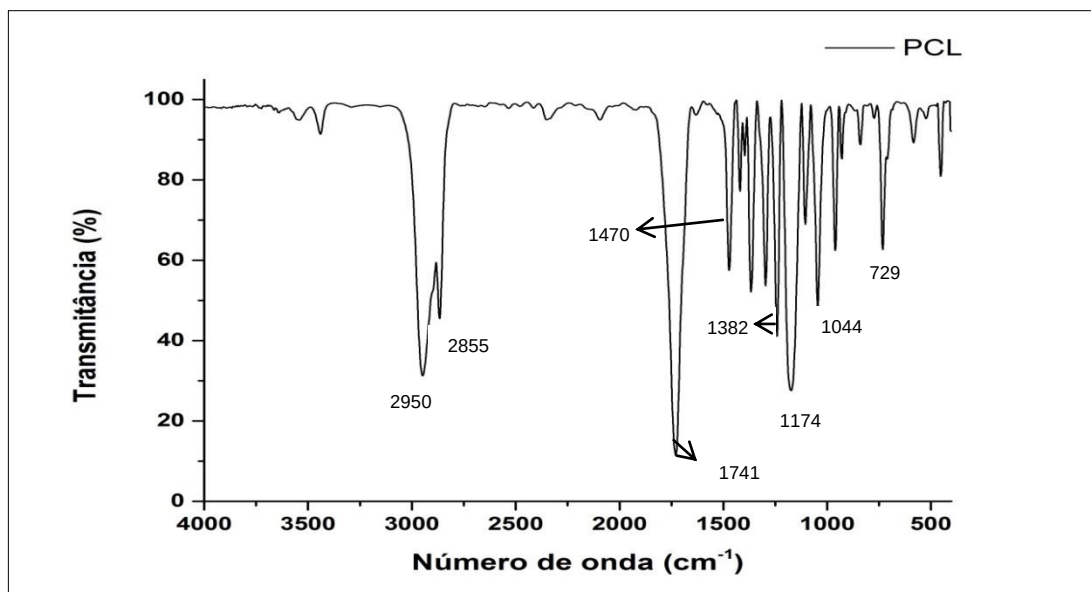
5.4 ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (IVTF)

As análises obtidas por IVTF permitem a determinação da pureza, identificação e elucidação estrutural de substâncias orgânicas em função da detecção de suas ligações e grupos funcionais. Demonstram possíveis interações moleculares entre o fármaco encapsulado e o polímero, pela comparação de deslocamentos ocorridos nas reações, variações de intensidade, alargamento ou aparecimento de novas bandas com espectro característico ao da amostra (LOPES; FASCIO, 2004). Para tanto, os espectros obtidos visaram confirmar os principais grupos químicos dos compostos nas formulações, bem como verificar a integridade do colecalfiferol após sua encapsulação.

Os espectros obtidos do Colecalfiferol, PCL e nanopartículas encapsuladas com o COL, são representados nas figuras a seguir.

No espectro da PCL (Figura 15) foram identificadas as bandas 2950 e 2855 cm^{-1} referentes ao grupamento característico do estiramento C-H sp^3 , assimétrico e simétrico, respectivamente. A banda 1741 cm^{-1} representa a vibração de deformação axial do grupo C=O, específico de ésteres. As ligações CH₂ são representadas pelas bandas 1470, 1382 e 729 cm^{-1} . Em 1174 cm^{-1} , é possível visualizar um estiramento característico de ésteres alifáticos maiores que propionato corroborando com a estrutura deste polímero. No espectro 1044 cm^{-1} um estiramento C-O característico de ésteres de álcool primário (PAIVA et al., 2012).

Figura 15: Espectro IVTF do polímero PCL.

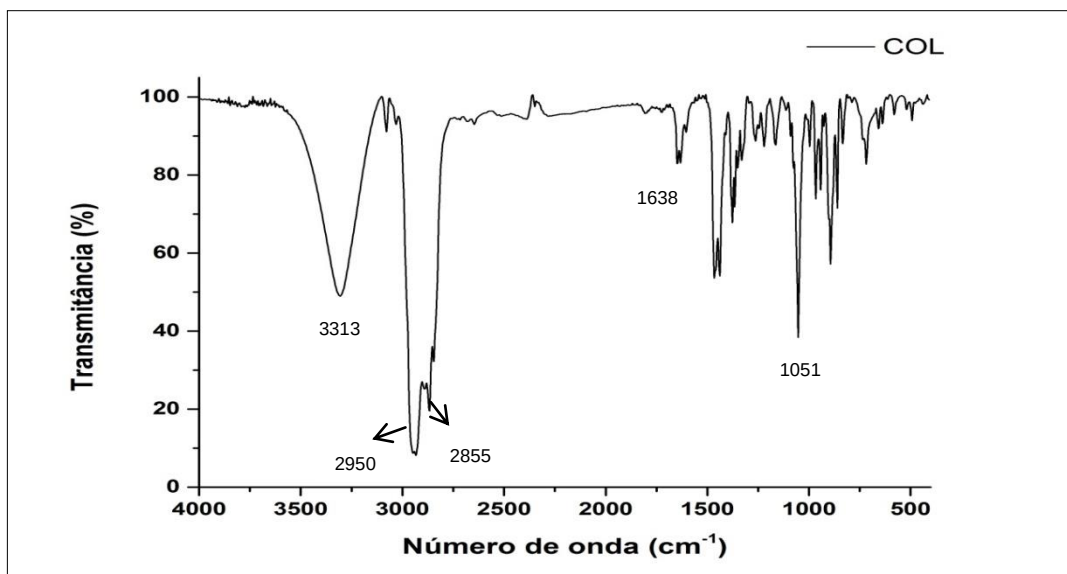


Comparando os espectrogramas encontrados na literatura, observamos que Abdelrazek et al. (2015) e Catauro et al. (2016), descrevem em seus estudos um espectro da PCL muito semelhante com o espectro obtido neste estudo.

No espectro do COL (Figura 16) um estiramento importante para o colecalciferol foi observado em 3313 cm^{-1} , característico da hidroxila, o que indica um composto com muitas ligações de hidrogênio. Também foram identificadas as bandas 2950 cm^{-1} e 2855 cm^{-1} referentes ao grupamento característico do estiramento C-H sp^3 , assimétrico e simétrico respectivamente. O estiramento em 1638 cm^{-1} é característico de C=C. A banda 1051 cm^{-1} mostra um estiramento C-O característico de álcool em anéis de seis membros (KOSHY; BEYER, 1984).

Teng e colaboradores (2013) obtiveram em seus estudos um espectro do Colecalciferol muito semelhante ao encontrado no presente trabalho, as principais bandas foram: 3292 cm^{-1} , 2935 cm^{-1} , 2874 cm^{-1} , 1451 cm^{-1} e 1052 cm^{-1} , sendo possível confirmar a identidade do fármaco.

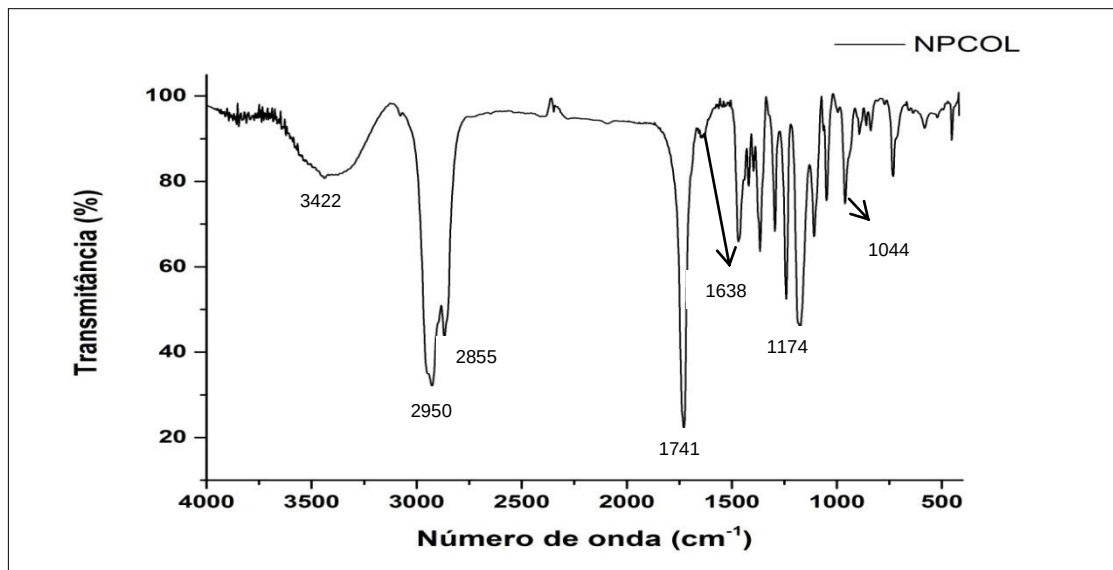
Figura 16: Espectro IVTF do colecalciferol.



No espectro da PCL e das nanopartículas incorporadas com o colecalciferol, foi identificada uma banda intensa em 1741 cm^{-1} , a qual corresponde à vibração de deformação axial do grupamento $\text{C}=\text{O}$ específico de ésteres, presentes na estrutura do PCL, sendo que esta banda não está presente no espectro do fármaco, pela ausência de um grupamento éster em sua estrutura. O estiramento que aparece em 1638 cm^{-1} , no espectro do colecalciferol e no espectro das nanopartículas, e ausente no espectro do polímero, mostra um estiramento característico de $\text{C}=\text{C}$, demonstrando uma intensidade atipicamente pequena. Em 1174 cm^{-1} , no espectro do PCL é possível visualizar um estiramento característico de ésteres alifáticos maiores que propionato corroborando com a estrutura deste polímero. O espectro do colecalciferol em 1051 cm^{-1} mostra um estiramento $\text{C}-\text{O}$ característico de álcool em anéis de seis membros, sendo que no espectro do PCL este estiramento $\text{C}-\text{O}$ pode ser visualizado em 1044 cm^{-1} , característico de ésteres de álcool primário.

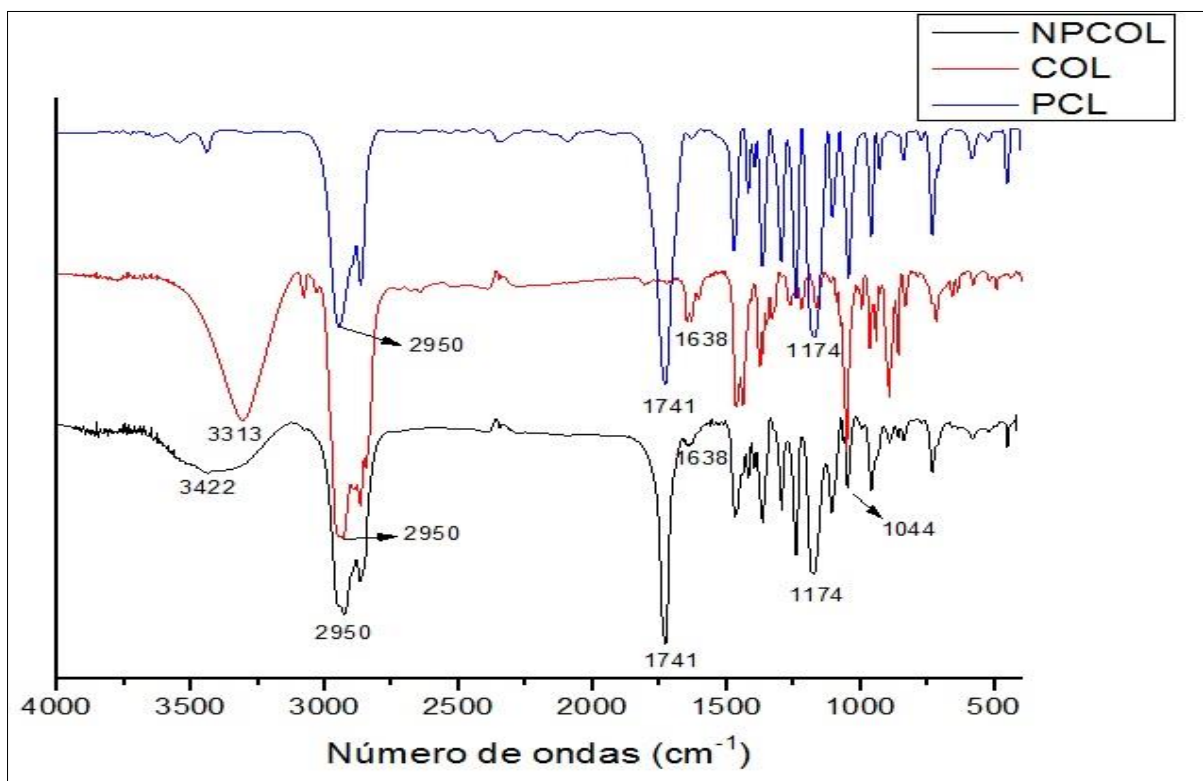
O estiramento mais importante para o colecalciferol pode ser observado em 3313 cm^{-1} . Sendo que, no espectro das nanopartículas observa-se um deslocamento deste sinal, observado em 3422 cm^{-1} , para um maior número de onda, indicando que o fármaco deixou de interagir com ele mesmo e passou a interagir com outra substância, provavelmente com o polímero, o que é um indicativo da presença do colecalciferol incorporado ao sistema polimérico nanométrico (Figura 17).

Figura 17: Espectro IVTF das NPCOL.



Na figura 18 podemos comparar os espectros IVTF das nanopartículas poliméricas contendo colecalciferol, as nanopartículas inertes e o colecalciferol.

Figura 18: Espectro IVTF comparativo das NPCOL, NP0 e colecalciferol.



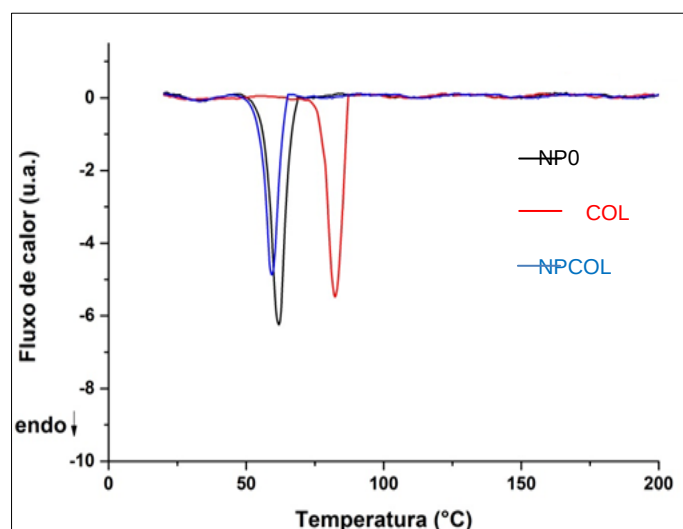
5.5 ANÁLISE TÉRMICA

A Calorimetria diferencial exploratória (DSC) é um dos métodos mais aplicados para o estudo das interações físico-químicas que podem ocorrer entre os polímeros utilizados e o fármaco. Esta técnica é capaz de elucidar se o fármaco está em seu estado amorfo ou cristalino e se o processo de nanoencapsulação modifica a temperatura de fusão do polímero (BERNABEU et al.; 2014).

A Figura 19 mostra a curva DSC do colecalciferol e das nanopartículas poliméricas contendo colecalciferol e inertes. O colecalciferol apresentou temperatura de fusão de 83,0°C, na literatura o ponto de fusão descrito por Medeiros (2013), foi de 84,25°C. O pico de fusão do colecalciferol desapareceu nas nanopartículas incorporadas, indicando que o fármaco está no estado amorfo ou dissolvido em um núcleo lipídico. Estes dados estão de acordo com os resultados verificados no teste de DRX, em que os picos de difração cristalina do fármaco foram reduzidos nas formulações de nanopartículas.

O ponto de fusão das NPCOL e NP0 foi de 60,2°C e 61,4°C, respectivamente. O polímero utilizado nas formulações foi o PCL, que é considerado um polímero termoplástico com uma temperatura de fusão relativamente baixa entre 59°C à 64°C. Portanto, os valores encontrados correspondem ao ponto de fusão descrito na literatura por Shah et al. (2008).

Figura 19: Termograma obtido por DSC do colecalciferol, NPCOL e NP0.

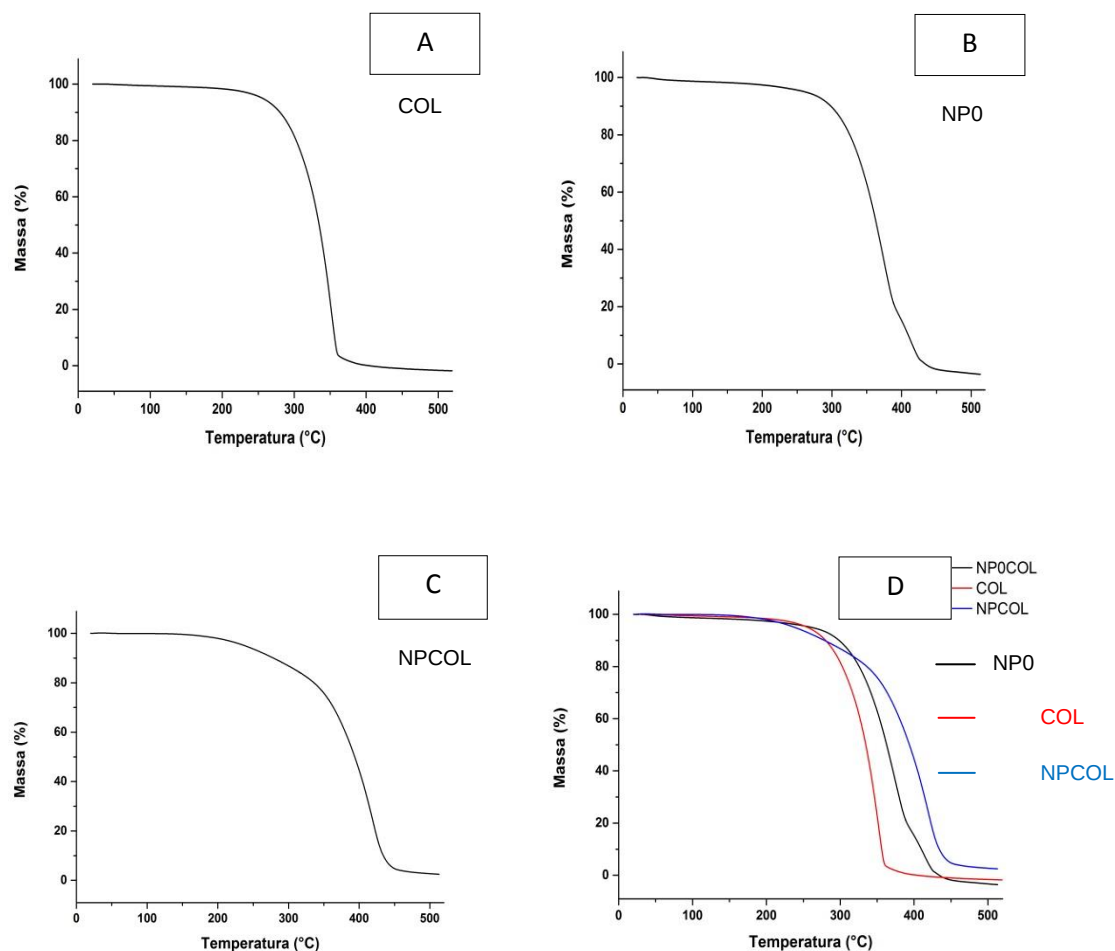


A ausência de picos exotérmicos nas análises de DSC das nanopartículas indica pouca ou nenhuma interação entre o fármaco e o polímero. Estes resultados indicam que não houve interação entre os componentes da formulação. Kumar, Verma e Singh (2015) obtiveram resultados semelhantes.

A análise termogravimétrica é muito utilizada para definir a estabilidade térmica e a ativação de energia relacionado com a cinética de decomposição do estado sólido das nanopartículas (DOGAN, TEMIZKAN, KAYA, 2015). As curvas obtidas no TGA permitem observar as alterações que o aquecimento pode provocar nos materiais e determinar a temperatura em que os produtos começam a se decompor, além de permitir o acompanhamento das reações de desidratação, oxidação, combustão, decomposição dos materiais (DIAS, 2013).

A curva de TGA (Figura 20) demonstrou que a degradação térmica do colecalciferol inicia-se em torno de 221,0 °C, apresentando uma única etapa de decomposição que ocorre na faixa de 221,0°C a 350,0°C (Figura 20-A). Resultados semelhantes foram descritos por Medeiros (2013), quando realizou o teste termogravimétrico no colecalciferol puro. As NP0 que contém somente o polímero PCL, apresentaram um único evento de decomposição térmica, na faixa de temperatura de 274,0°C a 456,0°C (Figura 20-B), estudos realizados por Kim et al (2014) e Hoque et al (2014), trazem resultados semelhantes da temperatura de decomposição do PCL. Na Figura 20-C, está representada a curva de TGA das NPCOL, o início da decomposição foi em 180°C a 456°C. O perfil de decomposição das NPCOL foi semelhante ao da curva da PCL, porém com início em 180 °C com extensão maior do intervalo de decomposição, demonstrando que a incorporação do colecalciferol em um sistema nanoestruturado protege o colecalciferol da degradação térmica. A figura 20-D compara as curvas de TGA realizadas.

Figura 20: Curva de TGA do colecalciferol (A); NP0 (B), NPCOL (C) e comparativo (D).



5.6 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO DO COLECALCIFEROL POR CLAE

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é o método analítico de escolha para a maioria dos estudos de permeação, por ser uma metodologia seletiva e de alta sensibilidade. Em teste *in vitro* a quantidade de fármaco a ser analisada é muito pequena, por este motivo a CLAE se encaixa perfeitamente nos requisitos necessários (SILVA et al.; 2010), para o objetivo deste trabalho.

No desenvolvimento e validação do método analítico por CLAE para quantificação do Colecalciferol presente nas nanopartículas, foram testadas diferentes fases móveis empregando metanol, acetonitrila e água, com base nos métodos descritos na literatura. Diversos sistemas de gradiente e tempos de análise foram testados, como também várias proporções no modo isocrático. O melhor

resultado obtido foi com a fase móvel de metanol:água (98:2 v/v) e vazão de 1,2 mL.min⁻¹. O tempo de análise foi de 10 minutos e o tempo de retenção de 7,3 minutos.

Podemos observar que o método proposto neste estudo esta de acordo com estudos realizados por Paucar (2016) e Salo-Väänänen et al. (2000), que também quantificaram o colecalciferol por CLAE. O tempo de retenção corrobora com estudos realizados por Paucar (2016), em sua metodologia utilizando como fase móvel metanol:acetonitrila (90:10) com vazão de 1,6 mL/min o tempo de retenção foi de 7,3 minutos. Salo-Väänänen et al. (2000), utilizaram como fase móvel metanol:água (93:7), com vazão de 1 mL/min, o tempo de retenção neste estudo foi de 16 minutos.

5.6.1 Validação do Método Analítico

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

5.6.1.1 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).

Garante que o tempo de retenção seja exclusivamente do analito de interesse, de modo a não comprometer a linearidade, a precisão e a exatidão (RIBANI, et al., 2004).

Os resultados mostram que não há interferência na quantificação e no tempo de retenção do colecalciferol. Sendo assim, é possível confirmar a especificidade do método proposto.

5.6.1.2 Linearidade

A linearidade de um 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).

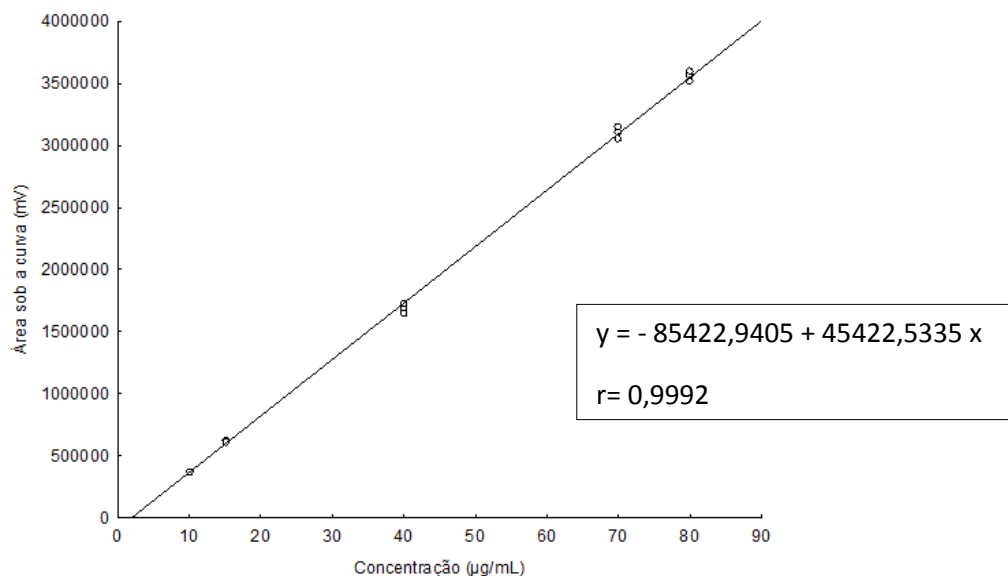
A linearidade do método foi avaliada por meio de cinco níveis de concentração. Os resultados estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5: Resumo dos parâmetros da curva de calibração.

	Colecalciferol
Faixa Linear ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	10 - 80
Limite de detecção ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0.15
Limite de Quantificação ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0.52
Dados de regressão*	
<i>N</i>	3
Inclinação (<i>a</i>)	45422.53
Desvio Padrão da Inclinação	647.30
Desvio Padrão Relativo da Inclinação (%)	1.42
Intercepto (<i>b</i>)	-85422.94
Coefficiente de Correlação (<i>r</i>)	0.9992

Foi observada relação linear entre a área do pico e a concentração do COL em uma faixa de concentração de 10,0 a 80,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Figura 21). A equação linear obtida foi $y = -85422,9405 + 45422,5335x$, $r = 0,9992$, onde *y* é o pico da área e *x* é a concentração da solução padrão em $\mu\text{g/mL}$. Um coeficiente de correlação adequada ($r = 0,9992$) foi registrado, o que demonstra que o método é linear com o valor próximo de 1 no intervalo proposto. O Desvio Padrão Relativo (DPR) da inclinação foi de 1,42 %, estando de acordo com o limite proposto pelo ICH e pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) de até 5 %.

Figura 21: Representação gráfica da curva analítica média para a determinação do colecalciferol em metanol 98% obtida por CLAE ($\lambda = 265$ nm).



De acordo com o *Analytical Methods Committee*, um valor de coeficiente de correlação próximo a 1 não é necessariamente o resultado de relação linear, e por isso, deve ser aplicado o teste de falta de ajuste (*lack of fit*). Este teste avalia a variação dos valores residuais (HADAD; EMARA; MAHMOUD, 2009). O teste ANOVA para a linearidade está apresentado na Tabela 6. Para a falta de ajuste, o valor de F foi menor que o valor de F tabelado, para o intervalo de 95% de confiança ($\alpha = 0,05$), portanto, a regressão linear não apresentou falta de ajuste (KLEIN; LONGHINI; DE MELLO, 2012).

Tabela 6. Resultado de ANOVA para linearidade do método

Colecalciferol	SS	df	MS	F	F _{tab}
Modelo	7.372454×10^{13}	1	7,372454E+13	11278.06	4.600
Resíduo	$9,151783 \times 10^{10}$	14	6,536988E+09	Linear	-
Falta de ajuste	$2,402060 \times 10^{10}$	4	6,005150E+09	0.889688	3.478
Erropuro	$1,079363 \times 10^{10}$	10	1,079363E+09	Não há falta de ajuste	-

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

5.6.1.3 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 o LD e LQ, foram $0,15 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $0,52 \mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente, indicando uma boa sensibilidade do método para a determinação do colecalciferol.

5.6.1.4 Precisão

Repetibilidade expressa à precisão sob as mesmas condições de operação durante um curto intervalo de tempo. Foi avaliada a precisão intermediária, expressa como variação intra-dia e inter-dia. O teste T avalia a existência de qualquer diferença entre os diferentes níveis de um fator. Até 5% não há diferença significativa na área do pico e no tempo de retenção do colecalciferol. O DPR para repetibilidade nas seis concentração de $40 \mu\text{g.mL}^{-1}$ foi de 0,42 %. Quanto à precisão intermediária intra-dia, o valor de DPR foi de 1.16 % e inter-dia 1,13%. Os resultados são apresentados na Tabela 7, confirmando a precisão do método desenvolvido.

Tabela 7 - Dados da repetibilidade e preciso intermediária para análise do Colecalciferol.

	Concentração teórica ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$, $\pm$ DP*)	DPR** (%)
Repetibilidade(n = 6)	40.0	40.07 ± 0.45	0.42
Precisão intermediária			
Intra-dia (n = 3)	40.0	40.35 ± 0.46	1.16
Inter-dia (n = 3)	40.0	40.52 ± 0.45	1.13

*DP: desvio padrão; ** DPR: desvio padrão relativo.

5.6.1.5 Exatidão

A exatidão do método por ensaios de recuperação foi determinada pela

preparação de uma amostra com quantidade conhecida de Colecalciferol. A % média de recuperação $\pm$ DP e DPR foram $102,87 \pm 9,84$ e $4,78$ %, respectivamente. Portanto, estes resultados indicam que o método proposto é considerado exato.

Esta percentagem de recuperação foi expressa entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente, com critérios de aceitação compreendido entre os valores de 95 e 105% de recuperação, o resultado obtido está de acordo com a exigência da ANVISA, 2003.

5.6.1.6 Robustez

A robustez de um método analítico indica a confiabilidade do método frente a pequenas variações dos parâmetros analíticos. Para a avaliação da robustez, o fluxo de $1,200 \text{ mL.min}^{-1}$ e a fase móvel metanol:água 98:2 (v/v) foram consideradas condições padrão. O teste Tukey a nível de 5 % mostrou que não houve diferença significativa na área do pico e o tempo de retenção do COL quando a taxa de fluxo variou de $1,200 \text{ mL.min}^{-1}$ para $1,205 \text{ mL.min}^{-1}$ (DPR = 0,13 %) e para $1.005 \text{ mL.min}^{-1}$ (DPR = 0,18 %), e quando a concentração da fase móvel variou de 98:2 (v/v) para 97:3 (v/v) (DPR = 0,11 %) e para 99:1 (v/v) (DPR = 0,02 %). Portanto, o método provou ser robusto para o fármaco analisado, sob as condições avaliadas.

5.7 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE COLECALCIFEROL INCORPORADO NAS NANOPARTÍCULAS E EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO

O método analítico desenvolvido e validado foi utilizado para avaliar a eficiência de encapsulação do colecalciferol na suspensão de nanopartículas poliméricas. Pelo método indireto foi possível determinar a eficiência de encapsulação. Os resultados da concentração do fármaco incorporado às nanopartículas ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) e a eficiência de encapsulação (%), estão descritos na Tabela 8.

Tabela 8: Teor de colecalciferol encapsulado e eficiência de encapsulação método indireto.

Amostra	Concentração teórica ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	COL não encapsulado ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	EE(%)
NPCOL	100.000,00	2.000,00 ($\pm 5,85$)	98 %

NPCOL:nanopartículas de colecalciferol; EE: eficiência de encapsulação.

Considerando o conteúdo do fármaco, a formulação apresentou concentração com valores muito próxima ao teórico, indicando que praticamente não houve perda durante sua preparação. Além disso, a formulação apresentou eficiência de encapsulação de 98,0%, o que está relacionado à baixa solubilidade aquosa do fármaco, acarretando assim um aumento da concentração do fármaco incorporada à nanopartículas. Os testes foram realizados em triplicata.

De acordo com Mora-Huertas et al. (2010), este método de preparação das nanopartículas é um dos que apresenta melhores resultados em relação à Eficiência de Encapsulação, alcançando valores iguais ou superiores a 80%. Não há relatos na literatura de Eficiência de encapsulação de colecalciferol utilizando polímero PCL.

Alguns pesquisadores descreveram estudos com fármacos lipofílicos utilizando o método de nanoprecipitação. Blouza et. al (2006), obtiveram percentagens de eficiência de encapsulação de 96,21% para nanocápsulas de PCL carregadas com espirolactona, Outro trabalho descrito por Noronha et al. (2013), com nanocápsulas de PCL carregadas com α -tocoferol a eficiência de encapsulação variou de 75,55% a 99,97%.

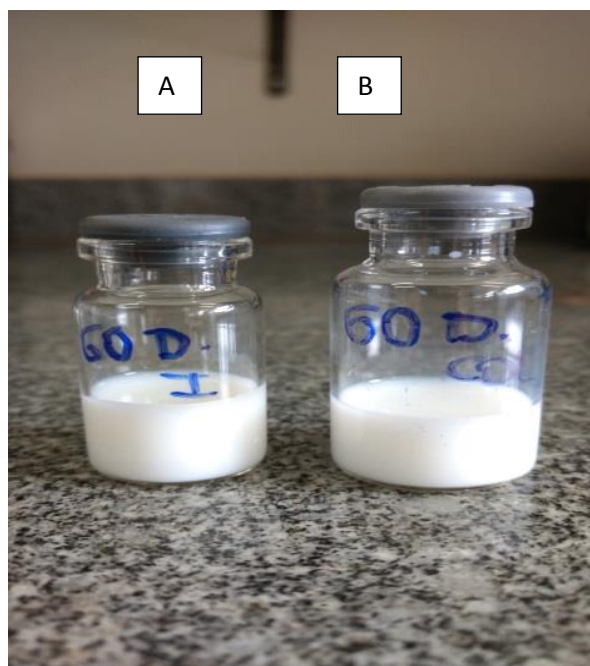
5.8 ESTUDO DE ESTABILIDADE DAS SUSPENSÕES DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS

A estabilidade físico-química das suspensões poliméricas foi avaliada após 60 dias de armazenamento, à temperatura ambiente e protegida da incidência de luz.

Os parâmetros de pH, tamanho médio de partícula (nm), índice de polidispersão e potencial zeta (mV) foram avaliados para todas as formulações. Todos os dados foram tratados com programa estatístico *t-student*.

Na avaliação macroscópica, as suspensões poliméricas NP0 e NPCOL (Figura 22 A e B respectivamente) não apresentaram alteração de cor ou formação de precipitado, se mantendo com o mesmo aspecto do tempo zero (Figura 10).

Figura 22: Suspensão de NP0 (A) e NPCOL (B), após 60 dias de armazenamento.



Fonte: a autora.

Na Tabela 9, podemos comparar os resultados obtidos para as NP0 e NPCOL logo após a preparação (tempo zero) e após armazenamento de 60 dias.

Tabela 9: Comparação dos resultados obtidos das NP0 e NPCOL tempo=0 e 60 dias de armazenamento.

Nanopartículas poliméricas	DM (nm) $\pm$ DP	IPD $\pm$ DP	PZ (mV) $\pm$ DP	pH $\pm$ DP
NP0 t=zero	244,0 $\pm$ 3,60	0,20 $\pm$ 0,06	-31,9 $\pm$ 1,04	6,1 $\pm$ 0,10
NP0 t=60 dias	269,1 $\pm$ 2,88	0,24 $\pm$ 0,04	-36,7 $\pm$ 2,69	5,7 $\pm$ 0,66
NPCOL t=zero	265,8 $\pm$ 3,72	0,22 $\pm$ 0,01	-32,7 $\pm$ 1,57	6,1 $\pm$ 0,10
NPCOL t=60 dias	274,0 $\pm$ 3,76	0,23 $\pm$ 0,07	-37,4 $\pm$ 2,09	5,6 $\pm$ 0,54

DM: Diâmetro médio; IPD: Índice de polidispersão; PZ: Potencia zeta; DP: Desvio padrão

Pode-se observar que houve um aumento significativo ($p < 0,05$) do tamanho das nanopartículas, entretanto as nanopartículas permaneceram com tamanho adequado para aplicação tópica.

Logo após o preparo os diâmetros médios foram de 244,7 nm (NP0) e 265,8 (NPCOL). Após os 60 dias de estudo os diâmetros foram de 269,1 nm (NP0) e 274,0 nm (NPCOL). O aumento do tamanho de nanopartículas também foi observado em outros estudos de estabilidade, como os realizados por Kulkamp et al. (2009), que observou aumento nas nanocápsulas poliméricas com ácido lipóico e Gomes (2015), que apresentou aumento nas nanopartículas poliméricas de cilostazol.

Os resultados do potencial zeta apontaram aumento significativo ($p < 0,05$) nos valores das suspensões avaliadas. Os valores encontrados se apresentaram mais negativos após 60 dias, variando de -31,9 mV no tempo 0 para -36,7 mV após 60 dias. Este resultado é indicativo da ionização de grupos ácido da parede polimérica. Este aumento também foi descrito no trabalho realizado por Kulkamp et.al. (2009), onde foi observado um aumento significativo do potencial zeta, após 28 dias de armazenamento de nanopartículas de ácido lipoico.

Com relação ao índice de polidispersão, foi possível verificar que não houve variação estatística ($p > 0,05$) para as formulações, após 60 dias de armazenamento. O IPD obtido no estudo apresenta homogeneidade nas formulações após 60 dias de armazenamento, este resultando é considerado positivo, pois demonstra que neste período não ocorreu aglomeração das nanopartículas. Nas nanopartículas inertes os valores foram: 0,2 (tempo zero) e 0,24 (60 dias) e para as nanopartículas de colecalciferol os valores obtidos foram de 0,22 (tempo zero) e 0,23 (60 dias).

Valores de pH das nanopartículas recém-preparadas para ambas as formulações NP0 e NPCOL foram de 6,1 e no entanto, após 60 dias de armazenamento observou-se uma redução significativa ($p < 0,05$) no valor do pH, sendo que as NP0 apresentaram pH de 5,7 e as NPCOL pH de 5,6.

De acordo com Schaffazick et al. (2003), a diminuição dos valores de pH de suspensões coloidais poliméricas, em um curto período de tempo pode estar relacionada tanto à ionização de grupos carboxílicos presentes no polímero, quanto à hidrólise, dependendo da hidrofiliabilidade do poliéster.

A presença do colecalciferol das NPCOL também foi avaliada após 60 dias e os resultados obtidos mostram que houve uma pequena redução no teor de colecalciferol, de 98% para 96%, indicando que, nas condições em que foi armazenado, o colecalciferol se manteve encapsulado. Mostrando a eficiência do sistema polimérico em encapsular o colecalciferol, protegendo da degradação.

Tabela 10: Teor de colecalciferol encapsulado e eficiência de encapsulação nanopartículas recém preparadas após 60 dias – método indireto.

Amostra	Concentração teórica ($\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$)	COL não encapsulado ($\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$)	EE(%)
NPCOL – tzero	100.000,00	20,00 ($\pm 6,09$)	98%
NPCOL – 60 dias	100.000,00	40,00 ($\pm 7,00$)	96%

Souza e colaboradores (2012) desenvolveram nanocápsulas de poli- ϵ -caprolactona contendo herbicida atrazina, obtendo uma eficiência de encapsulação logo após o preparo com valores que variaram de 89,4 a 94,3% e 30 dias de armazenamento os valores encontrados de eficiência de encapsulação foram de 73,5 a 92,3%.

5.9 PERMEAÇÃO CUTÂNEA

A permeação cutânea é uma das principais etapas no desenvolvimento de novas formas farmacêuticas de liberação transdérmica de fármacos, pois é através deste teste que é possível prever ou escolher as melhores formulações para obtenção de um excelente desempenho *in vivo*. (GODIN; TOUITOU, 2007).

A literatura não nos traz nenhum estudo relacionando ao colecalciferol nanoencapsulado (NPCOL) para aplicação transdérmica. A solução receptora nos testes *in vitro* onde o fármaco apresenta baixa solubilidade aquosa, como o colecalciferol, se faz necessário o uso de surfactantes ou solventes orgânicos para garantir a solubilidade adequada podem ser utilizados para a manutenção da condição *sink* (SHAH et al., 1999).

A condição *sink*, foi a que atingida utilizando-se 1% de tween 80 e solução hidroalcoólica na proporção de água:metanol (70:30 v/v).

Os valores obtidos por CLAE, da permeação do colecalciferol livre e do colecalciferol nanoencapsulado estão apresentados na Tabela 11. Esta demonstra que houve permeação cutânea tanto do colecalciferol livre quanto do colecalciferol nanoencapsulado (NPCOL). É provável que a permeação tenha se dado por difusão ao longo dos espaços intercelulares com uma penetração lenta (MOZER, 2001; VIEIRA, 2007), ou, ainda, através da via anexial (glândulas sudoríparas, folículos pilosos e glândulas sebáceas), que transpassam da camada

derme até o estrato córneo (CEVC, 2010), onde a epiderme é considerada mais permeável (VIEIRA, 2007).

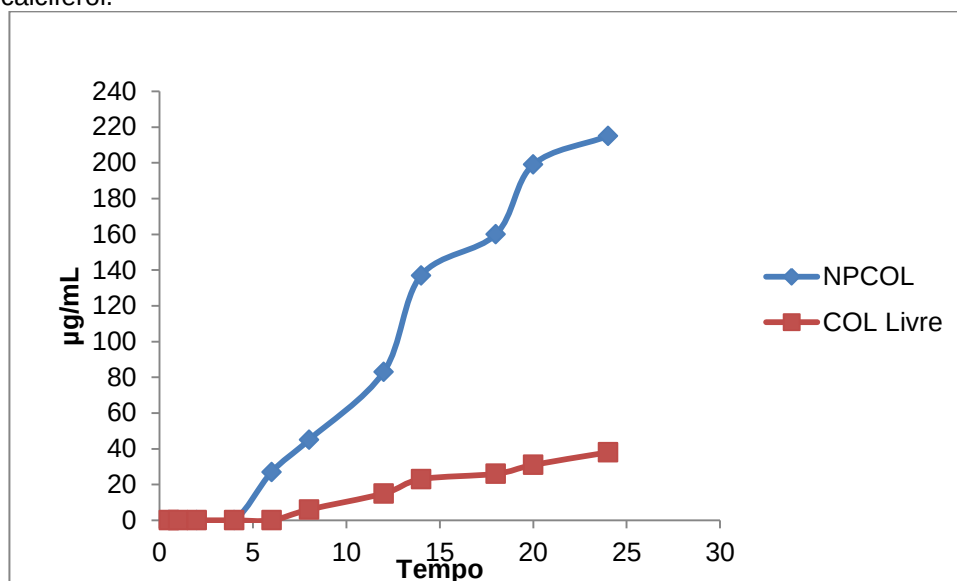
Tabela 11: Quantificação do COL na solução receptora após permeação cutânea do colecalciferol livre e nanoencapsulado

Tempo	NPCOL ($\mu\text{g/mL}$)	%	COL livre ($\mu\text{g/mL}$)	%
0,5	0	-	0	-
1	0	-	0	-
2	0	-	0	-
4	0	-	0	-
6	$27,9 \pm 4,7$	2,8	0	-
8	$45,0 \pm 6,7$	4,5	$6,2 \pm 3,9$	0,6
12	$83,6 \pm 4,0$	8,4	$15,0 \pm 5,7$	1,5
14	$137,1 \pm 6,8$	13,7	$23,8 \pm 7,2$	2,4
18	$160,0 \pm 2,9$	16,0	$26,6 \pm 4,6$	2,7
20	$199,2 \pm 5,0$	19,9	$31,1 \pm 3,8$	3,1
24	$215,0 \pm 3,5$	21,5	$38,0 \pm 4,6$	3,8

NPCOL: nanopartículas de colecalciferol; COL: colecalciferol

Pode-se observar que o colecalciferol livre apresentou um percentual baixo de permeação cutânea, tendo sido detectado 0,6% em 8 horas e após 24 horas 3,8% de permeação. Por outro lado, o colecalciferol nanoencapsulado (NPCOL), apresentou um perfil de liberação lento, sem a presença do pico inicial (*burst*), que ocorre devido a liberação do fármaco presente na superfície das nanopartículas, fazendo com que sejam eliminados rapidamente. Seu tempo inicial de detecção pela CLAE (*time lag*) foi de aproximadamente 6 horas. Em seguida a liberação prossegue a uma taxa crescente. No final de 24 horas a concentração de colecalciferol detectada foi de 21,5%. O perfil de permeação cutânea do colecalciferol livre e nanoencapsulado (NPCOL) está representado na Figura 23.

Figura 23: Perfil da permeação cutânea in vitro do colecalciferol livre e das nanopartículas poliméricas de colecalciferol.



Comparando-se a permeação do colecalciferol livre com o colecalciferol nanoencapsulado (NPCOL), as NPCOL conseguiram transpor a barreira cutânea e promover a permeação do colecalciferol de maneira eficiente, sendo que a permeação transdérmica do colecalciferol nanoencapsulado foi 5,7 vezes maior que a do colecalciferol livre.

Estes resultados indicam que as nanopartículas poliméricas de PCL constituem um sistema adequado para veiculação do colecalciferol para absorção percutânea, o que era esperado considerando-se as características da PCL de aumentar a solubilidade de fármacos hidrofóbicos, permitindo que este seja liberado da matriz por difusão (FORREST et al., 2007).

6 CONCLUSÕES

Os resultados apresentados neste trabalho permitem concluir que a PCL foi um polímero adequado para a nanoencapsulação de colecalciferol pelo método de deposição interfacial do polímero e que as nanopartículas obtidas apresentaram diâmetro adequado, formas esféricas, com superfícies lisas e homogeneidade na distribuição de tamanho, baixo índice de polidispersão, potencial zeta negativo e um ótimo percentual de encapsulação.

O método analítico desenvolvido e validado por CLAE mostrou-se seletivo, linear, preciso, exato e robusto para a quantificação do colecalciferol. Os resultados dos raios X revelaram uma diminuição da cristalinidade das nanopartículas e possível encapsulação do fármaco, devido ao desaparecimento dos picos do fármaco puro.

Os espectros revelados por microscopia na região do infravermelho demonstraram que não ocorreram reações químicas entre o colecalciferol e o polímero durante o processo de nanoencapsulação. As nanopartículas poliméricas contendo colecalciferol se mantiveram estáveis no período de estudo, mantendo suas características apropriadas para aplicação tópica.

O ensaio *in vitro* de permeação cutânea mostrou que as NPCOL foram capazes de carrear o colecalciferol de forma efetiva através da pele, comprovando que a nanoencapsulação do colecalciferol em PCL é uma excelente estratégia para reposição contínua deste fármaco por via transdérmica em pacientes com deficiência de vitamina D.

A utilização desta tecnologia de entrega controlada de fármacos, encapsulando o colecalciferol no polímero PCL, pode ser considerada uma excelente estratégia para reposição contínua deste fármaco, visando manter constante níveis de colecalciferol na corrente sanguínea através de uma aplicação diária, indolor e evitando passagem pelo sistema digestivo. Desta forma, foi alcançado o objetivo principal que é a manutenção de níveis de vitamina D para manutenção das funções vitais do organismo.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-MOTTLEB, M. M.; NEUMANN, D.; LAMPRECHT, A. In vitro drug release mechanism from lipid nanocapsules (LNC). **International Journal of Pharmaceutics**, v. 390, p. 208-213, 2010.
- AL HAUSHEY, L.; BOLZINGER, M. A.; BORDES, C.; GAUVRIT, J. Y.; BRIANÇON, S. Improvement of a bovine serum albumin microencapsulation process by screening design. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 344, p. 6-25, 2007.
- ALDELRAZEK, 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**, v. 3, p. 10-15, 2015.
- ALVES, M. P.; SCARRONE, A. L.; SANTOS, M.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Human skin penetration and distribution of nimesulide from hydrophilic gels containing nanocarriers. **International journal of pharmaceutics**, v. 341, p. 215-220, 2007.
- ANIGBOGU, A. N. C.; WILLIAMS, A. C.; BARRY, B. W.; EDWARDS, H. G. M. Fourier transform raman spectroscopy of interactions between the penetration enhancer dimethyl sulfoxide and human stratum corneum. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 125, p. 265-282, 1995.
- ANSARI, K. A. Cyclodextrin-based nanosponges for delivery of resveratrol: *in vitro* characterization, stability, cytotoxicity and permeation study. **American Association of Pharmaceutical Scientists**, v. 12, p. 279-286, 2011.
- ANTONOW, M. B. **Desenvolvimento tecnológico e avaliação dos perfis de liberação in vitro de suspensões contendo nanocápsulas de desonida com diferentes polímeros**. 2012, 100 f. Tese (Mestrado em Nanociências) – Centro Universitário Franciscano de Santa Maria, Santa Maria, 2012.
- ARABI, A.; EL-RASSI, R.; EL-HAJJ, F. G. Hypovitaminosis D in developing countries prevalence, risk factors and outcomes, **Nature reviews Endocrinology**, v. 6, p. 550-561, 2010.
- ASHWELL, M.; STONE, E. M.; STOLTE, H.; CASHMAN, K. D.; MACDONALD, H.; LANHAM-NEW, S.; HIOM, S.; WEBB, A.; FRASER, D. UK Food standards Agency Workshop Report: an investigation of the relative contributions of diet and sunlight to vitamin D status. **The British Journal of Nutrition**, v. 104, p. 603-611, 2010.
- AVADI, M. R.; SADEGHI, A. M. M.; MOHAMMADPOUR, N.; ABEDIN, S.; ATYABI, F.; DINARVAND, R.; RAFIEE-TEHRANI, M. Preparation and characterization of insulin nanoparticles using chitosan and arabic gum with ionic gelation method. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 6, p. 58–63, 2010.
- AZOUZ, L. H.; DAHMOUNE, F.; REZGUI, F.; G'SELL, C. Full factorial design optimization of inflammatory drug release by PCL-PEG-PCL microspheres. **Materials Science and Engineering C**, v. 58, p. 412-419, 2016.

BALEST, P. **Caracterização e estudo de estabilidade de suspensões de nanocápsulas poliméricas contendo óleo de pequi (Caryocar brasiliense Camb).** 2013, 62 f. Tese (Bacharel em Farmácia) – Faculdade de Ceilândia, Ceilândia, 2013.

BALL, G. F. M. Fat-Soluble Vitamin Assays in Food Analysis. A **Comprehensive Review**; Elsevier Science Publishers Ltd.; England, 2° ed, 1998.

BECK, R. C. R.; GUITERRES, 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.

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.

BLAND, R.; MARKOVIC, D.; HILLS, C. E.; HUGHES, S. V.; CHAN, S. L.; SQUIRES, P. E. Expression of 25-hydroxvitamin D3-alpha-hydroxylase in pancreatic islets. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 89-90, p. 121-125, 2004.

BLOUZA, I. L.; CHARCOSSET, C.; SFAR, S.; FESSI, H. Preparation and characterization of spironolactone-loaded nanocapsules for pediatric use. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 325, p. 124-131, 2006.

BOUILLON, R.; CARMELIET, G.; VERLINDERN, L.; ETEN, E. V.; VERSTUYF, A.; LUDERER, H. F.; LIEBEN, L.; MATHIEU, C.; DEMAY, M. Vitamin D and human health: lessons from vitamin D receptor null mice, **Endocrine Reviews**, v. 29, p. 726-776, 2008.

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: 16 jul. 2016.

BROW, C. K.; CHOKSHI, H. P.; NICKERSON, B. Acceptable analytical practices for dissolution testing of poorly soluble compounds. **Pharmaceutical Technology**, p. 56-65, 2004.

BUZEA, C.; BLANDINO, I. I.; ROBBIE, K. Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. **Biointerphases**, v. 2, p. MR17-MR172, 2007.

CALATAYUD, M.; JÓDAR, E.; SÁNCHEZ, R.; GUADALIX, S.; HAWKINS, F. Prevalence of deficient and insufficient vitamin D levels in a young healthy population. **Endocrinologia y nutrición**, v. 56, p. 164-169, 2009.

CALVO, P.; VILA-JATO, J. L.; ALONSO, M. J. Comparative *in vitro* Evaluation of Several Colloidal Systems, Nanoparticles, Nanocapsules, and Nanoemulsion, as ocular carriers. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 85, p. 530-536, 2000.

CASTRO, A. P. M.; SOLÉ, D. ROSÁRIO, N. A. F.; JACOB, C. M. A.; RIZZO, M. C. F. V.; FERNANDES, M. F. M.; VALE, S. O. R. Guia prático para o manejo da dermatite atópica: opinião conjunta de especialistas em alergologia da Associação Brasileira de Alergia e Imunopatologia e da Sociedade Brasileira de Pediatria. **Revista Brasileira Alergia e Imunopatologia**, v. 29, p. 369-282, 2006.

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 antioxiante implants. **Materials Science and Engineering C**, v. 58, p. 945-952, 2016.

CAZOA, A. N.; PEREIRA, E. R.; SILVA, M. F. G. F.; FERNANDES, J. B.; VIERIA, P. C.; PUHLB, A. C.; POLIKARPOVB, I.; FORIM, M. R. Nanopartículas de poli-ε-caprolactona carregadas com hidrocortisona: preparação usando planejamento fatorial e sua avaliação. **Orbital The Eletronic Journal of Chemistry**, v.4, p. 54-76, 2012.

CEVC, G. VIERL, U. Nanotechnology and the transdermal route: A sate of the art review and critical appraisal. **Journal of Controlled Release**. v. 141, p. 277-299, 2010.

CHAWLA, J. S.; AMIJI, M. M. Biodegradable poly(ε-caprolactone) nanoparticle for tumor-targeted delivery of tamoxifen. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 5, p. 127-138, 2002.

CHERNIACK, E. P.; FLOREZ, H.; ROOS, B. A.; TROEN, B. R.; LEVIS, S. Hypovitaminosis D in the elderly: from bone to brain. **The journal of nutrition helth and aging**, v. 12, p. 366-373, 2008

CHESNEY, R. W. Vitamin D and the Magic Mountain: the anti-infectious role of the vitamin, **Journal of Pediatrics**, v. 156, p. 698-703, 2010.

CHORILLI, M.; BRIZANTE, A. C.; RODRIGUES, C. A.; SALGADO, H. R. N. Aspectos gerais em sistemas transdérmicos de liberação de fármacos. **Revista Brasileira de Farmacologia**, v. 88, p. 7-13, 2007.

CLOGSTON, J. D.; PATRI, A. K. Characterization of nanoparticles intended for drug delivery. **McNeil, Scott E.** ed. New York: Humana Press. p. 269, 2011.

CUNHA, K. A.; MAGALHÃES, E. I. S.; LOUREIRO, L. M. R.; SANT'ANA, L. F. R.; RIBEIRO, A. Q.; NOVAES, J. F. Ingestão de cálcio, níveis séricos de vitamina D e obesidade infantil: existe associação?. **Revista Paulista de Pediatria**, v. 33, p. 222-229, 2015.

DALY, R. M.; GAGNON, C.; LU, Z. X.; MAGLIANO, D. J.; DUNSTAN, D. W.; SIKARIS, K. A.; ZIMMET, P. Z.; EBELING, P. R.; SHAW, J. E. Prevalence of vitamin

D deficiency and its determinants in Australian adults aged 25 years and older: a national, population-based study. **Clinical Endocrinology**, v. 77, p. 26-35, 2012.

DAWSON-HUGHES B.; MITHAL A.; BONJOUR, J. P.; BOONEN, S.; BURCKHARDT, P.; FULEIHAN, G. E.; JOSSE, R. G.; LIPS, P.; MORALES-TORES, J.; YOSHIMURA, N. IOF position statement: vitamin D recommendations for older adults. **Osteoporos International**, v. 7, p. 1151-1154, 2010.

DEEB, K. K.; TRUMP, D. L.; CANDACE, J. S. Vitamin D signaling pathways in cancer: potential for anticancer therapeutics. **Nature Reviews Cancer**, v. 7, p. 684-700, 2007.

DELUCA, H. F. Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 80, p.1689-1696, 2004.

DERAKHSHANDEH, K.; SOHEILI, M.; DADASHZADEH, S.; SAGHIRI, R. Preparation and *in vitro* characterization of 9-nitrocamptothecin-loaded long circulating nanoparticles for delivery in cancer patients. **International journal of nanomedicine**, v. 5, p. 463-471, 2010.

DEPLAS, A.; DEBIAIS, F.; ALCALAY, M.; BONToux, D.; THOMAS, P. Bone density, parathyroid hormone, calcium and vitamin D nutritional status of institutionalized elderly subjects. **The Journal of Nutrition Health and Aging**, v. 8, p. 400-405, 2004.

DESAI, N. Challenges in Development of Nanoparticle-Based Therapeutics. **The AAPS Journal**, v.14, p. 282-285, 2012.

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

DOBNIG, H.; PILZ, S.; SCHARNAGL, H.; RENNER, W.; SEELHORST, U.; WELLNITZ, B.; KINKELDEI, J.; BERNHARD, O.; BOEHM, B.O.; WEIHRAUCH, G.; MAERZ, W. Independent association of low serum 25-hydroxyvitamin D and 1,25-dihydroxyvitamin D levels with all-cause and cardiovascular mortality. **Archives of internal medicine**, v. 168, p. 1340-1349, 2008.

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

DURÁN, N.; MATOSSO, L. H. C.; MORAIS, P. C. **Nanotecnologia, introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação**. 1. ed. São Paulo: Artliber, p. 161-164, 2006.

EL MAGHRAOUI, A.; OUZZIF, Z.; MOUNACH, A.; REZQI, A.; ACHEMLAL, L.; BEZZA, A.; TELLAL, S.; DEHHAOUI, M.; GHOZLANI, L. Hypovitaminosis D and prevalent asymptomatic vertebral fractures in Moroccan postmenopausal women. **BMC Women's Health**, v. 12, p.11, 2012.

FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J. Dh.; AMMOURY, N.; BENITA, S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 55, n. 1, p. R1-R4, 1989.

FORREST, L. M.; YÁNEZ, J. A.; REMSBERG, C. M.; OHGAMI, Y.; KWON, G.S.; DAVIES, N. M.; Paclitaxel produgs with sustained release an high solubility in poly(ethylene glycol)- β -poly(ϵ -caprolactone) micelle nanocarriers pharmacokinetic dispositions tolerability, and cytotoxicity. **Pharmaceutical Research**, v. 25, p. 194-206, 2007.

FÖRSTER, M.; BOLZINGER, M. A.; FESSI, H.; BRIANÇON, S. Topical delivery of cosmetics and drugs.Molecular aspects of percutaneous absorption and delivery.**European Journal of Dermatology**, v.19, p. 309-323, 2009.

FRANZ, T. J. Percutaneus absorption on relevance of in citro data.**The journal of investigative dermatology**, v. 64, p. 190-195, 1975.

FREITAS, Z. M. F. **Avaliação bifarmacotécnica de formulações dermatológica semi-sólidas de cetoconazol**. 2005, 160 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

FREITAS, M. N.; MARCHETTI, J. M. Nimesulide PLA microspheres as a potential sustained release system for the treatment of inflammatory diseases.**International Journal of Pharmaceutics**,v. 295, p. 201-211, 2005.

GEMAR, B. N.; ENGELKE, J.; GANGNON, R.; RAMAMURTHY, R.; KRUEGER, D.; DREZNR, M. K. Evaluation of ergocalciferol or cholecalciferol dosing, 1,600 IU daily or 50,000 IU monthly in older adults. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 96, p. 981-988, 2011.

GIANNAVOLA, C.; BUCOLO, C.; MALTESE, A.; PAOLINO, D.; VANDELLI, M. A.; PUCLISI, G.; LEE, V. H. L.; FRESTA, M. Influence of Preparation Conditions on Acyclovir-Loaded Polu-d,l-Lactic Acid Nanosphres and effect of PEG Coating on Ocular Drug Bioavailability. **Pharmaceutical Research**, v. 20, p. 584-590, 2003.

GLADE, M. J., Vitamin D: Health panacea or false prophet? **Nutrition**,v. 29, p. 37-41, 2013.

GLOTH, F. M.; GUNDBERG, C. M.; HOLLIS, B. W.; HADDAD, J. G.; TOBIM, J. D. Vitamin D deficiency in homebound elderly persons. **JAMA**, v. 21, p. 1683-1686, 1995.

GODAR, D. E.; POPE, S. J.; GRANT, W. B.; HOLICK, M. F. Solar UV doses of young Americans and vitamin D3 production.**Environmental Health Perspectives**,v. 20, p. 139-143, 2012.

GODWIN, D. A.; MICHNIACK, B. B.; CREEK, K. E. Evalution of transdermal penetration enhancers using a novel skin alternative. **Journal of Pharmaceutical Science**, v. 86, p. 1001-1005, 1997.

GOMES, M. L. S. **Desenvolvimento e Caracterização de nanocápsulas poliméricas contendo cilostazol**. 2015, 81 f. Tese (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2015.

HADAD, G. M.; EMARA, S.; MAHMOUD, W. M. Development and validation of a stability-indicating RP-HPLC method for the determination of paracetamol with dantrolene or/and cetirizine and pseudoephedrine in two pharmaceutical dosage forms. **Talanta**, v. 79, p. 1360-1367, 2009.

HANLEY, D. A.; CRANNEY, A.; JONES, G.; WHITING, S. J.; LESLIE, W. D. Guidelines Committee of the Scientific Advisory Council of Osteoporosis Canada. Vitamin D in adult health and disease: a review and guideline statement from Osteoporosis Canada (summary). **CMAJ**, v. 12, p. 1315-1319, 2010.

HAUSSLER, M. R.; WHITFIELD, G. K.; HAUSSLER, C. A.; HSIEH, J. C.; THOMPSON, P. D.; SELZNICK, S. H.; S. H, DOMINGUES, C. E.; JURUTKA, P. W. The nuclear vitamin D receptor: biological and molecular regulatory properties revealed. **Journal of bone and mineral research**, v. 13, p. 325-349, 1998.

HEANEY, R. P.; DAVIES, K. M.; CHEN, T. C.; HOLICK, M. F.; BARGER-LUX, M. J. Human serum 25-hydroxycholecalciferol response to extended oral dosing with cholecalciferol. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 78, p. 204-210, 2003.

HENNING, A.; SCHAEFER, E. F.; NEUMANN, D. Potential pitfalls in skin permeation experiments: influence of experimental factors and subsequent data evaluation. **European Journal of Pharmaceutics and biopharmaceutics**, v. 2, p. 337-345, 2011.

HEWINSON, M. Antibacterial effects of vitamin D. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 7, p. 337-345, 2011.

HIGGINS, D. M.; WISCHMEYER, P. E.; QUEENSLAND, K. M.; SILLAU, S. H.; SUFIT, A. J. HEYLAND, D. K. Relationship of vitamin D deficiency to clinical outcomes in critically ill patients. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v.36, p. 713-720, 2012.

HILLMAN, L.S.; HADDAD, J. G. Human perinatal vitamin D metabolism I: 25-Hydroxyvitamin D in maternal and cord blood. **The Journal of pediatrics**, v. 84, p. 742-749, 1974.

HOLICK, M. F. The cutaneous photosynthesis of previtamin D3: a unique photoendocrine system. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 77, p. 51-58, 1981.

HOLICK, F.; McCOLLUM Award Lecture, 1994: Vitamin D-new horizons for the 21st century. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 60, p. 638S-45S, 1994.

HOLICK, M. Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease. **American Of Clinical Nutrition**, v. 80, p. 1678-1688, 2004.

HOLICK, M. F., Vitamin D Deficiency. **The New England Journal of Medicine**, v. 357, p. 266-281, 2007.

HOLICK, M. F.; BINKLEY, N. C.; BISCHOFF-FERRARI, H. A.; GORDON, C. M.; HANLEY, D. A.; HEANEY, R. P. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. **The Journal Clinical of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 96, p. 1911-1930, 2011.

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 enegineering applications. **Materials Letters**, v. 131, p. 255-258, 2014.

ICH - International Conference on Harmonization of Technical Requeriments for Registration of Pharmaceuticals for Human use: Q2B – Validation of analytical procedures: Text and methodology, ICH Steering Committee: Geneva, 2005. Disponível em: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf>. Acesso em: 12 nov 2016.

Institute of Medicine (IOM). Dietary Reference Intakes (DRIs) for calcium and vitamin D. Report at a glance 2011. Disponível em: <http://www.iom.edu/Reports/2010/Dietary-Reference-Intakes-for-Calcium-and-Vitamin-D/DRI-Values.aspx>.

KAMALY, N.; XIAO, Z.; VALENCIA, P. M.; RADOVIC-MORENO, A.; FAROKHZAD, O. C. Targeted polymeric therapeutic nanoparticles: design, development and clinical translation. **Chemical Society Reviews**, v. 41, p. 2971-3010, 2012.

KIELHORN, J.; MELCHING-KOLLMUB. S.; MANGELSDORF, I.; Environmental health criteria (EHC) 235: Dermal absorption Genebra: **World Health Organization (WHO)**, p. 6-36, 2006.

KIM, E. C.; HAN, K.; JEE, D. Inverse relationship between high blood 25-hydroxyvitamin D and late stage of age-related macular degeneration in a representative Korean population. **Investigative ophythamology e visual Science**, v. 55.p. 4823-4831, 2014.

KLEIN, T.; LONGHINI, R.; DE 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.

KOSHY, K. T.; BEYER, W. F. Vitamin D3 (cholecalciferol). **Analytical profile of drug substances**, v. 13, p. 656-707, 1984.

KREUTER, J. Nanoparticles – a historical perspective. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 331, p. 1-10, 2006.

KÜLKAMP, I.; PAESE, K.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R. Estabilização do ácido lipoico via encapsulação em nanocápsulas poliméricas planejadas para aplicação cutânea. **Química Nova**, v. 32, n. 8, 2009.

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.

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.

KUU, W. Y.; PRISCO, M. R.; WOOD, R. W.; ROSEMAN, T. J. Studies of dissolution behavior of highly soluble drugs using rotating basket. **International journal of pharmaceuticals**. v. 55, p. 77-89, 1989.

LAMBERT, G.; FATTAL, E.; PINTO-ALPHANDARY, H.; GULIK, A.; COUVREUR, P. Polyisobutylcyanoacrylate Nanocapsules Containing an Aqueous Core as a Novel Colloidal Carrier for the Delivery of Oligonucleotides. **Pharmaceutical Research**, v. 17, p. 707-714, 2000.

LANGER, R. Drug delivery and targeting. **Nature**, v. 392, p. 5-10, 1998.

LBOUTOUNNE, H.; CHAULET, J-F.; PLOTON, C.; FALSON, F.; PIROT, F. Sustained ex vivo skin antiseptic activity of chlorhexidine in poly(ϵ -caprolactone) nanocapsule encapsulated form and as a digluconate. **Journal of Controlled Release**, v. 82, p. 319-334, 2002.

LENZ, Q. F. **Determinação da atividade anti-inflamatória e antioxidante de formulações semissólidas contendo nanocápsulas de nimesulida**. 2009, 93 f. Tese (Mestrado Nanociência) – Centro Universitário Franciscano, Santa Maria, 2009.

LEONARDI, G. R.; GASPAR, L. R.; CAMPOS, P. M. B. G. M. Study of pH variation on the skin using cosmetic formulation with and without vitamins A, E or ceramide: by a non-invasive method. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.77, p. 563-569, 2002.

LEVINE, M. A. Normal Mineral homeostasis Interplay of Parathyroid Hormone and Vitamin D. **Endocrine development**, v. 6, p. 14-33, 2003.

LI, Q.; LIU, C. G.; HUANG, Z. H.; XUE, F. F. Preparation and characterization of nanoparticles based on hydrophobic alginate derivative as carriers for sustained release of vitamin D3. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 59, p. 1962-1967, 2011.

LI, S. D., HUANG, L. Pharmacokinetics and biodistribution of nanoparticles. **Molecular Pharmaceutics**, v. 5, n. 4, p. 496-504, 2008.

LI, Y. C.; KONG, J.; WEI, M.; CHEN, Z. F.; LIU, S. Q.; CAO, L. P. 1,25-Dihydroxyvitamin D(3) is a negative endocrine regulator of the renin-angiotensin system. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 110, p. 229-238, 2002.

LIMA, M. L.; ALBUQUERQUE, C. N. Preparo e caracterização de nanopartículas de poli(ε-caprolactona) contendo megazol, agente anti-chagásico. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 4, p. 493-498, 2012.

LIRA, A. A. M.; SESTER, E. A.; ABREU, L. R. P.; SILVA, L. B. L.; WANDERLEY, A. G.; SANTANA, D. P. Desenvolvimento preliminar de gel de lapachol: estudo de permeação *in vitro*. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 40, p. 35-41, 2004.

LIU, N. Q.; HEWINSON, M. Vitamin D, the placenta and pregnancy. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 523, p. 37-47, 2012.

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.

LU, Z.; YEH, T. K.; TSAI, M.; AU, J. L.; WIENTJES, M. G. Paclitaxel-loaded gelatin nanoparticles for intravesical bladder cancer therapy. **Clinical Cancer Research**, v.10, p. 7677-7784, 2004.

LUCENA, P. A. **Desenvolvimento e Caracterização de Nanopartículas Poliméricas Contendo Itraconazol**. 2014, 69 f. Tese (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Goiás, Goiania, 2014.

LUO, Y.; TENG Z.; WANG, Q. Development of zein nanoparticles coated with carboxymethyl chitosan for encapsulation and controlled release of vitamin D3. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 836-843, 2012.

MAEDA, S. S.; BORBA, V. Z. C.; CAMARGO, M. B. R.; SILVA, D. M. W.; BORGES, J. L. C.; BANDEIRA, F.; CASTRO, M. L. Recomendações da Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia (SEBM) para o diagnóstico e tratamento da hipovitaminose D. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 58, 2015.

MANCINI, G. **Nanotecnologia Aplicada a Formulação Tópicas de Fármacos Anti-inflamatórios Não Esteróides**. 2014, 231 f. Tese (Doutorado em Farmácia – Especialidade em Tecnologia Farmacêutica) - Universidade de Lisboa, Lisboa, 2014.

MARQUES, C. D. L. et al. A importância dos níveis de vitamina D das doenças autoimunes. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, p. 67-80, 2010.

MATHIEU, C.; ADORINI, L. The coming of age of 1,25-dihydroxyvitamin D(3) analogs as immunomodulatory agents. **Trends in Molecular medicine**, v. 4, p. 174-179, 2002.

MATSUOKA, L.; IDE, L.; WORTSMAN, J.; MACLAUGHLIN, J.; HOLICK, M. Sunscreens Suppress Cutaneous Vitamin D₃. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 64, p. 1165-1168, 1987.

MEDEIROS, L. A. **Desenvolvimento farmacotécnico de cápsulas de colecalciferol de potencial nutracêutico: um estudo comparativo com formulações magistrais**. 2013, 91f. Tese (Mestrado em Inovação Farmacêutica) – Universidade Federal de Pernambuco, 2013.

MEJIAS, S. Y.; CABRERA, C. N.; TOLEDO, F. A. M.; MACHADO, O. J. La nanotecnología y sus posibilidades de aplicación em el campo científico-tecnológico. **Revista Cubana de salud pública**. v. 35, p. 1-9, 2009.

MESQUITA, K, C.; IGREJA, A. C. S. M.; COSTA, I. M. C. Atopic dermatites and vitamin D: facts and controversies. **Anuais Brasileiros de Dermatologia**, v. 88, p. 945-953, 2013.

MISRA, M.; PACAUD, D.; PETRYK, A.; COLLETT-SOLBERG, P.F.; KAPPY, M. Drug and Therapeutics Committee of the Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society. Vitamin D deficiency in children and its management: review of current knowledge and recommendations. **Pediatrics**, v. 122, p. 398-417, 2008.

MITHAL, A.; WAHL D. A.; BONJOUR, J. P.; BURCKHARDT, P. DAWSON-HUGHES, B.; EISMAN, J. A.; EL-HAJJ, F.; JOSSE, R. LIPS, P.; MORALES-TORRES, J. Global vitamin D status and determinats of hypovitaminosis D. **Osteoporosis International**, v. 20, p. 1807-A820, 2009.

MOCELLIN, S. Vitamin D and cancer: deciphering the truth. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1816, p. 172-178, 2011.

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

MOSER, K.; KRIWET, K.; NAIK, A.; KALIA, Y. N.; GUY, R. H. Passive skin penetration enhancement and its quantification in vitro. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 52, p. 103-112, 2001.

MULLIGAN, M. L.; FELTON, S. K.; RIEK, A. E.; BERNAL-MIZRACHI, C. Implications of vitamin D deficiency in pregnancy and lactation. **American journal of the obstetrics and gynecology**, v. 202, p. 429.e1-429.e9, 2010.

NAPIÓRKOWSKA, L.; BUDLEWSKI, T.; JAKUBAS-KWIATKOWSKA, W.; HAMZY, V.; GOZDOWSKI, D.; FRANEK, E. Prevalence of low serum vitamin D concentration in an urban population of elderly women in Poland. **Polskie Archiwum Medycyny Wewnetrznej**, v. 119, p. 699-703, 2009.

NORMAN, A. W. Minireview: vitamin D receptor: new assignments for an already busy receptor. **Endocrinology**, v. 12, p. 5542-5548, 2006.

NORONHA, C. M. et al. Optimization of α -tocopherol loaded nanocapsules by the nanoprecipitation method. **Industrial Crops and Products**, v. 50, p. 806-903, 2013.

OECD Guidance document for the conduct of skin absorption studies. Paris: Organization for economic cooperation and development, p.31, 2004.

OKAMURA, W. H.; MIDLAND, M. M.; HAMMOND, M. W.; ABD. RAHMAN, N.; DORMANEN, M. C.; NEMERE, I.; NORMAN, A. W. Chemistry and conformation of Vitamin D molecules. **The journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 53, p. 603-613, 1995.

OLIVEIRA, R. M.; NOVAES, J. F.; AZEREDO, L. M.; CÂNDIDO, A. P.; LEITE, I.C. Association of vitamin D insufficiency with adiposity and metabolic disorders in Brazilian adolescents. **Public Health Nutrition**, v. 17, p. 787-794, 2014.

OLIVERI, B.; PLANTALECH, L.; BAGUR, A.; WITTICH, A. C.; ROVAI, G.; PUSIOL, E.; LÓPEZ, G. J.; PONCE, G.; NIEVA, A.; CHAPERÓN, A.; LADIZESKY, M.; SOMAZA, J.; CASCO, C.; ZENI, S.; PARISI, M. S.; MAUTALEN, C. A. High prevalence of vitamin D insufficiency in healthy elderly people living at home in Argentina. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 58, p. 337-342, 2004.

PAIVA, D. L. et al. **Introdução à Espectroscopia**. 4^o ED. Cengage Learning, São Paulo, 2012.

PATTON, C. M.; POWELL, A. P.; PATEL, A. A. Vitamin D in orthopaedics. **The journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons**, v. 20, p. 123-129, 2012.

PAUCAR, O. C. **Encapsulação de colecalciferol (Vitamina D3) por spray chilling**. 2016, 45 f. Tese (Mestrado em Ciências da Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2016.

PAUDEL, K. S.; MILEWSKI, M.; SWADLEY, C. L.; BROGDEN, N. K.; GHOSH, P.; STINCHOCOMB, A. L. Challenges and opportunities in dermal/transdermal delivery. **Ther Deliv**, v.1, p. 109-131, 2010.

PEDROSA, M. A. C.; CASTRO, M. L. Papel da Vitamina D na Função Neuro-Muscular. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo**, v. 49, p. 495 – 502, 2005.

PEREIRA, F.; ALMEIDA, M. D. V. Vitamina D: uma verdadeira Hormona. **Nutricias**, v. 8, p. 42-47, 2008.

PEREIRA, F. V.; EVERTON, L. P.; MESQUITA, J. P.; LUCAS, A. A.; MANO, V. Bionanocompósitos preparados por incorporação de nanocristais de celulose em polímeros biodegradáveis por meio de evaporação de solvente, automontagem ou eletrofiação. **Química Nova**, v. 37, p. 1209-1219, 2014.

PREMAOR, M. O.; FURLANETTO, T. W. Vitamin D deficiency in adults: to better understand a new presentation of an old disease. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 50, p. 25-37, 2006.

PRIBORSKY, J.; MUHLBACHOVÁ, E. Evaluation of in vitro percutaneous absorption across human skin and in animal model. **Journal Pharmaceutical Pharmacology**, v. 7, p. 468-472, 1990.

PROSSER, D. E.; JONES, G. Enzymes involved in the activation and inactivation of vitamin D. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 29, p. 664-673, 2004.

QUINTANAR-GUERRERO, D.; ALLEMANN, E.; FESSI, H. DOELKER, E. Preparation techniques and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 24, p. 1113-1128, 1998.

RAAB, J.; GIANNOPOULOU, E. Z.; SCHNEIDER, S.; WARNCKE, K.; KRASMANN, M.; WINKLER, C.; ZIEGLER, A. G. Prevalence of vitamin D deficiency in pre-type 1 diabetes and its association with disease progression. **Diabetologia**, v. 57, p. 902-908, 2014.

RAFAELLI, R. A.; NOMURA, P. R.; FIGUEIRA, F. D.; SANTOS, I. C. P. F.; SILVA, L. F. R. S.; VENTURINI, D. Influência da vitamina D nas doenças endocrinometabólicas. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 36, p. 333-348, 2015.

RAFFIN, R. P.; OBACH, E. S.; MEZZALIRA, G. POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S., Nanocápsulas poliméricas secas contendo indometacina: estudo de formulação e de tolerância gastrointestinal em ratos. **Acta Farmacêutica Bonaerense**, v. 22, p. 163-172, 2003.

REICHRATH, J. Vitamin D and the skin: an ancient friend, revisited. **Experimental dermatology**, v. 16, p. 618, 625, 2007.

REZWAN, K. et al. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffold for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v. 27, p. 3412-3431, 2006.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, p. 771-780, 2004.

RIEKES, M. K.; BARBOZA, F. M.; VECCHIA, D. D.; BOHATCH Jr., M.; FARAGO, P. V.; FERNANDES, D.; SILVA, M. A. S.; STULZER, H. K. Evaluation of oral carvedilol microparticles prepared by simple emulsion technique using poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and polycaprolactone as polymers. **Materials Science and Engineering**, v. 31, p. 962-968, 2011.

SADRIEH, N.; WOKOVICH, A. M.; GOPPE, N. V.; ZHENG, J.; HAINES, D.; PARMITER, D.; SIITONEN, P. H.; COZART, C. R.; PATRI, A. K.; McNEIL, S. E.; HOWARD, P. C.; DOUB, W. H.; BUHSE, L. F. Lack of Significant Dermal Penetration of Titanium Dioxide from Sunscreen Formulations Containing Nano- and Submicron-Size TiO₂ Particles. **Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology**, v.115, p.156-166, 2010.

SAKATA, S.; UCHIDA, K. KAETSU, I.; EKITA, Y. Programming control of intelligent drug releases in response to single and binary environmental stimulation signals using sem-sor and electroresponsive hydrogel. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 4, p. 733-737, 2007.

SALO-VÄÄNÄNEN, P.; OLLILAINEN, V.; MATTILA, P.; LEHIKONEN, K.; SALMELA-MÖLSA.E.; PIIROREN, V. Simultaneous HPLC analysis of fat-soluble vitamins in selected animal products after small-scale extraction. **Food Chemistry**. v. 71, p, 535-543, 2000.

SANTOS-MAGALHÃES, N. S.; PONTES, A.; PEREIRA, V. W. W.; CAETANO, M. N. P. Colloidal carriers for benzathine penicillin G: Nanoemulsions and nanocapsules. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 208, p. 71-80, 2000.

SARTORELLI, P.; ANDERSEN, H. R.; ANGERER, J.; CORISH, J.; DREXLER, H.; GÖEN, T.; GRIFFIN, P.; HOTCHKISS, S. A. M.; LARESE, F. MONTOMOLO, L.; PERKINS, J. SCHMELZ, M.; VAN DE SANDT, J.; WILLIAMS, F. Percutaneous penetration studies for risk assessment. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 8, p. 133-152, 2000.

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

SCHAFFAZICK, S. R.; POHLMANN, A. R.; FREITAS, L. L.; GUTERRES, S. S. Caracterização e estudo de estabilidade de nanocápsulas e de nanoesferas poliméricas contendo diclofenaco. **Acta Farmacêutica Bonaerense**, v. 21, p. 99-106, 2002.

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

SEVERINO, P.; SANTANA, M. H. A.; PINHO, S. C.; SOUTO, E. B. Polímeros sintéticos biodegradáveis: matérias-primas e métodos de produção de micropartículas para uso de *drug delivery* e liberação controlada. **Polímeros**, v. 21, p. 361-368, 2011.

SHAH, V. P.; FLYNN, G. L.; YACOBI, A.; MAIBACH, H. I.; BON, C.; FLEISCHER, N. M.; FRANZ, T. J.; KAPLAN, S. A.; KAWAMOTO, J.; LESKO, L. J.; MARLY, J. P.; PERSHING, L. K.; SCHAEFER, H.; SEQUEIRA, J. A.; SCHIVASTAVA, S. P.; WILKIN, J.; WILLIAMS, R. L. Bioequivalence of topical dermatological dosage forms-

methods of evaluation of bioequivalence. **Pharmaceutical research**, v. 15, p. 167-171, 1999.

SILVA, J. A.; APOLINÁRIO, A. C.; SOUZA, M. S. R.; DAMASCENO, B. P. G. L.; MEDEIROS, A. C. D. Administração cutânea de fármacos: desafios e estratégias para o desenvolvimento de formulações transdérmicas. **Revista de Ciências Farmacêutica Básica e Aplicada**, v. 31, p. 125-131, 2010.

SINGH, J.; PANDT, S.; BRAMWELL, V. W.; ALPAR, H. O. Diphtheria toxoid loaded poly-(ϵ caprolactone) nanoparticles as mucosal vaccine delivery systems. **Methods**, v. 38, p. 96-105, 2006.

SINHA, V. R.; BANSAL, K. KAUSHIKM, R.; KUNRIA, R.; TREHAN, A. Poly(ϵ -caprolactone) microspheres and nanospheres: an overview. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 278, p. 1- 23, 2004.

SOARES, M. V. **Desenvolvimento de Nanopartículas de Poli- ϵ -caprolactona contendo Zinco(II)ftalocianina para Uso na Terapia Fotodinâmica do Câncer**. 2009, 142 f. Tese (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

SPOSITO, P. A. **Nanocápsulas e nanoemulsões contendo antifúngico: desenvolvimento farmacotécnico, caracterização e avaliação biológica em modelo de candidíase sistêmica**. 2008, 186 f. Tese (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2008.

SONG, S. J.; SI, S.; LIU, J.; CHEN, X.; ZHOU, L.; JIA, G.; LIU, G.; NIU, Y.; WU, J.; ZHANG, W.; ZHANG, J. Vitamin D status in Chinese pregnant women and their newborns in Beijing and their relationships to birth size. **Public Health Nutrition**, v. 16, p. 687-692, 2013.

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

SOUTO, E. R.; MULLER, R. H. Cosmetic features and applications of lipid nanoparticles (SLNR, NLCR). **International Journal of Cosmetic Science**, v. 30, p. 157-165, 2008.

SOUZA, P. M. S.; LOBO, F. A.; ROSA, A. H.; FRACETO, L. F. Development of nanocapsules of poly- ϵ - caprolactone containing herbicide atrazine. **Química Nova**, v. 35, 2012.

SUD, S. R.; MONTENEGRO-BETHANCOURT, G.; BERMÚDEZ, O. I.; HEANEY, R. P.; ARMAS, L.; SOLOMONS, N. W. Older Mayan residents of the western highlands of Guatemala lack sufficient levels of vitamin D. **Nutrition Research**, v. 30, p. 739-746, 2010.

SUNN, K. L.; COCK, T. A.; CROFTS, F. A.; EISMAN, J. A.; GARDINER, E. M. Novel N-terminal variant of human VDR. **Molecular Endocrinology**, v. 15, p. 1599-1609, 2001.

TAN, Y.; XU, K.; LI, L.; LIU, C.; SONG, C.; WANG, P. Fabrication of Size-Controlled Starch-Based Nanospheres by Nanoprecipitation. **ACS Publication**, v. 4, p. 456 -459, 2009.

TENG, Z.; LUO, Y.; WANG, Q. Carboxymethyl chitosan-soy protein complex nanoparticles for the encapsulation and controlled release of vitamin D3. **Food Chemistry**, v. 141, p. 524-532, 2013.

TOUITOU, E.; MEIDAN, V. M. HORWITZ, E. Methods for quantitative determination of drug localized in the skin. **Journal of Controlled Release**, v. 56, p. 7-21, 1998.

VIETH, R. Vitamin D supplementation, 25-hydroxyvitamin D concentrations, and safety. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 69, p. 842-856, 1999.

VIEIRA, S. P. **Promoção da Absorção Cutânea de Fármacos**. 2013, 72 f. Tese (Mestrado em Ciências Farmacêutica) – Faculdade de Ciências da Saúde, Porto, 2013.

VIERUCCI, F.; DELPISTOIA, M.; FANOS, M.; ERBA, P.; SAGGESES, G. Prevalence of hypovitaminosis D and predictors of vitamin D status in Italian healthy adolescents. **Italian Journal of pediatrics**, v. 5, p. 40-54, 2014.

YU, J.; MOOKHERJEE, N.; WEE, K.; BOWDISH, D. M. E.; PISTOTIC, J.; LI, H. Host defense peptide LL-37 in synergy with inflammatory mediator IL-1 beta, increases the immune response by multiple pathways. **The Journal of Immunology**, v. 179, p. 7684-7691, 2007.

WESSLER, K. et al. Thermal properties and morphology of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) with poly(caprolactone triol) mixtures. **Macromolecular Symposia**, v. 245, p. 161-165, 2006.

ZANIN, S. M. W.; MIGUEL, M. D. C.; CHIMELLI, M. C.; OLIVEIRA, A. B. Determinação do equilíbrio hidrofílico-lipofílico (EHL) de óleos de origem vegetal. **Visão Acadêmica**, v. 3, p. 13-18, 2002.

ZEHNDER, D.; QUINKLER, M.; EARDLEY, K. S.; BLAND, R.; LEPENIES, J.; HUGHES, S. V.; RAYMOND, N. T.; HOWIE, A. J.; COCKWELL, P.; STEWART, P. M.; HEWISON, M. Reduction of the vitamin D hormonal system in kidney disease is associated. **Kidney International**, v. 74, p.1343-1353, 2008.

ZHANG, L.; GU, F. X.; CHAN, J. M.; WANG, A. Z.; LANGER, R. S.; FAROKHZAD, O. C. Nanoparticles in medicine: therapeutic applications and developments. **Clinical pharmacology and therapeutics**, v. 761, p. 761-769, 2008.

ZHAO, Y.; MODDARESI, M.; JONES, S. A.; BROWN, M. B. A dynamic topical hydrofluoroalkane foam to induce nanoparticle modification and drug release. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 72. p. 521-528, 2009.

ZITTERMANN A.; PROKOP, S.; GUMMERT, J. F.; BÖRGERMANN, J., Safety Issues of Vitamin D Supplementation, **Anti-cancer agents in medicinal chemistry**, v.13, p. 4-10, 2013.