

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA - ESCOLA DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE
NANOCÁPSULAS DE PROPIONATO DE CLOBETASOL
OBTIDAS POR POLIMERIZAÇÃO *IN SITU* PARA
TRATAMENTO DE PSORÍASE**

Simone Pinto Carneiro

Ouro Preto - MG

Junho de 2013

SIMONE PINTO CARNEIRO

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE
NANOCÁPSULAS DE PROPIONATO DE CLOBETASOL
OBTIDAS POR POLIMERIZAÇÃO *IN SITU* PARA
TRATAMENTO DE PSORÍASE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Ouro Preto para obtenção do grau de mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Orlando David Henrique dos Santos - UFOP

Ouro Preto - MG

Junho de 2013

C289d Carneiro, Simone Pinto.

Desenvolvimento e caracterização de nanocápsulas de propionato de clobetasol obtidas por polimerização *in situ* para tratamento de psoríase [manuscrito] / Simone Pinto Carneiro – 2013.

96 f.: il. color.; graf.; tabs.; equações.

Orientador: Prof. Dr. Orlando David Henrique dos Santos.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

Catálogo: sisbin@sisbin.ufop.br



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP
Escola de Farmácia



Sessão de defesa da 70ª dissertação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto, que conferiu o grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas a SIMONE PINTO CARNEIRO com a defesa da dissertação intitulada: "Desenvolvimento e caracterização físico-química de nanocápsulas de Propionato de Clobetasol obtidas por polimerização *in situ*", avaliada e aprovada pela banca examinadora abaixo:

Ouro Preto, 04 de julho de 2013.

Profª. Drª. Elaine Amaral Leite
UFMG

Profª. Drª. Jacqueline de Souza
DEFAR/UFOP

f/ Prof. Dr. Orlando David Henrique dos Santos
DEFAR/UFOP

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus**, por iluminar meu caminho e me dar força para superar as dificuldades e recomeçar sempre que for preciso.

Ao meu orientador, **Orlando**, por confiar em mim para executar este trabalho, além de me proporcionar oportunidades incríveis que me fizeram crescer e abrir novos caminhos.

À minha família, **mamãe, Nena, Rê e Rick**, que são a paz que se procura quando é preciso se unir aos melhores sentimentos que existem!

Ao **Smili**, por transbordar gestos de amor todo o tempo e por me mostrar que a vida é, sim, mais bonita quando o coração bate mais forte!

Às minhas amigas, **Cris, Bibi, Marina, Marcela, Aninha, Paolla, Narinha**, por compartilharem comigo a alegria de viver!! Mais que ajudar com fórmulas e discussões num trabalho científico, os momentos únicos que vocês me proporcionam a cada encontro são a minha fonte de energia!

Aos meus amigos queridos, **Vanessa, Ricardo, Karen e Fred**, por terem se tornado grandes amigos! Obrigada pelos desabafos, pelos estímulos, pelas noites de companhia no laboratório, pelas novas ideias, pelas risadas... pela nossa sintonia!

À **Thaís e Rady**, pela amizade regada a chocolates e caldos!

Às parceiras do laboratório, **Líliam e Giani**, por me auxiliarem inúmeras vezes e pelos momentos de descontração.

Ao professor **Barichello**, por ter me apoiado e ajudado a realizar o sonho da mobilidade para a França.

À **Mirella, à Paty e ao Leo**, pela boa vontade e disposição em ajudar.

À **Jacqueline Morais**, que trouxe na bagagem muito conhecimento para dividir comigo.

À **Patrícia Goto**, pela atenção e paciência em tirar dúvidas, mesmo de longe.

Ao **Vilela**, pela contribuição com as análises de MFA.

Aos que caminharam comigo nesta jornada... Obrigada pelas mãos dadas e pelos ensinamentos!

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é, senão, uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”

(Madre Tereza de Calcutá)

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO	14
2 – REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1 - PSORÍASE	18
2.2 – NANOTECNOLOGIA	22
2.2.1 – Nanobiotecnologia na área farmacêutica	24
2.3 – NANOEMULSÕES	26
2.3.1 – Aplicações	27
2.3.2 – Métodos de preparo	29
2.4 – NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS.....	31
2.4.1 – Aplicações	32
2.4.2. – Métodos de obtenção.....	33
2.5 – PROPIONATO DE CLOBETASOL.....	34
3 – OBJETIVOS	39
3.1 – OBJETIVO GERAL:	39
3.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	39
4 - MATERIAL E METODOS	41
4.1 – MATERIAL.....	41
4.2 – MÉTODOS	41
4.2.1 – Obtenção das nanoemulsões O/A.....	41
4.2.2 – Análise da estabilidade das nanoemulsões.....	42
4.2.3 - Determinação da temperatura de inversão de fases	44
4.2.4 - Polimerização <i>in situ</i>	44
4.2.5 – Determinação do valor pH das formulações	44
4.2.6 - Caracterização físico-química das nanocápsulas	45
4.2.7 - Quantificação do propionato de clobetasol a partir das nanocápsulas.....	46
5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
5.1 – EMULSIFICAÇÃO POR INVERSÃO DE FASES.....	53
5.2 - CONDUTIVIDADE.....	54
5.3 – ESTABILIDADE DAS NANOEMULSÕES	56
5.3.1 – Avaliação microscópica	56
5.3.2 – Avaliação da influência da temperatura e estresse gravitacional.....	57

5.4 - POLIMERIZAÇÃO <i>IN SITU</i>	59
5.5 - CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA	59
5.5.1 – Determinação do valor de pH das formulações	59
5.5.2 – Análise granulométrica	60
5.5.3 – Análise por Microscopia de Força Atômica (MFA)	63
5.5.4 – Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR)	65
5.6 - QUANTIFICAÇÃO DO PROPIONATO DE CLOBETASOL A PARTIR DAS NANOCÁPSULAS	68
5.6.1 - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	68
5.6.2 - Teste de solubilidade do propionato de clobetasol	69
5.6.3 – Determinação da eficiência de encapsulação	72
5.6.4 – Determinação da eficiência do processo	73
5.6.5 – Liberação <i>in vitro</i> do propionato de clobetasol	73
6 – CONCLUSÃO	79
7 – REFERÊNCIAS	81
8 – ANEXO	94

RESUMO

A psoríase é uma doença inflamatória crônica e recorrente caracterizada pelo surgimento de lesões e placas escamosas e eritematosas na pele, que acomete grande parte da população mundial e não tem cura. O tratamento mais indicado é pela via tópica e um dos fármacos mais eficazes é o propionato de clobetasol, um glicocorticoide com propriedades anti-inflamatória e vasoconstritora. O objetivo deste trabalho foi desenvolver e realizar a caracterização físico-química de nanocápsulas de propionato de clobetasol obtidas por polimerização *in situ*, a partir de nanoemulsões contendo monômeros derivados do acrilato, preparadas por inversão de fases. As nanoemulsões foram estáveis e apresentaram gráficos da condutividade característicos da inversão de fases. Amostras das nanoemulsões e nanocápsulas foram avaliadas quanto ao tamanho médio de glóbulos e partículas, obtendo valores entre 130 e 145 nm e índice de polidispersão inferior a 0,3. O pH de ambas as formulações exibiu valores próximos da neutralidade e sofreu pequenas variações no período de 30 dias. A análise morfológica foi realizada através de microscopia de força atômica e foi comprovada a formação de nanocápsulas de propionato de clobetasol de formato esférico. Os polímeros formados ao redor das nanocápsulas foram caracterizados através de análises de espectroscopia por infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR), apresentando espectros característicos aos do poli(acrilato de 2-etilhexila) e poli(acrilato de 2-etilhexila-acrilato de butila). A solubilidade do propionato de clobetasol no meio tampão acetato de sódio pH 5,5 : Labrasol a 5% foi igual 373,95 µg/mL, quantificada por CLAE. Ambas as nanocápsulas apresentaram alta eficiência de encapsulação do fármaco (acima de 99%) e eficiência do processo próxima a 68%. O teste de liberação *in vitro* do propionato de clobetasol a partir das nanocápsulas e de uma solução etanólica do fármaco (FL) a 0,5 mg/mL foi realizado por diálise reversa; após 24 horas, a FL liberou 100% do fármaco, ao passo que as nanocápsulas liberaram, aproximadamente, 40% do princípio ativo e apresentaram perfil de liberação semelhante durante todo o teste.

Palavras-chave: psoríase, propionato de clobetasol, polimerização *in situ*, nanocápsulas, nanoemulsões.

ABSTRACT

Psoriasis is a chronic and recurrent inflammatory skin disease characterized by scaly and erythematous plaque and lesions which affects a great part of the world's population and there is no healing. Topical treatment is the most useful and one of the most effective drugs is clobetasol propionate, a glucocorticoid with anti-inflammatory and vasoconstrictor properties. The aim of this study was to develop and make physico-chemical characterization of clobetasol propionate nanocapsules obtained by *in situ* polymerization from nanoemulsions containing acrylate monomers, prepared by phase inversion. Nanoemulsions were stable and presented typical phase inversion conductivity graphics. Particles and droplets size measurements of both nanocapsules and nanoemulsions were in the range of 130 and 145 nm and polydispersity index was less than 0,3. Both formulations pH achieved neutrality values and had only a few changes during the period of 30 days. Atomic force microscopy was employed to make morphological analyses and confirmed spherical propionate clobetasol nanocapsules. Polymers surrounding nanocapsules were characterized by the Fourier transform infrared spectroscopy and showed similar poly(2-ethylhexyl acrylate) and poly(2-ethylhexyl acrylate-butyl acrylate) spectrums. Clobetasol propionate solubility in sodium acetate buffer pH 5,5 : Labrasol 5% was 373,95 µg/mL, assessed by HPLC. Both nanocapsules showed high encapsulation efficiency (higher than 99%) and process efficiency around 68%. *In vitro* release tests from clobetasol propionate nanocapsules and a 0,5 mg/mL ethanolic drug solution (FL) were performed by reverse dialysis; after 24 hours, FL showed 100% of drug released whereas nanocapsules exhibited nearly 40% of drug released and presented a similar release profile during the test.

Keywords: psoriasis, clobetasol propionate, *in situ* polymerization, nanocapsules, nanoemulsions.

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 Lesões e placas características da psoríase (Fonte: www.psoriase.org.br/fotos)	19
Figura 2 Nanoescala em relação a objetos naturais e seres vivos: a) inseto; b) fio de cabelo; c) pólen; d) células vermelhas do sangue; e) rede de nanocristais de cobalto; f) bacteriófago; g) molécula de ácido acetilsalicílico (MYHRANYAN <i>et al.</i> , 2012)	23
Figura 3 Representação esquemática de nanopartículas poliméricas (SCHAFFAZICK <i>et al.</i> , 2003)	31
Figura 4 Estrutura química do propionato de clobetasol. As letras A, B, C, D indicam os anéis da estrutura do corticosteroide	35
Figura 5 Gráfico da temperatura de inversão de fases obtido para a nanoemulsão NE A2EH (n = 3)	54
Figura 6 Gráfico da temperatura de inversão de fases obtido para a nanoemulsão NE A2EH + AB (n = 3)	54
Figura 7 Gráfico da temperatura de inversão de fases obtido para a nanoemulsão NE AB (n = 3)	56
Figura 8 Representação esquemática da medida de tamanho médio de partículas pela técnica de espectroscopia de correlação de fótons (Fonte: http://alienspacesciencenews.wordpress.com)	61
Figura 9 Imagem tridimensional obtida por MFA das nanocápsulas de propionato de clobetasol	63
Figura 10 (a) Fotomicrografia bidimensional obtida por MFA da formulação e (b) perfil do diâmetro de algumas nanocápsulas	64
Figura 11 (a) Fotomicrografia bidimensional obtida por MFA da formulação e (b) perfil da altura de algumas nanocápsulas	65
Figura 12 Espectro padrão do poli(acrilato de 2-etilhexila) (Fonte: http://www.sigmaaldrich.com/spectra/ftir/FTIR002065.PDF)	65

Figura 13	Espectro de infravermelho obtido para o polímero poli(acrilato de 2-etilhexila)	66
Figura 14	Espectro de infravermelho obtido para o co-polímero poli(acrilato de 2-etilhexila-acrilato de butila)	66
Figura 15	Estrutura dos monômeros acrilato de 2-etilhexila (A) e acrilato de butila	67
Figura 16	Espectros de infravermelho do monômero acrilato de 2-etilhexila (azul) e do polímero poli(acrilato de 2-etilhexila) (vermelho)	68
Figura 17	Tempo de retenção do propionato de clobetasol após injeções do padrão de nas concentrações de 500,0; 250,0; 100,0; 50,0; 25,0 e 10,0 µg/mL	69
Figura 18	Curvas analíticas do propionato de clobetasol em cada meio receptor testado	70
Figura 19	Curva analítica do propionato de clobetasol obtida para quantificação do fármaco liberado e presente no meio receptor	75
Figura 20	Porcentagem de propionato de clobetasol liberada ao longo do tempo para as formulações contendo o fármaco encapsulado (NC A2EH e NC A2EH + AB) e solução etanólica do fármaco livre (FL)	75

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 Classificação da gravidade da psoríase conforme a qualidade de vida e intensidade das lesões	20
Tabela 2 Composição da nanoemulsão NE A2EH	42
Tabela 3 Composição da nanoemulsão NE A2EH + AB	42
Tabela 4 Condições cromatográficas para quantificação do propionato de clobetasol	47
Tabela 5 Tamanho (em nm) dos glóbulos da nanoemulsão NE A2EH posterior aos testes de centrifugação e estresse térmico executados 1, 7, 15 e 30 dias após seu preparo	58
Tabela 6 Tamanho (em nm) dos glóbulos da nanoemulsão NE A2EH + AB posterior aos testes de centrifugação e estresse térmico executados 1, 7, 15 e 30 dias após seu preparo	58
Tabela 7 Valores de pH obtidos para as formulações	60
Tabela 8 Valores do tamanho (nm) e do IP das nanoemulsões (NE A2EH) e nanocápsulas (NC A2EH) de propionato de clobetasol	62
Tabela 9 Valores do tamanho (nm) e do IP das nanoemulsões (NE A2EH + AB) e nanocápsulas (NC A2EH + AB) de propionato de clobetasol	62
Tabela 10 Parâmetros das curvas analíticas obtidas para os meios testados para quantificação do propionato de clobetasol por CLAE	71
Tabela 11 Porcentagem da eficiência de encapsulação (EE) do propionato de clobetasol em ambas as nanocápsulas	72
Tabela 12 Porcentagem da eficiência de processo (EP) do propionato de clobetasol em ambas as nanocápsulas	73

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

μScm^{-1}	Micro Siemens por centímetro
λ	Comprimento de onda
a	Altura
A2EH	Acrilato de 2-etilhexila
AB	Acrilato de butila
A/O	Água em óleo
ATR	Reflectância total atenuada
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
d	Diâmetro
ECF	Espectroscopia por correlação de fótons
EE	Eficiência de encapsulação
EHL	Equilíbrio hidrofílico-lipofílico
EP	Eficiência do processo
EPI	Inversão de fases pela alteração da fração volumétrica
FL	Solução etanólica do fármaco livre
FT-IR	Espectroscopia por infravermelho por transformada de Fourier
IP	Índice de polidispersão
KPS	Persulfato de potássio
MFA	Microscopia de força atômica
NC	Nanocápsula
NE	Nanoemulsão
O/A	Óleo em água
PBS	Tampão fosfato-salina
PEG	Poli(etilenoglicol)
PLGA	Ácido poli-(D, L, láctico-co-glicólico)
r	Coefficiente de correlação linear
rpm	Rotações por minuto
SLC	Sistemas de liberação controlada
TIF	Temperatura de inversão de fases
UV	Ultravioleta

1.Introdução

1 – INTRODUÇÃO

A psoríase é uma doença inflamatória crônica e recorrente caracterizada por hiperplasia epidérmica e ativação imune, que acomete a pele e também pode atingir as articulações (MOREIRA e SOUZA, 2008). De acordo com a Organização Nacional da Psoríase, a doença afeta 2 a 3% da população mundial, sendo mais de 5 milhões de portadores no Brasil. A psoríase é caracterizada por lesões avermelhadas e descamativas na pele, além de prurido, eritema e placas de coloração cinza (prateada) e branca que aparecem geralmente nos cotovelos, joelhos e couro cabeludo. Uma das maiores dificuldades em conviver com a psoríase reside no fato de que a doença afeta a qualidade de vida do paciente proporcionalmente ao número e intensidade das lesões ou placas que surgem ao longo da superfície corporal (KRUEGER e ELLIS, 2005). Além disso, não tem cura, apenas tratamento para atenuar as lesões e controlar a reincidência (KANWAR *et al.*, 2010).

Dentre os tipos de tratamento disponíveis, a terapia tópica é a primeira escolha para a maioria dos pacientes (KRUEGER e ELLIS, 2005). Porém, os fármacos considerados mais eficazes causam, em muitos casos, efeitos adversos marcantes, como o surgimento de manchas, irritação na pele, alergias, atrofia cutânea e telangiectasia, o que reflete a baixa adesão do paciente ao tratamento (LEBWOHL, 2003).

Um dos desafios da indústria farmacêutica é desenvolver fármacos que alcancem seletiva e especificamente seu sítio de ação, a fim de maximizar o efeito terapêutico e reduzir os colaterais (KINGSLEY *et al.*, 2006). Diante das dificuldades encontradas para cumprir esse propósito, a nanobiotecnologia disponibiliza uma alternativa promissora: os Sistemas de Liberação Controlada (SLC), que consistem na associação de fármacos a nanocarreadores, através do encapsulamento (DURÁN e DE AZEVEDO, 2002). Uma das suas principais vantagens é a potencialização da eficácia terapêutica através da liberação do fármaco no tecido-alvo, ou mesmo em células específicas, evitando danos em células saudáveis, o que contribui para a redução do surgimento de efeitos adversos, refletindo num aumento da adesão do paciente ao tratamento.

Dentre os nanocarreadores disponíveis para veiculação de fármacos, as nanocápsulas destacam-se como potenciais sistemas de aplicação terapêutica tópica

(PROW *et al.*, 2011), pois quando o fármaco está encapsulado e “protegido” na cavidade oleosa, as irritações na pele após administração, o efeito de sua liberação inicial rápida (chamado efeito *burst*) e sua degradação e oxidação são minimizados (ANTON *et al.*, 2008). Além disso, apresentam aspecto sensorial agradável e também, são estáveis por longo período de tempo.

Um método eficiente e de fácil manipulação para a obtenção de nanocápsulas é a polimerização *in situ*, que consiste em utilizar nanoemulsões (compostas por gotículas de monômero circundadas por surfactantes) como meio reacional, no qual a reação se inicia dentro das gotículas e é desencadeada por um iniciador (SPERNATH e MAGDASSI, 2007). As principais vantagens da polimerização *in situ* são: produção de polímero com peso molecular elevado e de partículas estruturadas; maior taxa de polimerização; produto final apresentado sob a forma de coloides poliméricos (nanopartículas de tamanho controlado, situando-se usualmente entre 30 e 600 nm); e ainda, utiliza água como solvente, evitando contaminação do meio ambiente com solventes orgânicos (CHERN, 2006; LANDFESTER, 2009).

As nanoemulsões, que atuam como produto intermediário do processo de obtenção das nanocápsulas, são preparadas por inversão de fases, um método que utiliza baixa energia de emulsificação (TADROS *et al.*, 2004) e sua viabilidade é justificada pelos seguintes fatores: emprego de matérias-primas baratas (monômeros ao invés de polímeros; tensoativos derivados de sorbitano etoxilados e óleos vegetais), ausência de solvente orgânico durante as etapas de produção e uso de equipamentos simples.

O propionato de clobetasol é um corticosteroide tópico potente, com ações anti-inflamatória e vasoconstritora (WIEDERSBERG *et al.*, 2008), indicado com frequência pelos dermatologistas para o tratamento da psoríase. Apesar de sua eficácia comprovada, muitos pacientes relatam o surgimento de efeitos adversos, como irritação, ardência e queimação no local aplicado (LOWE *et al.*, 2005; JARRATT *et al.*, 2006).

A veiculação do propionato de clobetasol em formulações convencionais (cremes, loções, pomadas, géis) está associada a uma baixa adesão do paciente ao tratamento, relacionada principalmente aos efeitos colaterais proporcionados. Outra causa de abandono do tratamento relatada por pacientes é o aspecto sensorial oleoso e viscoso de algumas dessas formulações (FONTANA *et al.*, 2010).

O fármaco já foi encapsulado em alguns nanossistemas, como lipossomas, microesferas, nanopartículas lipídicas sólidas, dentre outros (HU *et al.*, 2002; CAPÓ *et al.*, 2004; BADILH *et al.*, 2011). Porém, as desvantagens desses nanocarreadores incluem estabilidade em curto prazo para algumas formulações e alto custo de produção para outras.

Até o presente momento, o propionato de clobetasol não foi veiculado a nanocápsulas obtidas por polimerização *in situ*. Desta maneira, este trabalho visa o desenvolvimento dessas formulações para serem usadas no tratamento da psoríase, de forma a manter sua eficácia e melhorar a qualidade de vida do paciente, proporcionando o mínimo de efeitos adversos, o que reflete também, no aumento da adesão do paciente ao tratamento.

2. Revisão da Literatura

2 – REVISÃO DA LITERATURA

2.1 - PSORÍASE

A psoríase é uma doença inflamatória crônica e recorrente caracterizada por hiperplasia epidérmica e ativação imune, que acomete a pele e também pode atingir as articulações (MOREIRA e SOUZA, 2008). De acordo com a Organização Nacional da Psoríase, a doença afeta 2 a 3% da população mundial, sendo mais de 5 milhões de portadores no Brasil. Em geral, apresenta dois picos de idade de prevalência: antes do 30 e após os 50 anos, mas pode surgir em qualquer fase da vida. Henseler e Christophers, 1985, avaliaram 2147 portadores de psoríase e reafirmaram o caráter bimodal da doença, que se manifestou na maioria dos pacientes através de 2 picos de prevalência: o primeiro incluiu os pacientes em que o início da doença ocorreu na faixa etária de 16 e 22 anos para mulheres e homens, respectivamente; o segundo envolveu os pacientes em que a doença começou aos 60 e 57 anos em mulheres e homens, respectivamente.

Para compreender o mecanismo de ação da doença, é necessário ter em mente o ciclo de renovação celular da pele, que acontece normalmente em todos os indivíduos. Primeiramente, a pele é constituída por três camadas principais, a saber: epiderme, derme e hipoderme. A primeira é a mais superficial e subdivide-se em outras subcamadas (basal, espinhosa, granulosa, lúcida e córnea), dentre as quais a basal é a mais profunda e composta principalmente por células chamadas melanócitos e queratinócitos (AZULAY *et al.*, 2011). A principal função dos melanócitos é produzir o pigmento melanina, que dá coloração à pele, protegendo-a dos raios solares. Já os queratinócitos possuem função de barreira natural e são constantemente renovados, concedendo a essa camada uma alta atividade mitótica. Por esse motivo, as células resultantes da divisão celular são empurradas para as camadas superiores e os queratinócitos gradualmente sofrem modificações em sua forma e composição química, tornando-se achatados e anucleados, até atingirem a superfície e se desprenderem, em um ciclo que dura em torno de quatro semanas num indivíduo normal (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004). Por outro lado, no indivíduo portador de psoríase, esse ciclo tem duração de apenas 3 a 5 dias, o que implica em uma alta concentração de queratinócitos renovados nas camadas superiores da epiderme, somando-se aos antigos que ainda não

cumpriram seu ciclo, formando uma camada de células cutâneas mortas e escamosas grossas que dão início ao surgimento das lesões e placas. Simultaneamente, o sistema imunológico é ativado, levando à produção de células T que desencadeiam o processo inflamatório (MOREIRA e SOUZA, 2008).

A psoríase é caracterizada por lesões avermelhadas e descamativas na pele, além de prurido, eritema e placas de coloração cinza (prateada) e branca, conforme ilustrado na **Figura 1**. Esses sinais manifestam-se geralmente, nos cotovelos, joelhos e couro cabeludo.

Figura 1: Lesões e placas características da psoríase (Fonte: www.psoriase.org.br/fotos)



As causas da psoríase ainda não estão totalmente esclarecidas. No entanto, estudos mostram que a predisposição genética entre membros da família desempenha um papel importante em pelo menos um terço dos casos de afetados pela doença (KRUEGER e ELLIS, 2005). Farber e Nall, 1974, realizaram uma pesquisa através de um questionário em 5600 pacientes norte-americanos e concluíram que 36% deles havia um ou mais membros da família com a doença, incluindo parentes de primeiro, segundo

ou terceiro grau. Além da hereditariedade, existem fatores que podem desencadear ou agravar a patologia: estresse, traumas cutâneos ou irritações na pele, infecções, baixa umidade do ar, ingestão alcoólica e o uso de alguns medicamentos (STICHERLING, 2005). É importante destacar que a psoríase não é contagiosa, ou seja, não é transmitida por contato de um indivíduo para outro.

A psoríase afeta a qualidade de vida do paciente proporcionalmente ao número e intensidade das lesões ou placas que surgem ao longo da superfície corporal (KRUEGER e ELLIS, 2005). A junção desses fatores classifica a doença em diferentes graus de gravidade, conforme descrito na **Tabela 1**.

Tabela 1: Classificação da gravidade da psoríase conforme a qualidade de vida e intensidade das lesões

	Leve	Moderada	Severa
Área corporal afetada pela doença	< 5%	De 2 a 20%	> 10%, geralmente as articulações também estão acometidas
Qualidade de vida	Não é afetada pela doença	Afetada pela doença	Afetada pela doença
Tratamento	Nem sempre é necessário	Indicado, com o objetivo de melhora da qualidade de vida do paciente	Indicado, porém nem sempre a resposta é satisfatória

A psoríase não tem cura, apenas tratamento para atenuar as lesões e controlar a reincidência. A resposta ao tratamento varia de um paciente para outro, uma vez que a doença sofre influência dos fatores emocionais e ambientais (KANWAR *et al.*, 2010). Existem quatro opções principais de terapia para a psoríase: tópica, fototerapia, sistêmica e biológica. A escolha depende do quadro clínico apresentado, a saber:

- **Tópica:** indicada nos casos de psoríase leve a moderada. Diversos medicamentos de uso tópico estão disponíveis no mercado e são

comercializados nas principais formas farmacêuticas, dentre elas: géis, cremes, shampoos e pomadas; comumente associadas ao ácido salicílico, zinco, retinoides, corticosteroides e análogos da vitamina D3 (VAN DE KERKHOFF e HORN, 2007). O uso de emolientes é também uma estratégia elementar no tratamento tópico, uma vez que o paciente apresenta uma intensa desidratação da pele, proveniente da perda transepidermica de água (PTEA) aumentada em até 20 vezes na psoríase (GOON *et al.*, 2004).

- **Fototerapia:** baseia-se no fornecimento artificial de radiações UVA e UVB, emitidas por aparelhos especiais, que ao serem absorvidas pela pele, agem através da inibição na produção de citocinas pró-inflamatórias, da formação de fotoprodutos de DNA que levam à redução da síntese dessa molécula diminuindo a proliferação celular e ainda, da indução da apoptose dos queratinócitos (DUARTE *et al.*, 2006). Os fatores limitantes desta alternativa terapêutica são o envelhecimento precoce da pele e o alto custo.
- **Sistêmica:** indicada nos casos de psoríase moderada a grave ou quando há falha da terapia tópica. Os medicamentos mais usados são o metotrexato, retinoides, ciclosporina e acitretina. As desvantagens dessa terapia incluem o surgimento de efeitos adversos ao longo do tratamento e a possibilidade de anomalias congênitas no feto, no caso de mulheres grávidas (LEBWOHL, 2003).
- **Biológica:** os biológicos atuam especificamente sobre algumas citocinas, ao contrário dos medicamentos de uso sistêmico que suprimem inteiramente o sistema imunológico (KANWAR *et al.*, 2010). É uma terapia nova, ainda em fase de pesquisa, e devido a sua ação exclusiva espera-se uma diminuição dos efeitos colaterais. Tsai e colaboradores, 2011, realizaram um estudo clínico de fase III a fim de testar um novo biológico (ustekinumabe) em pacientes coreanos e taiwaneses, portadores de psoríase moderada a grave, e concluíram que o medicamento foi capaz de reduzir as lesões em até 67%. Outros biológicos também se encontram em fase de estudos, a saber: alefacepte, etarnecepte, infliximabe e adalimumabe.

Apesar da importância da terapia sistêmica e dos avanços alcançados pelos produtos biológicos, a terapia tópica segue como primeira escolha para a maioria dos

pacientes no tratamento da psoríase (KRUEGER e ELLIS, 2005). Porém, os fármacos considerados mais eficazes causam, em muitos casos, efeitos adversos marcantes, como o surgimento de manchas, irritação na pele, alergias, atrofia cutânea e telangiectasia (identificada por linhas vermelhas ou arroxeadas na pele, devido à dilatação dos vasos sanguíneos), o que reflete a baixa adesão do paciente ao tratamento (LEBWOHL, 2003). Renzi e colaboradores, 2002, realizaram um estudo longitudinal em um hospital dermatológico em Roma (Itália) para avaliar a satisfação e adesão do paciente ao tratamento, e constataram que apenas 50% dos portadores de psoríase que participaram da pesquisa seguiram o tratamento até o fim. Outro estudo prospectivo, realizado em Leeds (Inglaterra), por Zaghoul e Goodfield, 2004, confirmou este mesmo comportamento: cerca de 60% dos pacientes portadores de psoríase aderiram ao tratamento indicado pelo dermatologista; deste total, os pacientes em terapia oral apresentaram adesão de 46%, ao passo que a terapia tópica aderiu cerca de 70% dos pacientes. Este quadro mostra que, apesar de ainda exigir melhora na qualidade de vida do paciente para aumentar seu comprometimento ao tratamento, a terapia tópica é a mais bem aceita.

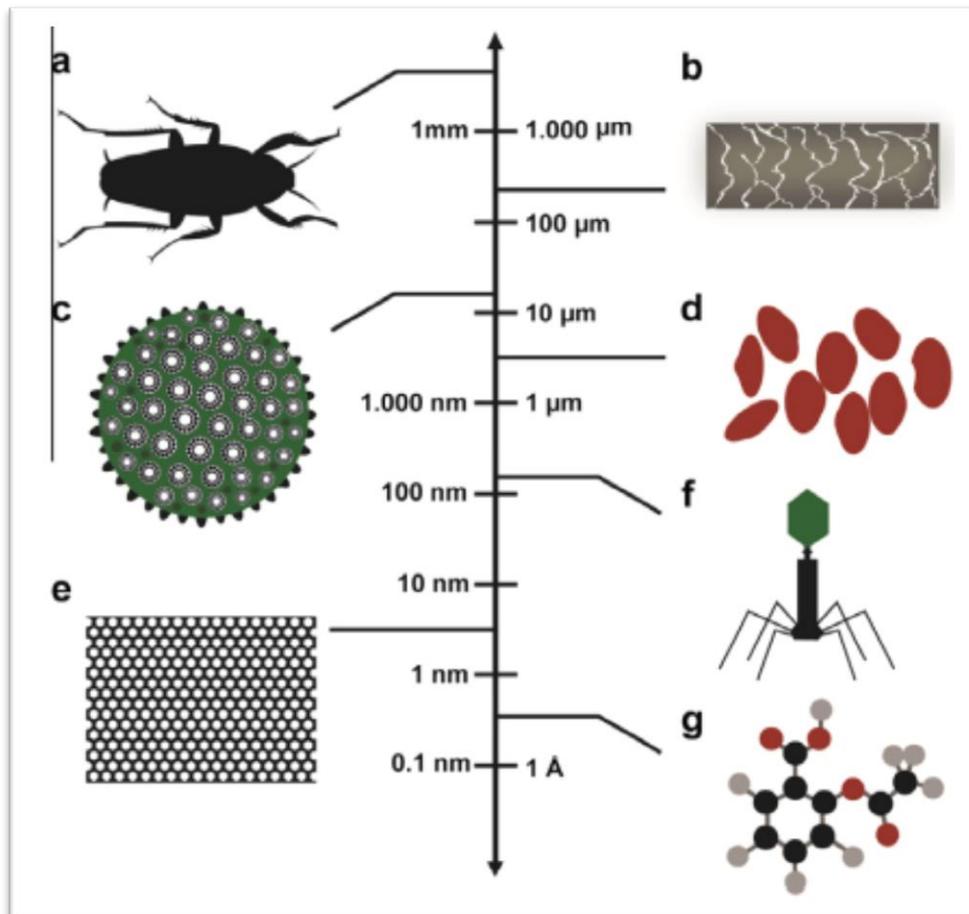
Com o advento de materiais biocompatíveis e biodegradáveis, como fosfolipídeos e polímeros e ainda, tecnologias de ponta para a liberação de fármacos, aumenta-se a possibilidade de aprimorar a eficácia e segurança dos produtos tópicos e, com isso, permitir uma maior adesão do paciente ao tratamento (KATARE *et al.*, 2010).

2.2 – NANOTECNOLOGIA

Segundo a Portaria nº 252 de 2004, emitida pelo Ministério da Ciência e Tecnologia, a nanotecnologia é definida como um conjunto de ações de pesquisa, desenvolvimento e inovação que são obtidas graças às especiais propriedades da matéria organizada a partir de estruturas de dimensões nanométricas. A escala de tamanho pode ser ilustrada com exemplos de seres vivos e objetos naturais a fim de se obter um referencial para compreender a que corresponde um nanômetro, conforme representado na **Figura 2**. Comparativamente, no topo da escala tem-se um inseto, que possui dimensões maiores que 1 mm, seguido pela espessura de um fio de cabelo, que situa-se entre 100 e 1000 μm , decrescendo até as dimensões do pólen, células vermelhas do sangue, alcançando finalmente o diâmetro nanométrico de um bacteriófago ou de uma rede de nanocristais de cobalto; a título de curiosidade, uma molécula de ácido

acetilsalicílico possui tamanho de partícula menor que o nanômetro, quase atingindo um angstrom.

Figura 2: Nanoescala em relação a objetos naturais e seres vivos: a) inseto; b) fio de cabelo; c) pólen; d) células vermelhas do sangue; e) rede de nanocristais de cobalto; f) bacteriófago; g) molécula de ácido acetilsalicílico (MYHRANYAN *et al.*, 2012)



À medida que o tamanho da partícula se aproxima desta escala, há uma mudança drástica na sua estrutura cristalina devido ao maior número de átomos localizados na superfície. As nanopartículas são caracterizadas por alta razão de superfície para volume, grande número de partículas por unidade de peso e ainda, poucos átomos por partícula (MYHRANYAN *et al.*, 2012). Essas particularidades implicam em propriedades físicas diferentes das apresentadas por seus análogos macroscópicos, o que lhes confere características peculiares, como tolerância à temperatura, alteração de cores, reatividade química, solubilidade, condutividade elétrica, ou mesmo força de intensidade extraordinária. Gonçalo, 2008, relata que a

platina, por exemplo, atua como catalisadora de reações químicas quando reduzida a nanopartícula, apesar de ser quimicamente inerte em sua estrutura macroscópica original. Eustis e El-Sayed, 2005, descrevem que o ouro convencional apresenta cor amarela, ao passo que as nanopartículas desse mesmo metal são azuladas ou vermelhas, dependendo do tamanho.

Ao contrário das demais tecnologias e ciências existentes, que se resumem em utilizar de disciplinas específicas, a nanotecnologia é inter e multidisciplinar devido à sua complexidade e abrangência (CADIOLI e SALLA, 2006). Uma de suas principais aplicações envolve o campo da nanobiotecnologia, que consiste em aplicar a nanotecnologia nas ciências da vida, associando a nanoescala à manipulação dos seres vivos, seja no desenvolvimento de novos fármacos e de tecnologia para direcionar e controlar sua liberação, ou de novas ferramentas para diagnóstico de doenças (DURÁN e DE AZEVEDO, 2002).

2.2.1 – Nanobiotecnologia na área farmacêutica

Durante a terapia sistêmica, os fármacos apresentam eficácia satisfatória, porém, frequentemente exibem inúmeros efeitos adversos (KINGSLEY *et al.*, 2006). Este quadro pode ser observado desde as terapias mais simples, envolvendo medicamentos de venda livre, ou seja, aqueles que podem ser adquiridos sem receita médica, até as mais complexas, que abrangem doenças mais graves e exigem medicamentos de acesso restrito ao paciente. Sawada e colaboradores, 2009, realizaram um estudo de caso em pacientes com câncer submetidos à quimioterapia e, através de um questionário, verificaram que 65% apresentaram algum efeito adverso oriundo da terapia, manifestado desde sintomas físicos, como calor, sede, fraqueza, até sinais emocionais ou gastrintestinais, como depressão, irritabilidade, náuseas e diarreias.

Um dos desafios da indústria farmacêutica é desenvolver fármacos que alcancem seletiva e especificamente seu sítio de ação, a fim de maximizar o efeito terapêutico e reduzir os colaterais (KINGSLEY *et al.*, 2006). Diante das dificuldades encontradas para cumprir este propósito, a nanobiotecnologia disponibiliza uma alternativa promissora: os Sistemas de Liberação Controlada (SLC), que consistem na associação de fármacos a nanocarreadores através do encapsulamento (CABALLERO, 2007). Conforme destacado por Kamaly *et al.*, 2012 e Batheja *et al.*, 2011, esses

sistemas apresentam uma série de vantagens em relação às formulações convencionais, tais como:

- Habilidade de melhorar a farmacocinética e as propriedades farmacológicas do princípio ativo, sem necessidade de alterar quimicamente a molécula;
- Possibilidade de encapsular fármacos hidro ou lipofílicos;
- Potencialização da eficácia terapêutica através da liberação do fármaco no tecido-alvo, ou mesmo em células específicas, evitando danos em células saudáveis;
- Permeação de fármaco através das barreiras biológicas, inclusive a epitelial e endotelial;
- Aumento da penetração celular na pele;
- Possibilidade de administração de doses menores;
- Perfil de liberação controlada ou sustentada.

Existem diversos nanocarreadores disponíveis tanto como objetos de pesquisa quanto já comercializados no mercado, com possíveis aplicações nas mais variadas áreas; na farmacêutica, seus principais representantes empregados como SLC são:

- *Lipossomas*, constituídos por uma bicamada fosfolipídica circundada por um núcleo aquoso, que permite o encapsulamento de moléculas polares. Substâncias anfífilas ou lipofílicas são solubilizadas no interior da bicamada fosfolipídica, de acordo com sua afinidade pelos fosfolipídeos (MYHRANYAN *et al.*, 2012);
- *Nanopartículas poliméricas*, que são sistemas coloidais sólidos obtidos a partir de aglomerados macromoleculares e/ou moleculares, no qual o princípio ativo é dissolvido, retido, encapsulado, ou mesmo adsorvido na interface externa (VAUTHIER e BOUCHEMAL, 2009);
- *Nanopartículas lipídicas sólidas*, que são constituídas por lipídeos sólidos à temperatura ambiente e corporal, e são adequadas para o encapsulamento de fármacos lipofílicos. Além disso, apresentam alta estabilidade durante o estoque

e boas propriedades de oclusão da pele, o que aumenta a partição de princípios ativos no estrato córneo (PARDEIKE *et al.*, 2009);

- *Nanoemulsões*, compostas por fases oleosa e aquosa e ainda, uma emulsionante constituída por tensoativos, formando glóbulos de tamanho submicrométrico. Estes sistemas proporcionam a saturação do estrato córneo com altos níveis da substância ativa, o que não seria possível com os carreadores convencionais (TADROS *et al.*, 2004);
- *Nanopartículas metálicas*, frequentemente associadas ao metal ouro, apresentam forma coloidal sólida e aplicam-se principalmente à terapia do câncer, na qual visam aumentar o efeito terapêutico dos fármacos associados a este carreador devido à sua maior afinidade pelas células cancerosas, o que limita a exposição do princípio ativo às células e tecidos sadios (NAAHIDI *et al.*, 2013);
- *Ciclodextrinas*, que são oligossacáridos cíclicos, constituídos por um número variável de unidades de glicose que se obtêm por ação da enzima ciclodextrina- α -glicosil-transferase (CGTase) sobre o amido. Possuem cavidade de natureza apolar, onde é possível encapsular fármacos lipofílicos, sem que haja o estabelecimento de ligações covalentes (SALTÃO e VEIGA, 2001);
- *Dendrímeros*, que são estruturas poliméricas altamente ramificadas, cuja forma, tamanho e comprimento da ramificação são controlados e bem definidos (NAAHIDI *et al.*, 2013).

2.3 – NANOEMULSÕES

Emulsões são sistemas heterogêneos, nos quais pelo menos um líquido imiscível está disperso em outro na forma de gotículas ou glóbulos. A mistura destas duas fases, geralmente uma aquosa e outra oleosa, forma um sistema termodinamicamente instável, o que justifica a necessidade de uma terceira fase, denominada emulsionante (FRYD e MASON, 2012). Esta última é composta de tensoativos que, ao reduzirem a tensão interfacial do sistema, podem causar redução da coalescência das gotículas a níveis insignificantes, gerando conseqüente aumento da sua estabilidade. De acordo com a lipofilia ou hidrofília do tensoativo formam-se emulsões óleo em água (O/A) ou água em óleo (A/O) (SAJJADI, 2006).

As nanoemulsões podem ser definidas como emulsões de aspecto translúcido ou transparente, geralmente dispersas em fase aquosa, cujo tamanho médio das gotículas varia de 10 a 500 nm (IZQUIERDO *et al.*, 2002) e cada uma é envolta por moléculas de tensoativo. Ao contrário das microemulsões, que são termodinamicamente estáveis mas requerem altas concentrações de tensoativos (acima de 20%), as nanoemulsões são consideradas sistemas metaestáveis e são obtidas com concentrações de surfactante variando entre 3 a 10% (IZQUIERDO *et al.*, 2002; McCLEMENTS, 2012); além disso, elas também são passíveis de diluição, sem que haja mudança no tamanho dos glóbulos (FERNANDEZ *et al.*, 2004).

Conforme descrito por Tadros *et al.*, 2004; Anton *et al.*, 2008; McClements, 2012 e Koroleva & Yurtov, 2012, o diâmetro submicrométrico das nanoemulsões confere-lhes vantagens em relação às macroemulsões, tais como:

- Prevenção dos fenômenos de sedimentação e cremeação, uma vez que a força da gravidade é inferior ao movimento *Browniano* característico das nanoemulsões;
- Prevenção da floculação das gotículas, o que permite a dispersão sem separação de fases;
- Prevenção da coalescência, uma vez que gotículas envoltas por tensoativos não-iônicos etoxilados adquirem estabilidade estérica, tornando improvável a associação de dois ou mais glóbulos, que levaria a um aumento do tamanho das gotículas;
- Prevenção da agregação, pois as forças atrativas entre dois glóbulos decrescem com a redução do tamanho das gotículas.

2.3.1 – Aplicações

Dentre os sistemas vetorizados, as nanoemulsões são consideradas um dos mais atrativos para aplicação, uma vez que atuam como carreadores ou sistemas de liberação controlada para compostos lipofílicos, como: nutracêuticos, fármacos, aromatizantes e agentes antimicrobianos (SILVA *et al.*, 2011). Os sistemas de liberação baseados em nanoemulsões podem ainda, melhorar a biodisponibilidade de fármacos encapsulados

devido ao pequeno tamanho do glóbulo e alta razão de superfície para volume (TADROS *et al.*, 2004).

As nanoemulsões são utilizadas numa ampla área do conhecimento, onde são aplicadas principalmente como produtos de uso veterinário, agroquímicos, domissanitários e ainda, nos mais variados campos da indústria (FRYD e MASON, 2012).

Através da aplicação de nanoemulsões, a empresa Unilever (atuante no setor alimentício e cosmético) criou um sorvete mais saudável, cujo teor de gordura foi reduzido de 16 para 1%, sem o comprometimento do sabor do alimento (UNILEVER, 2011; MARTINS *et al.*, 2007).

Na indústria cosmética, há um numeroso volume de patentes pertencentes às principais multinacionais (como o grupo L'Oréal, por exemplo) relatando a utilização de nanoemulsões contendo vitaminas A, C, D, E e seus derivados para aplicação tópica. Há também o relato destes sistemas como restauradores da epiderme (KOROLEVA & YURTOV, 2012). Estudos em humanos demonstraram que o aspecto sensorial das nanoemulsões, caracterizado pela espalhabilidade, é bastante agradável em comparação às formulações convencionais, o que foi justificado pelo fato de que a granulometria característica destes sistemas permite uma deposição uniforme sob o substrato da pele (TADROS *et al.*, 2004).

Na indústria farmacêutica, as nanoemulsões são amplamente usadas como veículo, uma vez que seu tamanho reduzido e a maior área superficial favorecem a permeação de fármacos através da estrutura complexa da pele (SADURNÍ *et al.*, 2005). Ammar e colaboradores, 2009, relataram o uso de nanoemulsões como um reservatório do cloridrato de dorzolamida e sua liberação sustentada na mucosa ocular, combatendo com eficácia o glaucoma. Liu e colaboradores, 2013, observaram uma melhor absorção intestinal e proteção contra degradação do peptídeo encapsulado em microemulsões A/O administradas por via oral, posteriormente relacionada ao tamanho nanométrico dos glóbulos. Nanoemulsões O/A contendo fármacos encapsulados podem, também, ser administradas pela via intravenosa, visando o direcionamento para o tecido-alvo a partir de modificações na sua estrutura, ou ainda, com o objetivo da nutrição parenteral (BRUXEL *et al.*, 2012).

Ainda na área farmacêutica, as nanoemulsões são usadas como meio reacional para reações de polimerização, a partir da adição de monômeros, iniciadores e ativadores, para a obtenção de outro sistema de liberação controlada, as nanopartículas poliméricas. Goto e colaboradores, 2013, submeteram nanoemulsões contendo monômeros derivados do acrilato à reação de polimerização *in situ* e confirmaram a obtenção de nanocápsulas após o tempo reacional de 4 horas.

2.3.2 – Métodos de preparo

Estão descritos na literatura diversos métodos de obtenção de nanoemulsões, que se subdividem, basicamente, em duas categorias: os que envolvem o uso de alta energia de emulsificação e os de baixa energia de emulsificação (IZQUIERDO *et al.*, 2002).

O primeiro grupo tem como objetivo emulsificar utilizando equipamentos que forneçam energia suficiente o bastante para superar a pressão de Laplace e, em seguida, quebrar as gotículas da emulsão em tamanhos menores através de cisalhamento (FERNANDEZ *et al.*, 2004). Esse grupo inclui os seguintes métodos: agitação por alta pressão, emulsificação por ultrassom, homogeneizadores de alta pressão e ainda, microfluidizadores (KOROLEVA & YURTOV, 2012).

No segundo grupo são utilizados métodos nos quais o fornecimento de um mínimo de energia é suficiente para desviar o comportamento físico-químico intrínseco do sistema a fim de que se obtenham emulsões de tamanho nanométrico (ANTON *et al.*, 2007). São eles:

- *Emulsificação espontânea*, baseada na rápida difusão de um solvente (previamente solubilizado na fase oleosa) para a fase aquosa durante o processo de emulsificação (ANTON *et al.*, 2008);
- *Emulsificação de membrana*, que envolve a formação de gotículas com a passagem do produto para a fase contínua através de uma membrana com porosidade controlada (SILVA *et al.*, 2011);
- *Inversão de fases pela alteração da fração volumétrica (método EIP)*, que consiste na adição sucessiva de água na fase oleosa. Inicialmente gotículas de

água formam uma emulsão A/O, que sofre inversão para O/A a medida que o volume de água é aumentado. A hidratação do tensoativo polietoxilado também aumenta e, no ponto da inversão de fases, este alcança a curvatura espontânea zero e tensão interfacial mínima, levando a formação de gotículas nanométricas (FERNANDEZ *et al.*, 2004; SOLANS e SOLÉ, 2012);

- *Inversão de fases pela temperatura (método TIF)*, que consiste em aquecer a emulsão O/A, preparada com tensoativos não iônicos etoxilados, que são moléculas termossensíveis; sendo assim, passam por um processo de desidratação e tornam-se mais hidrofóbicos, induzindo à formação de emulsão A/O. Quando o sistema é resfriado, os tensoativos atingem a curvatura espontânea igual a zero e tensão interfacial mínima, promovendo uma inversão de fases da emulsão A/O para nanoemulsão O/A (SHINODA e ARAI, 1964; ANTON *et al.*, 2007, 2008).

Há dois tipos de inversão de fases: a inversão transicional induzida por fatores que afetam o equilíbrio hidrofílico-lipofílico (EHL) do sistema, como por exemplo, temperatura e/ou a concentração de eletrólitos; e a inversão catastrófica, que é induzida pelo aumento da fração volumétrica da fase dispersa (TADROS *et al.*, 2004).

A inversão transicional ocorre quando a afinidade do tensoativo pela fase aquosa se equilibra com a afinidade pela fase oleosa. A variação na afinidade ou no EHL do tensoativo pode ser alcançada pela alteração da temperatura, adição de um tensoativo com EHL diferente, ou por adição de componentes que modificam o EHL do tensoativo, como é o caso dos eletrólitos (SALAGER *et al.*, 2004).

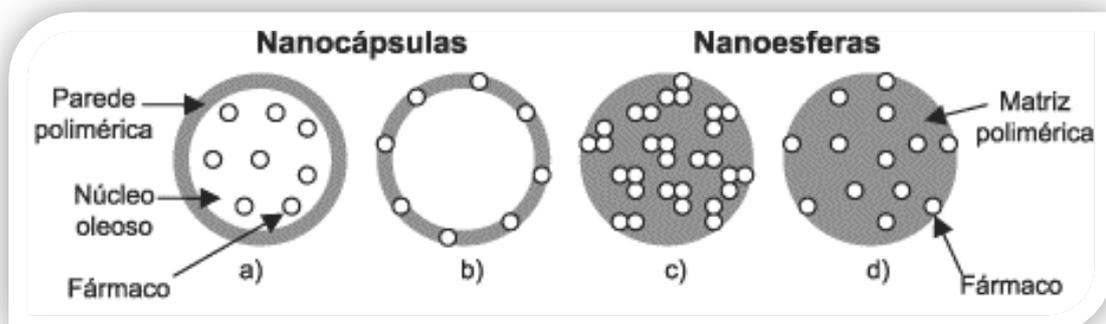
A inversão catastrófica ocorre em função do aumento da fração volumétrica da fase dispersa. De um modo geral, ela ocorre devido ao grande aumento na taxa de coalescência dos glóbulos de modo que o balanço entre a taxa de glóbulos coalescidos e glóbulos separados não é mantida. A inversão catastrófica é induzida pela adição da fase dispersa ou por qualquer outro fator aumente a taxa de coalescência dos glóbulos (FERNANDEZ *et al.*, 2004; SAJJADI, 2006).

2.4 – NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS

Nanopartículas poliméricas são definidas como sistemas coloidais sólidos particulados de diâmetro entre 10 nm a 1 µm (KINGSLEY *et al.*, 2006), formados a partir de agregados macromoleculares e/ou moleculares nos quais o fármaco encontra-se dissolvido, encapsulado ou mesmo adsorvido na interface externa (VAUTHIER e BOUCHEMAL, 2009). Frente a outros nanocarreadores de liberação de fármacos, como lipossomas, niossomas, microemulsões e até mesmo nanoemulsões, pode-se inferir que as nanopartículas apresentam duas vantagens relevantes: estabilidade cinética (também característica das nanoemulsões) e rigidez morfológica (ANTON *et al.*, 2008).

O termo nanopartícula é generalizado e engloba duas classes específicas de nanossistemas: nanoesferas e nanocápsulas (**Figura 3**), que diferem entre si segundo a composição e organização estrutural. As primeiras são formadas por uma matriz polimérica, na qual o princípio ativo é retido ou adsorvido (**Figura 3: c, d**), e não apresentam óleo em sua composição. Por outro lado, as nanocápsulas são constituídas por um núcleo oleoso, no qual o fármaco pode estar dissolvido (**Figura 3 - a**), envolto por um invólucro polimérico, onde o fármaco também pode estar adsorvido (**Figura 3 – b**) (TIARKS *et al.*, 2001; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). Quando se utiliza nanopartículas para a veiculação de fármacos, o polímero utilizado deve ser preferencialmente biocompatível, biodegradável (garantindo que não se acumule no organismo, mesmo após repetidas administrações), não tóxico e não imunogênico (VAUTHIER e BOUCHEMAL, 2009).

Figura 3: Representação esquemática de nanopartículas poliméricas (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003)



2.4.1 – Aplicações

No campo farmacêutico, as nanopartículas são consideradas sistemas vetorizados através dos quais é possível modular a biodisponibilidade do fármaco pelo controle da sua velocidade de liberação (BATHEJA *et al.*, 2011). Schaffazick *et al.*, 2003 e Kingsley *et al.*, 2006 mencionam as principais aplicações destes sistemas como carreadores de fármacos, visando às seguintes vias de administração:

- *Parenteral*, com o objetivo de mascaramento da formulação contendo o ativo, de modo que as células de defesa do organismo não reconheçam tais partículas como corpos estranhos, aumentando sua permanência na circulação e a possibilidade de interação direta com o receptor, causando apenas naquele local o efeito terapêutico desejado. Esse exemplo reflete o comportamento peculiar das nanopartículas revestidas com polietilenoglicol (PEG);
- *Oral*, na qual os objetivos principais são a redução dos efeitos colaterais de certos fármacos, destacando-se os anti-inflamatórios não-esteroidais, como o diclofenaco e a indometacina, que possuem alta capacidade irritante à mucosa gástrica e ainda, a proteção de fármacos degradáveis no trato gastrointestinal, como peptídeos, proteínas e hormônios;
- *Oftálmica*, com a finalidade de controle da liberação, aumento da biodisponibilidade ocular e diminuição dos efeitos adversos devido à absorção sistêmica de certos fármacos;
- *Tópica*, também usada como alvo de aplicação destes sistemas, sobretudo para aumentar a estabilidade e permeação de alguns princípios ativos.

Dentro do universo das nanopartículas, as nanocápsulas destacam-se como potenciais sistemas de aplicação terapêutica tópica (PROW *et al.*, 2011), pois quando o fármaco está encapsulado e “protegido” na cavidade oleosa, as irritações na pele após administração, o efeito de sua liberação inicial rápida (chamado efeito *burst*) e sua degradação e oxidação são minimizados. Além disso, as nanocápsulas possuem alta eficiência de encapsulação, devido à boa solubilidade dos fármacos no núcleo oleoso e ao baixo conteúdo polimérico comparado às nanoesferas (ANTON *et al.*, 2008). Por

fim, apresentam aspecto sensorial agradável e também, são estáveis por longo período de tempo.

2.4.2. – Métodos de obtenção

Os métodos de preparo das nanopartículas podem ser divididos em dois grupos principais: precipitação de polímeros pré-formados e polimerização *in situ* de monômeros dispersos.

A técnica de obtenção de nanopartículas poliméricas a partir de polímeros pré-formados baseia-se na dispersão de um polímero, natural ou sintético, de forma que o produto obtido adquira tamanho de partícula menor que 1µm e forma física adequada. Estão descritos na literatura os seguintes métodos: emulsificação e evaporação do solvente, emulsificação espontânea e difusão do solvente, nanoprecipitação, secagem por aspersão (*spray-drying*), separação de fase e *salting-out* (QUINTANAR-GUERRERO *et al.*, 1998; SCHAFFAZICK *et al.*, 2006; VAUTHIER e BOUCHEMAL, 2009).

Já a formação de nanopartículas poliméricas por polimerização *in situ* engloba dois métodos principais:

- *Polimerização interfacial*, que consiste em dissolver o fármaco e o monômero cianoacrilato numa mistura de óleo e etanol absoluto, que em seguida sofre extrusão para uma solução aquosa contendo tensoativo (REIS *et al.*, 2006);
- *Polimerização em emulsão*, que utiliza uma nanoemulsão (composta por gotículas de monômero circundadas por surfactantes) como meio reacional, no qual a reação se inicia dentro das gotículas e é desencadeada por um iniciador, adicionado na fase contínua. O mecanismo sugerido para esta reação é o de nucleação dos glóbulos, em que o radical entra em cada gotícula monomérica, dando início à polimerização, que também pode ser induzida por enzimas, radiação ultravioleta ou ainda, por ultrassom (SPERNATH e MAGDASSI, 2007; ANTON *et al.*, 2008).

O método de polimerização *in situ* apresenta vantagens sobre os demais, tais como: produção de polímero com massa molecular elevada e de partículas estruturadas; maior taxa de polimerização; produto final apresentado sob a forma de coloides

poliméricos, caracterizado por nanopartículas de tamanho controlado, situando-se usualmente entre 30 e 600 nm; e ainda, utiliza água como solvente, o que é benéfico para o meio ambiente (CHERN, 2006; LANDFESTER, 2009). Além disso, o custo do processo é baixo em relação aos outros, e a transposição para a escala industrial é viável.

2.5 – PROPIONATO DE CLOBETASOL

Os glicocorticoides de uso tópico são comumente indicados por dermatologistas para tratamento de algumas dermatites, devido às suas propriedades vasoconstritoras, anti-inflamatórias, imunossupressoras e anti-proliferativas (SENYIGIT *et al.*, 2009). Porém, o uso indiscriminado leva ao surgimento de efeitos indesejáveis, desde alteração na composição do estrato córneo, afetada pela inibição da síntese de colesterol, ácidos graxos e ceramidas que constituem esta camada, até prejuízos na estrutura da pele, com consequente alteração da sua função de barreira. Além disso, os glicocorticoides tópicos ainda podem causar efeitos adversos sistêmicos que limitam seu uso, tais como: hipertensão ocular; supressão do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (efeito raro, mas deve ser considerado especialmente em crianças, pois pode retardar o crescimento) ou o fenômeno da taquifilaxia, caracterizado pelo decréscimo da eficácia do fármaco devido ao uso contínuo, o que requer a troca do glicocorticoide por outro mais potente (HENGGE *et al.*, 2006; WIEDERSBERG *et al.*, 2008). Deste modo, a nanotecnologia constitui uma alternativa na tentativa de minimizar esses efeitos, pois dispõe de nanocarreadores que permitem o encapsulamento e o direcionamento de fármacos para os tecidos-alvos, o que aumenta a absorção e permite sua liberação em longo prazo diretamente no local adequado, reduzindo a frequência de administração e melhorando sua farmacocinética (FONTANA *et al.*, 2011).

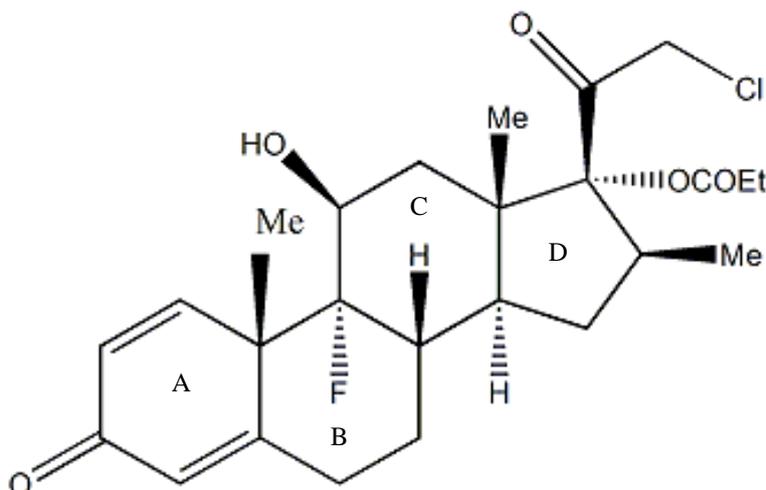
Dentre os glicocorticoides, o propionato de clobetasol destaca-se como um dos corticosteroides de uso tópico mais potentes, apresentando uma alta atividade glicocorticoide e uma baixa atividade mineralocorticoide, o que resulta em ação anti-inflamatória e vasoconstritora características de sua classe farmacológica (WIEDERSBERG *et al.*, 2008). Por esta razão, é utilizado para o tratamento de várias dermatoses associadas a processos inflamatórios e auto-imunes, tais como: psoríase, dermatites atópica e de contato, desidrose, eczemas recalcitrantes, líquen plano, lúpus

eritematoso discoide e outras dermatites que não respondem satisfatoriamente a esteroides menos potentes (ANVISA, 2012).

O propionato de clobetasol é indicado com frequência pelos dermatologistas no tratamento da psoríase. Lowe e colaboradores, 2005, confirmaram sua eficácia num estudo investigativo e multicêntrico, em pacientes portadores de psoríase moderada a grave que foram divididos e submetidos a três tratamentos distintos: clobetasol veiculado em loção, em creme e somente o veículo da loção. Os autores concluíram que o fármaco associado aos dois veículos foi eficaz no tratamento da patologia em comparação à loção isenta de qualquer princípio ativo. Esse mesmo parâmetro foi também comprovado por Jarratt e colaboradores, 2006, ao constatar a eficácia do *spray* de propionato de clobetasol em pacientes com psoríase moderada a grave, em comparação ao veículo. Apesar da eficácia comprovada, em ambos os estudos houve relatos de efeitos adversos, como irritação, ardência e queimação no local aplicado.

Quimicamente, o propionato de clobetasol possui fórmula molecular de $C_{25}H_{32}ClFO_5$, peso molecular igual a 466,98 e é identificado como 21-cloro-9-fluor-11 β ,17-dihidroxi-16 β -metilpregna-1,4-dieno-3,20diona 17-propionato, conforme a estrutura da **Figura 4**.

Figura 4: Estrutura química do propionato de clobetasol. As letras A, B, C, D indicam os anéis da estrutura do corticosteroide



Os grupos funcionais encontrados em sua estrutura são ésteres e alquil-vinil cetonas. Devido à menor quantidade de grupos polares presentes na molécula, o composto é praticamente insolúvel em água, moderadamente solúvel em álcool, solúvel

em acetona, clorofórmio, dimetilsulfóxido, dioxana e metanol, e levemente solúvel em benzeno e éter (ANVISA, 2012). O propionato de clobetasol tem ponto de fusão em torno de 196°C e é uma molécula lipofílica (Log P = 4,11).

O fármaco é comercializado no Brasil em diferentes formas farmacêuticas, tais como: cremes, loções capilares, pomadas, géis e soluções tópicas; todas contendo o propionato de clobetasol em concentração igual a 0,5 mg/mL.

Além das formulações convencionais, estudos atestam que o fármaco já foi veiculado a alguns nanocarreadores, conforme demonstrado por Capó e colaboradores, 2004, que realizaram uma pesquisa de comparação da potência biológica do clobetasol entre sua forma livre numa formulação convencional e encapsulado em lipossomas, onde foi possível constatar que esta última apresentou uma ação 2,35 vezes maior. Já Hu e colaboradores, 2002, desenvolveram nanopartículas lipídicas sólidas contendo propionato de clobetasol, realizaram os testes de caracterização físico-química do sistema e ainda, o perfil de liberação e verificaram inicialmente o efeito *burst* seguido de uma liberação controlada de cerca de 6% do fármaco a cada dia. Um trabalho mais recente do grupo de Badilh e colaboradores, 2011, consistiu na encapsulação do clobetasol em microesferas compostas pelo polímero ácido poli-(D, L, lático-co-glicólico) (PLGA) obtidas pela técnica de evaporação do solvente, em que também foi constatada maior liberação do fármaco encapsulado em comparação ao produto comercial. Além desses exemplos, há relatos de que o propionato de clobetasol foi também veiculado a nanoemulsões, carreadores lipídicos nanoestruturados e ainda, nanopartículas de lecitina/quitosana (AGUIAR, 2010; SENYIGIT *et al.*, 2010).

O propionato de clobetasol é estável à temperatura ambiente (25°C) e suas loções, pomadas, cremes, géis e xampus devem ser estocados dentro da faixa de temperatura de 4 até 30°C (KASONGO, 2007). A fim de obter maiores informações a respeito de seus produtos de degradação, Fauzee e Walker, 2013, realizaram um estudo de estabilidade do fármaco em solução metanólica e do seu creme comercial frente a condições extremas de estresse, como temperatura, exposição a ácidos e bases fortes, reações de oxidação e hidrólise e ainda, frente à luz. Um dos resultados mais relevantes obtidos foi a detecção de um provável produto de degradação do fármaco após seu aquecimento a temperaturas superiores a 80 até 100°C por 4 horas; por outro lado, o propionato de clobetasol apresentou-se estável diante do aquecimento até a temperatura

de 80°C, pelo mesmo período de tempo. Outros produtos de degradação foram identificados após a exposição do fármaco à base forte hidróxido de sódio (NaOH). Por fim, foi observado no cromatograma outro pico sem interferência com o do clobetasol, após sua exposição à luz ultravioleta (UV) por 24 horas; esse pico foi também associado a produto de degradação e relacionado à proposição de que corticosteroides que possuem 2 ligações duplas no anel A da sua estrutura, como é o caso do clobetasol (**Figura 4**), apresentam maior sensibilidade à luz UV, gerando tal produto. Os autores concluíram, então, que o fármaco é estável diante da maioria dos fatores de estresse aos quais foi submetido.

Com o intuito de avaliar a fotoestabilidade do propionato de clobetasol, Fontana e colaboradores, 2009, submeteram formulações contendo o fármaco encapsulado e livre à radiação pela luz UV por 24 horas; após as primeiras 8 horas, foi feita uma análise cromatográfica das amostras e constatado que até esse período de tempo não tinha havido degradação do fármaco em ambas as formulações. Ao final do experimento foi observado que, após 10 horas de irradiação pela luz UV, a formulação que continha o clobetasol livre apresentou apenas 50% da concentração do fármaco (chamado tempo de meia-vida), ao passo que esse mesmo parâmetro foi de 18 horas para a nanocápsula que continha o princípio ativo encapsulado. Os autores concluíram, então, que as nanoformulações foram capazes de melhorar a fotoestabilidade do clobetasol em quase 2 vezes, em comparação à sua forma livre.

De acordo com as publicações encontradas na literatura, foi constatado que o propionato de clobetasol ainda não foi encapsulado em nanocápsulas produzidas por polimerização *in situ*. Sendo assim, o presente trabalho proporciona perspectivas para aplicação das nanocápsulas destinadas ao tratamento da psoríase, de forma mais eficaz e com o mínimo de efeitos adversos.

3. Objetivos

3 – OBJETIVOS

3.1 – OBJETIVO GERAL:

Desenvolver e caracterizar nanocápsulas de propionato de clobetasol obtidas por polimerização *in situ*.

3.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- ✓ Obter nanoemulsões de propionato de clobetasol através do método de inversão de fases;
- ✓ Realizar testes de estabilidade das nanoemulsões;
- ✓ Desenvolver nanocápsulas de propionato de clobetasol por polimerização *in situ* a partir das nanoemulsões;
- ✓ Proceder aos testes de caracterização físico-química dos sistemas nanoestruturados desenvolvidos.

4. Material e Métodos

4 - MATERIAL E MÉTODOS

4.1 – MATERIAL

Para manipulação das nanoemulsões, foi preparada uma fase oleosa interna constituída por óleo de soja, os tensoativos óleo de rícino etoxilado e hidrogenado (Croduct 50 Special[®]) e monooleato de sorbitano (Span 80), propionato de clobetasol (Sigma e Pharma Nostra) e os monômeros acrilato de 2-etilhexila (A2EH) e acrilato de butila (AB) (BASF), cujos valores de densidade são iguais a 0,887 e 0,898 g/cm³, respectivamente. Para compor a fase aquosa, utilizou-se apenas água recém-destilada.

No processo de polimerização foram utilizadas soluções aquosas de persulfato de potássio (KPS) e sulfato ferroso (FeSO₄).

Para a etapa analítica do trabalho, foi utilizado metanol grau CLAE (TEDIA), acetonitrila, acetato de sódio tri-hidratado (Synth), polietilenoglicol 400 (PEG 400), cloreto de sódio, cloreto de potássio, fosfato de sódio dibásico dodeca-hidratado, fosfato de potássio monobásico (todos da Vetec) e Labrasol[®] (Brasquim).

4.2 – MÉTODOS

4.2.1 – Obtenção das nanoemulsões O/A

As nanoemulsões O/A foram preparadas pelo método de inversão de fases, conforme descrito por MORAIS, 2008. A fase oleosa foi constituída por óleo de soja (5,0% p/p), pela mistura de tensoativos (Croduct 50[®] a 3,0% p/p e Span 80 a 2,0% p/p), propionato de clobetasol a 0,05% e monômeros (previamente filtrados através de uma coluna de carvão ativo para a retirada do inibidor de polimerização.) a uma proporção variada em cada formulação, de acordo com as composições descritas nas **Tabelas 2 e 3**. As fases oleosa e aquosa foram aquecidas separadamente em banho-maria até a temperatura de 80 ± 2°C; em seguida, a fase aquosa foi vertida lentamente sobre a oleosa e a mistura, submetida à emulsificação sob agitação mecânica constante de 600 rpm (Fisaton[®] - Mod.713), até o resfriamento das amostras à temperatura ambiente (25 ± 2°C).

Foram preparadas duas nanoemulsões distintas, conforme sua composição monomérica variada (**Tabelas 2 e 3**). Cada uma foi obtida com volume final de 30,0 mL, dos quais 20,0 mL foram separados para posterior reação de polimerização e os 10,0 mL restantes foram usados para testes de caracterização físico-química.

Tabela 2: Composição da nanoemulsão NE A2EH

Óleo de soja	Tensoativos		Monômero	Propionato de clobetasol	Água
5%	5%		Acrilato de 2-etilhexila 5%	0,05%	84,95%
	Croduret [®] 50 60%	Span 80 40%			

Tabela 3: Composição da nanoemulsão NE A2EH + AB

Óleo de soja	Tensoativos		Monômeros		Propionato de clobetasol	Água
5%	5%		5%		0,05%	84,95%
	Croduret [®] 50 60%	Span 80 40%	Acrilato de 2-etilhexila 50%	Acrilato de butila 50%		

4.2.2 – Análise da estabilidade das nanoemulsões

Foram transferidas alíquotas de 1,0 mL das nanoemulsões para microtubos vedados e mantidas em repouso para posteriores ensaios de estabilidade.

4.2.2.1 – Avaliação macroscópica

As nanoemulsões recém-preparadas foram visualmente observadas durante o período de 24 horas para que fossem verificados sinais de instabilidade, como: cremeação, floculação, precipitação ou separação de fases (ROLAND *et al.*, 2003); e modificações no aspecto físico, representadas por: escurecimento e alteração na fluidez e homogeneidade do sistema.

4.2.2.2 – Avaliação microscópica

Após a confirmação da estabilidade macroscópica das formulações, uma pequena quantidade de cada amostra foi colocada sobre uma lâmina de vidro e coberta com uma lamínula para observação ao microscópio ZEISS – Scope A1 Axio. Sua estrutura foi verificada quanto à morfologia, homogeneidade e à presença de estruturas birrefringentes (cristais líquidos), que podem ser identificadas com o auxílio da luz polarizada (SANTOS, 2006).

Neste teste, é importante ressaltar que os nanossistemas não são passíveis de visualização ao microscópio, devido ao tamanho de partículas inferior a 1 µm. Sendo assim, a presença de glóbulos emulsionados, cristais e outras partículas foi considerada como justificativa para o descarte das formulações.

4.2.2.3 – Estabilidade sob força gravitacional

As amostras foram submetidas à centrifugação no equipamento Centrifuge eppendorf 5415 D, sob ciclos de 7500, 10000 e 12500 rpm (5220, 9281 e 14500 G, respectivamente), por 10 minutos em cada rotação (SANTOS, 2006). Depois de cada ciclo de centrifugação, foi feita nova avaliação macroscópica para confirmar a ausência dos sinais de instabilidade. Ao final do teste, as amostras foram analisadas quanto ao tamanho dos glóbulos, utilizando o equipamento Nanosizer N5 Plus (Beckmann Coulter – USA). O experimento foi realizado em triplicata e após 1, 7, 15 e 30 dias da preparação das formulações.

4.2.2.4 – Estabilidade sob estresse térmico

As amostras das nanoemulsões foram aquecidas em banho-maria na faixa de temperatura de 40 a 80 ± 2°C, durante ciclos de 30 minutos, com incrementos de temperatura de 5°C após cada ciclo. Ao final de cada patamar de temperatura, as nanoemulsões foram analisadas macroscopicamente para verificar a sua integridade (MORAIS, 2008). Concluído o teste, as amostras foram submetidas à análise de tamanho dos glóbulos, utilizando o equipamento Nanosizer N5 Plus (Beckmann Coulter – USA). O experimento foi realizado em triplicata e após 1, 7, 15 e 30 dias da preparação das formulações.

4.2.2.5 – Análise estatística

Os valores de tamanho dos glóbulos das nanoemulsões analisados após os testes de centrifugação e estresse térmico foram avaliados por ANOVA a fim de constatar se houve diferença estatística entre as médias obtidas. O intervalo de confiança adotado foi de 95% e as diferenças foram consideradas estatísticas quando $p < 0,05$.

4.2.3 - Determinação da temperatura de inversão de fases

O teste foi realizado através da avaliação da condutividade elétrica das amostras, expressa em μScm^{-1} , utilizando o condutivímetro CD 820 - Instrutherm. O eletrodo foi inserido diretamente nas nanoemulsões, que foram aquecidas em banho-maria e mantidas sob agitação magnética a partir da temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$), com elevação de 1°C , até 87°C . A temperatura em que ocorreu a inversão de fases foi determinada através da média da temperatura entre o maior e o menor valor alcançado pela condutividade (IZQUIERDO *et al.*, 2002).

4.2.4 - Polimerização *in situ*

Para desencadear a reação de polimerização, foram adicionados $3,662 \times 10^{-4}$ mols das soluções aquosas de KPS a 10% p/p e de FeSO_4 0,5 mol/L (que correspondem a 1,0 mL de cada solução) em 20,0 mL de cada uma das nanoemulsões, nos tempos 0 e 2 horas. O meio reacional foi mantido à temperatura de 40°C , em banho-maria, sob agitação magnética, durante 4 horas (SPERNATH e MAGDASSI, 2007).

4.2.5 – Determinação do valor pH das formulações

O pHmetro Lutron[®] modelo PH-221 foi devidamente calibrado com soluções de valores de pH iguais a 4,0 e 7,0. Em seguida, o eletrodo foi diretamente inserido em cada uma das amostras de nanoemulsões e nanocápsulas para determinação do valor de pH. O teste foi realizado em triplicata após 1, 7 e 30 dias da preparação das formulações.

4.2.6 - Caracterização físico-química das nanocápsulas

4.2.6.1 - Análise da distribuição granulométrica

O tamanho médio efetivo dos glóbulos das nanoemulsões e das partículas das nanocápsulas foi determinado pela técnica de espectroscopia por correlação de fótons (ECF), com o equipamento Nanosizer N5 Plus (Beckmann Coulter – USA). Através deste método foi possível obter o diâmetro médio, avaliado pela intensidade de flutuação da dispersão de luz que é causada pelo movimento *Browniano* das partículas, e o índice de polidispersão das formulações.

As amostras foram submetidas ao espalhamento de luz com um ângulo fixo de 90°, na temperatura de 25°C, com medições realizadas em triplicatas. Para efetuar o procedimento, uma alíquota de 20,0 µL das amostras foi diluída em 4980,0 µL de água ultrapura (Milli-Q®) em uma cubeta de quartzo, à temperatura ambiente. O tamanho médio dos glóbulos das nanoemulsões foi analisado antes da polimerização e o das partículas das nanocápsulas, após a polimerização.

4.2.6.2 - Análise morfológica por microscopia de força atômica (MFA)

A observação por MFA foi feita à temperatura ambiente e sem necessidade de cobertura das nanocápsulas (PEREIRA *et al.*, 2008). Foram utilizados os aparelhos Dimension 3000 e Multimode, ambos controlados pelo programa Nanoscope IIIa da Digital Instruments (Santa Barbara, CA, E.U.A.).

Para analisar as amostras, foi utilizada mica como substrato. Trata-se de uma resina colocada sobre a lâmina de microscópio que, antes de receber as amostras, é clivada para garantir que sua superfície esteja completamente lisa, sem partículas de poeiras ou impressões digitais, que causariam interferência durante as análises. O processo de clivagem consiste em retirar as camadas superiores da mica com o auxílio de uma fita adesiva.

O experimento foi realizado da seguinte maneira: sobre a superfície clivada da mica foi depositado 5 µL da amostra, sendo em seguida seca e fixada com um jato de argônio. As imagens foram obtidas em modo de contato intermitente, utilizando sondas de silício da Nanosensors™, com cantilever de 228 µm de comprimento, frequências de ressonância no intervalo de 75-98 kHz, constantes de mola de 29- 61 N/m e um raio de

curvatura da ponta nominal 5-10 nm. Foi utilizada a taxa de varredura de 1 Hz. Análise dimensional foi realizada usando o sistema de “análise de seção” do programa. Os valores representam uma média \pm desvio padrão de cerca de 40 medições de partículas.

4.2.6.3 – Análise por Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FT-IR)

Anteriormente à análise dos polímeros das amostras por infravermelho, eles foram extraídos conforme adaptação do procedimento descrito por TAS e MATHIAS, 2010, a partir da adição de 3,0 mL das suspensões de nanocápsulas em tubos de vidro. As amostras foram misturadas em igual volume de clorofórmio com o auxílio de vórtex (MS 1 minishaker (1ka[®])) e submetidas à centrifugação (Excelsa[®] BABY 1 206R – Fanem Ltda) por 10 minutos para garantir a separação das fases orgânica e aquosa; esta última, na parte superior, foi retirada e em seguida foi adicionada uma alíquota de 3,0 mL de metanol na fase orgânica inferior. O mesmo procedimento de homogeneização e centrifugação foi realizado e as amostras foram mantidas em estufa a 35°C por 48 horas. Para obtenção dos espectros de infravermelho, o equipamento utilizado foi o Varian 640-IR Spectrometer FT-IR, com o dispositivo ATR (reflectância total atenuada) que permite a análise da amostra íntegra, sem a necessidade de tratamento prévio. Desta forma, cada amostra de polímero previamente extraída foi diretamente adicionada em quantidade suficiente para cobrir todo o prisma do aparelho. Os espectros foram registrados no intervalo de 4000 - 380 cm^{-1} com resolução de 4 cm^{-1} e 32 varreduras.

4.2.7 - Quantificação do propionato de clobetasol a partir das nanocápsulas

4.2.7.1 - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A metodologia para quantificação do propionato de clobetasol por CLAE já foi validada e utilizada por alguns autores (AGUIAR, 2010; FONTANA *et al.*, 2010). Sendo assim, este método foi adotado para determinação da concentração do fármaco após os testes de solubilidade, eficiência de encapsulação e liberação *in vitro*, de acordo com os parâmetros da **Tabela 4**.

Tabela 4: Condições cromatográficas para quantificação do propionato de clobetasol

Equipamento	Waters Alliance 2695
Fase móvel	Metanol : Água purificada (74:26)
Fluxo	1,0 mL/min
Volume de injeção	50,0 µl
Tempo de corrida	8,5 minutos
Detector	UVvis 2996 – $\lambda = 240$ nm
Temperatura	30°C
Coluna	Octadecilsílica - C18, Macherey-Nagel (150,0 mm x 4,6 mm x 3,0µm)
Pré-coluna	Octadecilsílica - C18, Phenomenex

A fase móvel, composta por metanol grau CLAE e água purificada, na proporção de 74 para 26, foi previamente filtrada em membrana de PTFE de 0,45 µm (MilliPore®) e degaseificada em banho ultrassom (Ultracleaner 1400 Unique Ultrasonic Clean). Antes da injeção das amostras, a coluna foi estabilizada com fase móvel por 30 a 40 minutos até que a linha de base permanecesse constante.

4.2.7.1.1 - Curva analítica do propionato de clobetasol

Com a finalidade de obter uma curva analítica referente às concentrações de 0,1; 0,5; 1,0; 5,0; 10,0; 20,0 e 40,0 µg/mL de propionato de clobetasol foram manipuladas duas soluções estoque. A primeira, de concentração igual a 50,0 µg/mL foi preparada a partir da pesagem exata de 12,5 mg do fármaco padrão (Sigma) em balão volumétrico de 250 mL, cujo volume foi aferido com fase móvel. Para construir os pontos referentes às concentrações de 40,0; 20,0; 10,0; 5,0 e 1,0 µg/mL de propionato de clobetasol, foram transferidos, respectivamente, 800, 400, 200, 100 e 20 µL da solução estoque 50,0 µg/mL para volume final de 1,0 mL, também completado com fase móvel.

A segunda solução estoque foi obtida pela transferência de 100,0 µL da primeira (de concentração igual a 50,0 µg/mL), para balão volumétrico de 10 mL, resultando numa solução de concentração igual a 0,5 µg/mL. Assim, para preparar os pontos da curva analítica referentes às concentrações de 0,5 e 0,1 µg/mL de propionato de clobetasol, foram transferidos, respectivamente, 1000 e 200 µL da solução estoque 0,5 µg/mL para volume final de 1,0 mL, também completado com fase móvel.

Por fim, cada ponto da curva foi filtrado com unidade HV Millex com membrana Durapore[®] de 13 mm de diâmetro e poro de 0,45µm antes de sua injeção no aparelho (AGUIAR, 2010; FONTANA *et al.*, 2010).

O procedimento foi realizado em triplicata e as áreas médias dos picos referentes aos padrões foram plotados em função das concentrações nominais num gráfico, obtendo-se uma curva média. A fim de avaliar a eficiência do método analítico, a linearidade de cada curva analítica foi analisada após o cálculo do coeficiente de correlação linear (r). Essa mesma curva foi refeita e utilizada para determinação da concentração real do fármaco para ambos os experimentos de eficiência de encapsulação e liberação *in vitro*.

4.2.7.2 - Solubilidade

A solubilidade do propionato de clobetasol foi determinada pelo método conhecido como *shake-flask* e consistiu na adição de um excesso do fármaco ($m = 150,0$ mg) em 30,0 mL do meio receptor em teste, em triplicata; as amostras foram mantidas a 37°C em banho-maria sob agitação, por 48 horas. Uma amostra foi coletada a cada 24 horas, filtrada em unidade HV Millex com membrana Durapore[®] de 13 mm de diâmetro e poro de 0,45µm para garantir a remoção do excesso do princípio ativo (não solubilizado) e injetada no CLAE para quantificação do fármaco (MUTHU e SINGH, 2009).

Para cada meio receptor testado, foi preparada uma solução estoque de 0,5 mg/mL, com a finalidade de se obter uma curva analítica de concentrações diferentes das usadas nos testes de eficiência de encapsulação e liberação *in vitro*. O procedimento consistiu na pesagem de 12,5 mg do padrão de propionato de clobetasol em balão volumétrico de 25 mL, que teve seu volume aferido com o meio receptor em teste; uma solução estoque de mesma concentração solubilizada em fase móvel também foi preparada. Os pontos referentes à curva analítica, correspondentes às concentrações de 500,0; 250,0; 100,0; 50,0; 25,0 e 10,0 µg/mL de propionato de clobetasol foram construídos, respectivamente, a partir da diluição de 1000, 500, 200, 100, 50 e 20 µL da solução estoque de 0,5 mg/mL para volume final de 1,0 mL.

Os meios testados foram: tampão acetato de sódio pH 5,5 : Etanol (1:1); tampão fosfato-salina (PBS) : PEG 400 (60:40); e tampão acetato de sódio pH 5,5 : Labrasol a 5%.

4.2.7.3 – Determinação da eficiência de encapsulação

O teste foi realizado em duas etapas paralelas: na primeira, 1,0 mL de ambas as nanocápsulas foi dissolvido em 25 mL de acetonitrila para que houvesse o rompimento da estrutura polimérica e, conseqüentemente, a liberação de todo o fármaco presente no sistema, tanto encapsulado quanto adsorvido na superfície. A quantidade de clobetasol presente somou-se, ainda, à dispersa na fase aquosa, denominando esta etapa de fármaco total. Na segunda, foi determinada a quantidade de fármaco livre (não associado às nanoestruturas), a partir da técnica de ultrafiltração/centrifugação, que consistiu na adição de 500 µL de cada amostra de nanocápsula em microtubos para ultrafiltração (Ultrafree-MC 10.000 MW, Millipore) e centrifugação por 12000 rpm, durante 30 minutos. Após esse procedimento, o ultrafiltrado foi recuperado para análise (FONTANA *et al.*, 2009). O método foi executado em triplicata.

Ao final, o propionato de clobetasol foi quantificado conforme o método validado por CLAE.

A eficiência de encapsulação (EE) foi dada pelo quociente da diferença entre a concentração de fármaco total e fármaco livre e a concentração de fármaco total. A fórmula foi multiplicada por 100 para que o resultado fosse expresso em porcentagem, conforme a equação:

$$\% \text{ EE} = \frac{([\text{Clobetasol}_{\text{total}}] - [\text{Clobetasol}_{\text{livre}}]) * 100}{[\text{Clobetasol}_{\text{total}}]}$$

4.2.7.4 – Determinação da eficiência do processo

A eficiência de processo (EP) foi avaliada para quantificar a perda de fármaco durante o procedimento de obtenção das nanocápsulas. O cálculo foi feito baseado em duas etapas:

- Concentração do fármaco no início do procedimento, obtida pelo quociente entre a média das massas de clobetasol pesadas no preparo das formulações, em

triplicata (m = 15, 12 mg para NE A2EH e m = 14,95 para NE A2EH + AB) e o volume de cada formulação (v = 30,0 mL);

- Concentração do clobetasol no final do processo, dada pela concentração de fármaco encapsulada, obtida a partir da diferença entre a concentração de fármaco total e livre nas nanocápsulas.

A eficiência do processo foi calculada pelo quociente entre a concentração de clobetasol final e inicial. Para que o resultado fosse expresso em porcentagem, a fórmula foi multiplicada por 100, conforme a equação:

$$\% \text{ EP} = \frac{[\text{Clobetasol}_{\text{final}}] * 100}{[\text{Clobetasol}_{\text{início}}]}$$

4.2.7.5 – Liberação *in vitro* do propionato de clobetasol

A liberação do propionato de clobetasol foi realizada pelo método de diálise reversa, conforme descrito por SANTOS-MAGALHÃES *et al.*, 2000. O procedimento consistiu na utilização de sacos de diálise, constituídos por membrana sintética de diálise de celulose (Dialysis tubing cellulose membrane D9777- 100FT, 25x16 mm - Sigma-Aldrich, St Louis, EUA), previamente hidratadas no meio de liberação por 24 horas. Cada saco de diálise foi amarrado em um bastão de vidro por ambas as extremidades; antes de serem totalmente vedados, foi adicionado 1,0 mL de meio receptor (tampão acetato de sódio pH 5,5 : Labrasol a 5%) em cada um. Foram preparados 9 sacos de diálise acoplados ao mesmo número de bastões de vidro, uma vez que cada um correspondeu a um tempo de coleta.

Em um béquer, foram adicionados 200 mL de meio receptor (tampão acetato de sódio pH 5,5 : Labrasol a 5%), onde também foram inseridos os bastões de vidro contendo os sacos de diálise e ainda, 20,0 mL de amostra para dar início ao experimento. O procedimento foi feito em triplicata para cada formulação.

A diálise foi realizada à temperatura de 37°C e agitação horizontal, com retiradas de alíquotas de 1,0 mL do meio receptor e 1 bastão de vidro contendo um saco de diálise em função do tempo, sendo o volume retirado do meio substituído por igual quantidade de solução receptora, mantendo o sistema nas mesmas condições de trabalho. A alíquota referente ao meio receptor correspondeu ao total percentual de

amostra disponível, ao passo que a alíquota correspondente ao saco de diálise acoplado ao bastão de vidro, foi analisada como o percentual da real quantidade de fármaco liberada capaz de ultrapassar a membrana de diálise.

Os tempos de coleta foram de: 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12 e 24 horas; as formulações submetidas ao ensaio de liberação foram as nanocápsulas de poli-(A2EH) e poli-(A2EH + AB) contendo propionato de clobetasol na concentração de 0,5 mg/mL e uma solução etanólica do fármaco (FL) preparada na mesma concentração.

A quantificação do fármaco foi determinada pelo método validado por CLAE. Para que as amostras referentes ao saco de diálise fossem quantificadas pela mesma curva analítica das correspondentes ao meio receptor, estas foram diluídas na proporção de 1:1.

4.2.7.5.1 – Análise estatística

O *Test t* de Student pareado e bicaudal foi utilizado para avaliar se houve diferença significativa entre as médias da porcentagem de propionato de clobetasol liberada das formulações de nanocápsulas (NC A2EH e NC A2EH + AB) e da solução do fármaco livre (FL) comparadas entre si durante todos os tempos de liberação. Os critérios de avaliação adotados foram: intervalo de confiança de 95% e diferenças consideradas significativas quando $p < 0,05$.

As formulações que não apresentaram entre si diferença significativa das suas médias foram também avaliadas quanto à possível diferença estatística analisada em cada porcentagem de propionato de clobetasol isolada, obtida anteriormente às médias, tempo a tempo, adotando-se os mesmos critérios de avaliação.

5. Resultados e Discussão

5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 – EMULSIFICAÇÃO POR INVERSÃO DE FASES

A proporção e seleção do óleo vegetal e tensoativos em cada nanoemulsão foram previamente determinadas por Aguiar, 2010, através de um diagrama de fases que apontou o óleo de soja associado ao Croduret 50[®] e Span 80 na proporção de 5,0% como constituintes adequados para a obtenção de nanoemulsões estáveis.

Foram desenvolvidas duas nanoemulsões distintas, de acordo com as composições descritas nas **Tabelas 2 e 3**, através do método de inversão de fases. Este processo é fundamentado na capacidade peculiar dos tensoativos não-iônicos, especialmente os polietoxilados (como o Croduret 50[®]), em modificar sua afinidade pela água e pelo óleo em função da temperatura, favorecendo a inversão de fases.

Delineando o processo, a inversão transicional da emulsão ocorre quando em composição fixa, a afinidade relativa do surfactante entre as diferentes fases é alterada, ou seja, com o aumento da temperatura as ligações de hidrogênio formadas entre a porção hidrofílica (representada por óxidos de etileno) do tensoativo e a água são quebradas, reduzindo sua afinidade pela fase aquosa. Conseqüentemente, as interações hidrofóbicas presentes nas moléculas do surfactante, regidas pelas forças de Van der Waals, predominam no sistema, aumentando a afinidade deste tensoativo (presente em maior quantidade) pela fase oleosa, favorecendo neste momento a formação de emulsões A/O. Na temperatura em que ocorre a inversão de fases (TIF), o tamanho das gotículas e a tensão interfacial alcançam valores mínimos; porém, esses glóbulos pequenos são bastante instáveis e coalescem rapidamente. Por outro lado, foi relatado que após o rápido resfriamento de emulsões preparadas próximas da TIF, são formadas gotículas muito estáveis e pequenas, caracterizando-as nanoemulsões O/A. Durante esse processo, a estrutura do tensoativo sofre reorganização tendendo a retornar para sua forma original, reestabelecendo as ligações intermoleculares responsáveis pelo aumento de sua afinidade por ambas as fases (SHINODA e ARAI, 1964; IZQUIERDO *et al.*, 2002; FERNANDEZ *et al.*, 2004; TADROS *et al.*, 2004; LIU *et al.*, 2006; ANTON *et al.*, 2007, 2008; KOROLEVA e YURTOV, 2012).

5.2 - CONDUTIVIDADE

A condutividade das nanoemulsões foi analisada para se obter a temperatura em que ocorre a inversão de fases, expressa nos gráficos das **Figuras 5 e 6**.

Figura 5: Gráfico da temperatura de inversão de fases obtido para a nanoemulsão NE A2EH (n = 3)

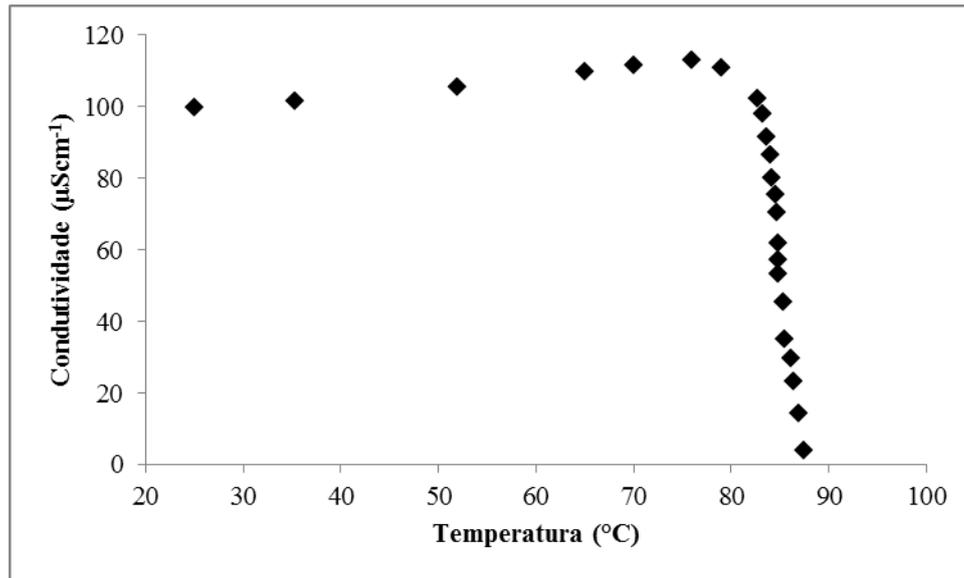
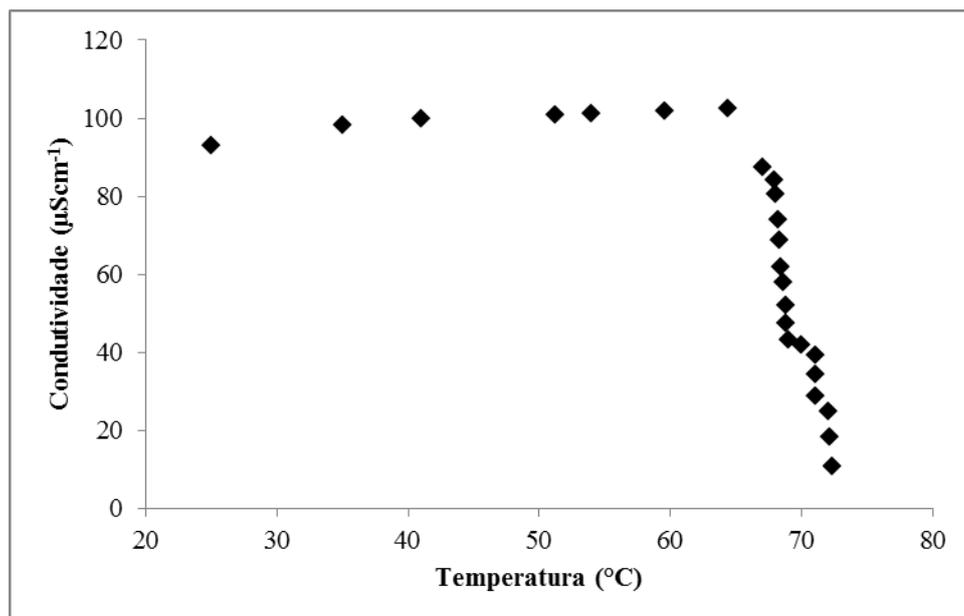


Figura 6: Gráfico da temperatura de inversão de fases obtido para a nanoemulsão NE A2EH + AB (n = 3)



A análise dos dados mostrou gráficos característicos de inversão de fases: um leve aumento da condutividade na medida em que a temperatura é elevada, seguido de súbito decréscimo quando ocorre a inversão.

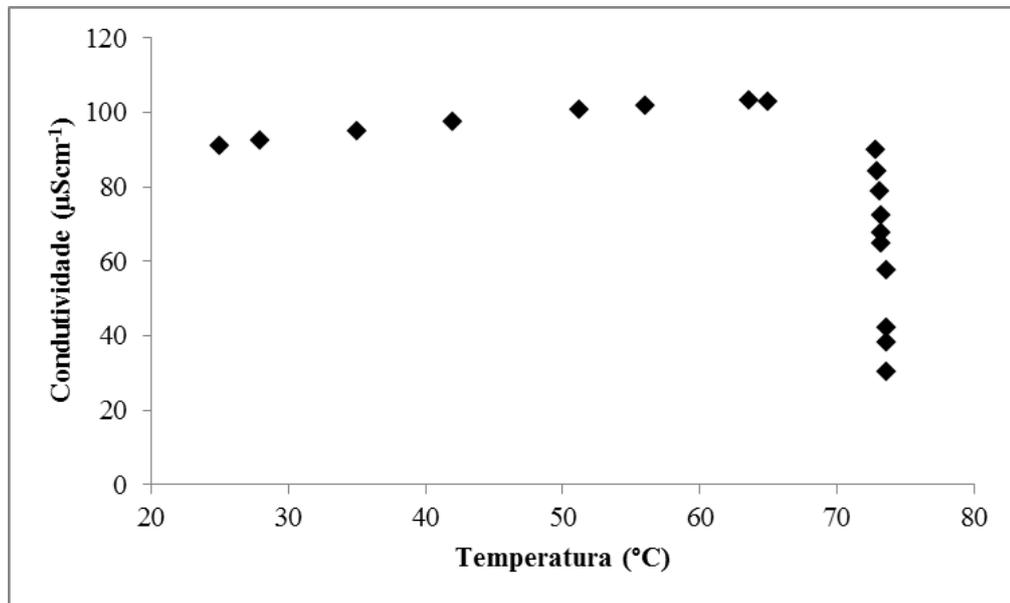
O leve aumento inicial da condutividade deve-se à maior mobilidade dos íons presentes na fase contínua causada pelo aquecimento, além do aumento na taxa de dissociação de sais presentes no meio. Já o decréscimo repentino da condutividade remete o processo de inversão de fases, no qual o conteúdo oleoso torna-se a fase contínua, diminuindo, portanto a condução elétrica do sistema (TADROS *et al.*, 2004; SPERNATH e MAGDASSI, 2007).

A temperatura de inversão de fases foi igual a 81,8°C para NE A2EH e 68,4°C para NE A2EH + AB. Esta diferença considerável pode ser explicada pela influência da natureza monomérica de cada formulação. O acrilato de 2-etilhexila possui uma cadeia carbônica maior que a do acrilato de butila, apresentando, portanto, uma característica lipofílica mais acentuada. Isso leva a um aumento das suas interações intermoleculares na interface, requerendo maior energia, expressa pelo aumento da temperatura, para que essas interações se quebrem e a inversão ocorra.

Para confirmar essa justificativa baseada na solubilidade de cada monômero, preparou-se uma terceira nanoemulsão (NE AB) pelo mesmo método, contendo 5% do monômero acrilato de butila e o restante de sua constituição idêntico às demais. Procedeu-se, então, o teste de condutividade para avaliar sua temperatura de inversão de fases (**Figura 7**).

Mediante os cálculos, verificou-se que a temperatura de inversão de fases para a nanoemulsão NE AB foi igual a 69,3°C. Esse valor é próximo ao obtido para a NE A2EH + AB, confirmando a influência do monômero de menor caráter lipofílico (acrilato de butila) no processo de inversão de fases, ou seja, devido à sua cadeia carbônica menor, há um número inferior de interações hidrofóbicas predominantes na interface, que requerem menos energia para serem rompidas, resultando em uma temperatura mais baixa para que ocorra a inversão de fases.

Figura 7: Gráfico da temperatura de inversão de fases obtido para a nanoemulsão NE AB (n = 3)



5.3 – ESTABILIDADE DAS NANOEMULSÕES

Ambas as formulações apresentaram estabilidade macroscópica, evidenciada pela ausência dos sinais de alteração (cremeação, floculação, precipitação ou separação de fases) e pelas características organolépticas do sistema - cor branca, com reflexo azulado; odor monomérico e alta fluidez, devido ao elevado teor aquoso. Essas características, que se mantiveram inalteradas por 3 meses, comprovam a estabilidade intrínseca das formulações (ROLAND *et al.*, 2003).

5.3.1 – Avaliação microscópica

A análise microscópica não apresentou anisotropia, ou seja, o sistema não continha estruturas birrefringentes detectadas pela luz polarizada, como cristais líquidos. A ausência destas estruturas pode ser explicada pelo fato de que, segundo Santos (2006), os cristais líquidos são preferencialmente formados a partir de constituintes específicos, como tensoativos hidrofílicos e os anfifílicos graxos (extremamente lipofílicos), ambos considerados incapazes de estabilizar emulsões O/A. Portanto, como os tensoativos e o óleo usados neste trabalho não possuem propriedades físico-químicas propensas a formar cristais líquidos, há a confirmação da

homogeneidade do sistema, evidenciada pela ausência de partículas durante a análise ao microscópio.

5.3.2 – Avaliação da influência da temperatura e estresse gravitacional

O aquecimento das amostras possibilita um incremento na energia cinética do sistema, culminando no aumento do movimento *Browniano* dos glóbulos. Deste modo, dois glóbulos podem se chocar, favorecendo a ocorrência de fenômenos de instabilidade, como floculação e coalescência (MORAIS *et al.*, 2006). Diante disso, a fim de se conhecer a faixa térmica em que as formulações desenvolvidas neste trabalho são estáveis, procedeu-se o teste de estresse térmico abrangendo o intervalo de temperatura de 40 a 80°C e foi constatado que ambas as amostras mantiveram-se macroscopicamente estáveis durante todo o processo de aquecimento.

O teste de centrifugação tem por objetivo aumentar a força gravitacional sobre os glóbulos, ocasionando maior número de colisões entre eles, o que pode levar a fenômenos de instabilidade, como cremação e sedimentação (GOTO, 2011). Porém, Tadros *et al.*, 2004, afirmam que o movimento *Browniano* característico das nanoemulsões é superior à força gravitacional, garantindo a estabilidade do sistema. Roland *et al.*, 2003 confirmaram essa proposição ao submeterem nanoemulsões O/A à força gravitacional de 1529 G por 10 minutos e, ao final, detectarem a ausência de qualquer sinal de instabilidade. Este comportamento foi também verificado para as nanoemulsões NE A2EH e NE A2EH + AB, assegurando a estabilidade física das formulações obtidas neste trabalho.

A fim de confirmar a integridade das nanoemulsões após ambos os testes de centrifugação e estresse térmico, as formulações foram avaliadas quanto ao tamanho dos glóbulos (**Tabelas 5 e 6**).

Tabela 5: Tamanho (em nm) dos glóbulos da nanoemulsão NE A2EH posterior aos testes de centrifugação e estresse térmico executados 1, 7, 15 e 30 dias após seu preparo

	Centrifugação	Estresse térmico
Inicial	144,9 ± 0,28	144,9 ± 0,28
1 dia	133,0 ± 9,48	152,7 ± 2,29
7 dias	165,9 ± 3,85	150,1 ± 5,13
15 dias	145,4 ± 3,24	139,9 ± 2,56
30 dias	171,4 ± 6,50	144,3 ± 2,24

Dados representam média ± desvio padrão; n = 3

Tabela 6: Tamanho (em nm) dos glóbulos da nanoemulsão NE A2EH + AB posterior aos testes de centrifugação e estresse térmico executados 1, 7, 15 e 30 dias após seu preparo

	Centrifugação	Estresse térmico
Inicial	146,4 ± 1,27	146,4 ± 1,27
1 dia	144,2 ± 3,97	149,7 ± 2,43
7 dias	146,1 ± 4,23	141,6 ± 1,02
15 dias	146,8 ± 1,40	149,6 ± 0,73
30 dias	158,7 ± 1,15	142,8 ± 0,55

Dados representam média ± desvio padrão; n = 3

Os resultados obtidos para ambas as nanoemulsões permitem inferir que mesmo depois de terem sido submetidas a condições de estresse, as formulações não alteraram de maneira significativa seu tamanho comparado ao inicial. Esta conclusão foi possível após análise estatística dos dados através do teste ANOVA, uma vez que

$p > 0,05$. Desta forma, pode-se afirmar que o sistema é estável e adequado como meio reacional para a reação de polimerização, já que é capaz de manter suas características nanométricas ainda que mantido em temperatura acima da ambiente (40°C).

5.4 - POLIMERIZAÇÃO *IN SITU*

A reação de polimerização interfacial dos glóbulos da nanoemulsão deve ocorrer à temperatura menor que a temperatura de inversão de fases para manter o tamanho médio das nanopartículas. Por este motivo, o procedimento foi realizado à temperatura de 40°C, uma vez que as nanoemulsões são estáveis quando mantidas nesta temperatura, mesmo durante o longo período de tempo reacional (4 horas).

Para dar início à polimerização, uma solução ativadora de FeSO₄ foi adicionada ao sistema com a finalidade de fornecer íons de metal de transição Fe⁺², que por sua vez, desempenham uma das principais funções para que desencadeie o processo: atuam como ativadores dos ânions persulfato (S₂O₈⁻²), após sofrerem reação de oxidação. Estes ânions são fornecidos pela solução iniciadora de KPS, e após a ativação, formam o sulfato (SO₄⁻), um radical livre potencialmente oxidante (SPERNATH e MAGDASSI, 2007). A síntese do polímero ocorre à medida que os monômeros presentes na fase dispersa no interior dos glóbulos da nanoemulsão alcançam a interface e entram em contato com as espécies reativas presentes na fase dispersante, formando as nanocápsulas.

Foram obtidas, então, duas nanocápsulas distintas: uma a partir da nanoemulsão contendo o monômero acrilato de 2-etilhexila, que deu origem ao polímero poli(acrilato de 2-etilhexila) (NC A2EH) e outra partindo da nanoemulsão contendo uma mistura do mesmo monômero com o acrilato de butila, originando o copolímero poli(acrilato de 2-etilhexila-acrilato de butila) (NC A2EH + AB).

5.5 - CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

5.5.1 – Determinação do valor de pH das formulações

O pH é um importante parâmetro de acompanhamento da estabilidade das formulações tópicas. Fronza *et al.*, 2004, afirmam que as nanoemulsões são estáveis física e quimicamente diante da faixa de pH de 6,5 a 8,0; quando ocorre decréscimo

para valores fora deste intervalo, há um indicativo de instabilidade do sistema, relacionado à taxa de hidrólise dos triglicerídeos e fosfolipídeos que, ao dissociarem, liberam ácidos graxos.

O pH das formulações NE A2EH, NE A2EH + AB, NC A2EH e NC A2EH + AB foi avaliado à temperatura ambiente (25°C) após 1, 7 e 30 dias da manipulação das amostras (**Tabela 7**).

Tabela 7: Valores de pH obtidos para as formulações

Formulação	1 dia	7 dias	30 dias
NE A2EH	7,08 ± 0,03	7,03 ± 0,08	7,16 ± 0,07
NE A2EH + AB	7,02 ± 0,11	6,99 ± 0,10	7,09 ± 0,14
NC A2EH	6,86 ± 0,05	6,92 ± 0,07	7,01 ± 0,03
NC A2EH + AB	6,90 ± 0,12	6,93 ± 0,09	6,98 ± 0,11

Dados representam média ± desvio padrão; n = 3

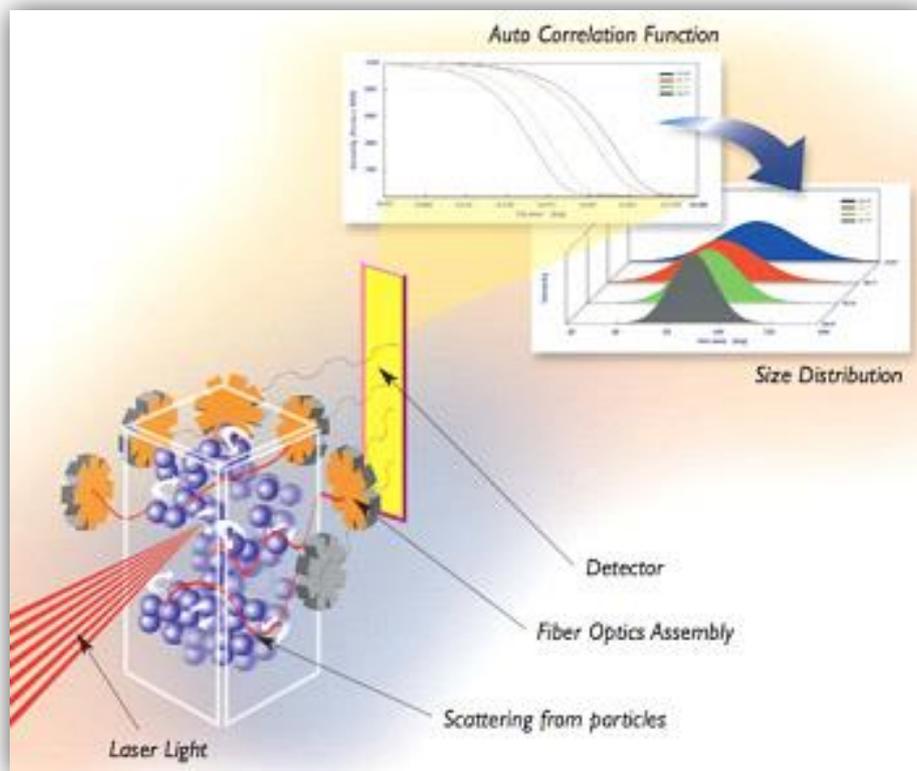
Os resultados obtidos estão de acordo com os encontrados na literatura. Santos-Magalhães *et al.*, 2000, analisaram o valor de pH de nanoemulsões e nanocápsulas de penicilina e obtiveram valores próximos da neutralidade para ambas as formulações, após teste de estabilidade acelerada à temperatura ambiente. Fontana *et al.*, 2011, desenvolveram duas formulações de hidrogéis; uma contendo nanocápsulas de propionato de clobetasol e outra, nanoemulsões do mesmo fármaco. Após a caracterização físico-química das amostras, o valor de pH encontrado foi próximo de 6,0.

5.5.2 – Análise granulométrica

A técnica de espectroscopia de correlação de fótons (ECF) consiste na determinação do diâmetro médio de partículas e glóbulos através do espalhamento de luz, causado pelas partículas presentes na amostra incidida por um feixe de laser (**Figura 8**). Devido ao movimento *Browniano*, a intensidade da luz espalhada por um conjunto de partículas sofre flutuações ao longo do tempo e ocorre com maior

velocidade quando a dispersão contém partículas pequenas, pois estas se movimentam mais rapidamente (CARDOSO, 2001). A intensidade e o ângulo da luz espalhada são medidos por detectores, que convertem esses sinais em distribuição de tamanho através de algoritmos matemáticos (PAPINI, 2003).

Figura 8: Representação esquemática da medida de tamanho médio de partículas pela técnica de espectroscopia de correlação de fótons (Fonte: <http://alienspacesciencenews.wordpress.com>)



Ambas as formulações de nanoemulsões e nanocápsulas de propionato de clobetasol foram submetidas às análises de tamanho médio dos respectivos glóbulos e partículas e do índice de polidispersão (IP) (Tabelas 8 e 9).

Tabela 8: Valores do tamanho (nm) e do IP das nanoemulsões (NE A2EH) e nanocápsulas (NC A2EH) de propionato de clobetasol

Replicata	Tamanho (nm)		IP	
	NE A2EH	NC A2EH	NE A2EH	NC A2EH
A	135,9	133,1	0,104	0,129
B	139,9	136,4	0,230	0,166
C	144,7	140,5	0,389	0,378
Média	140,2 ± 3,60	136,7 ± 3,03	0,241 ± 0,117	0,224 ± 0,110

Legenda: IP – Índice de Polidispersão
 Dados representam média ± desvio padrão; n = 3

Tabela 9: Valores do tamanho (nm) e do IP das nanoemulsões (NE A2EH + AB) e nanocápsulas (NC A2EH + AB) de propionato de clobetasol

Replicata	Tamanho (nm)		IP	
	NE A2EH + AB	NC A2EH + AB	NE A2EH + AB	NC A2EH + AB
A	135,0	130,7	0,199	0,133
B	136,0	135,3	0,109	0,218
C	144,1	138,3	0,041	0,179
Média	138,4 ± 4,07	134,8 ± 3,13	0,116 ± 0,065	0,177 ± 0,035

Legenda: IP – Índice de Polidispersão
 Dados representam média ± desvio padrão; n = 3

Ao analisar a média e o desvio padrão de cada formulação, conclui-se que as nanoemulsões de composições distintas apresentaram valores de tamanho dos glóbulos semelhantes aos das partículas das correspondentes nanocápsulas. É provável que o polímero formado seja constituído por uma camada pouco extensa em comparação com a interface, o que resulta em tamanho médio de partículas similar ao das nanoemulsões.

Através do IP é possível estimar o quanto os glóbulos ou partículas se desviam do valor médio de tamanho (TADROS *et al.*, 2004). Valores de IP próximos a 1,0 mostram que o sistema é polidisperso, ou seja, sua granulometria sofre muitas variações (JAFARI *et al.*, 2008). Por outro lado, valores de IP inferiores a 0,3 indicam que o

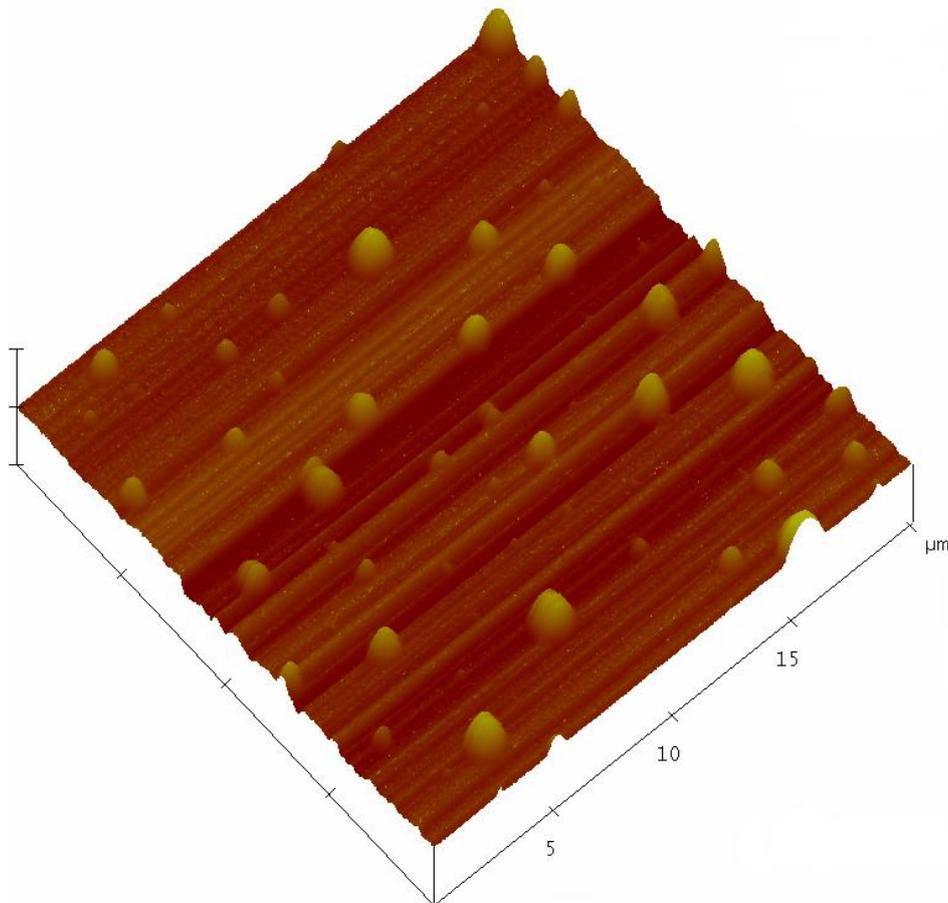
sistema é monodisperso, refletindo sua homogeneidade, como foi o caso das diferentes formulações obtidas neste trabalho.

5.5.3 – Análise por Microscopia de Força Atômica (MFA)

A MFA é uma técnica que permite obter imagens reais, em três dimensões, da topografia das superfícies, com uma resolução espacial que se aproxima das dimensões atômicas, possibilitando a observação direta da arquitetura da superfície. Uma grande vantagem da MFA é que não há necessidade de manipulação da amostra para análise, ou seja, ela é observada em seu ambiente natural (PEREIRA *et al.*, 2008).

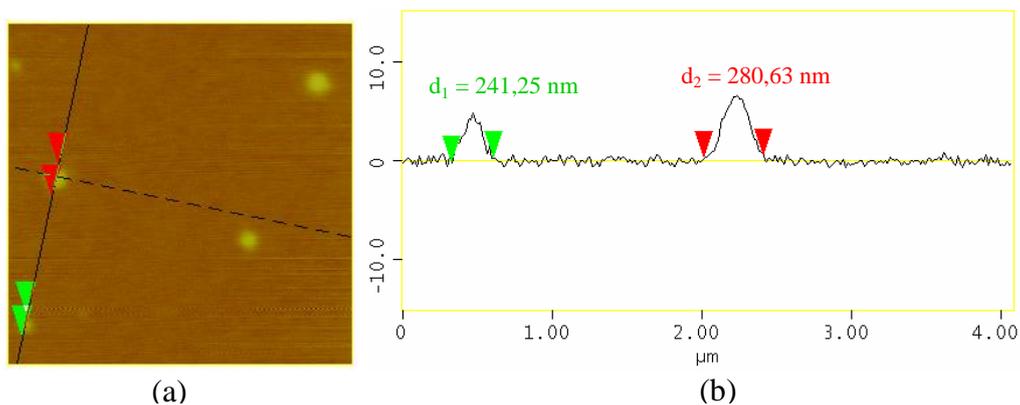
Através da imagem tridimensional obtida por MFA verificou-se que a topografia e morfologia das nanocápsulas exibiram formato esférico (**Figura 9**).

Figura 9: Imagem tridimensional obtida por MFA das nanocápsulas de propionato de clobetasol



A técnica de MFA também permite calcular o tamanho das partículas (**Figuras 10 e 11**) através de gráficos relacionando o diâmetro ou altura da partícula com sua granulometria. De acordo com esta análise, as nanocápsulas apresentaram valores de diâmetro aproximadamente entre 240 e 280 nm (**Figura 10 (b)**), que são ligeiramente superiores aos obtidos pela técnica de ECF. Esta diferença pode ser explicada pelo processo de preparação das amostras para análise por MFA, em que as partículas sofrem uma deformação devido à secagem com fluxo de argônio e passagem da sonda, o que causa um achatamento do seu tamanho, uma vez que a amostra é constituída por uma vesícula com envoltório polimérico e núcleo fluido, resultando num diâmetro maior que o real (PEREIRA *et al.*, 2008).

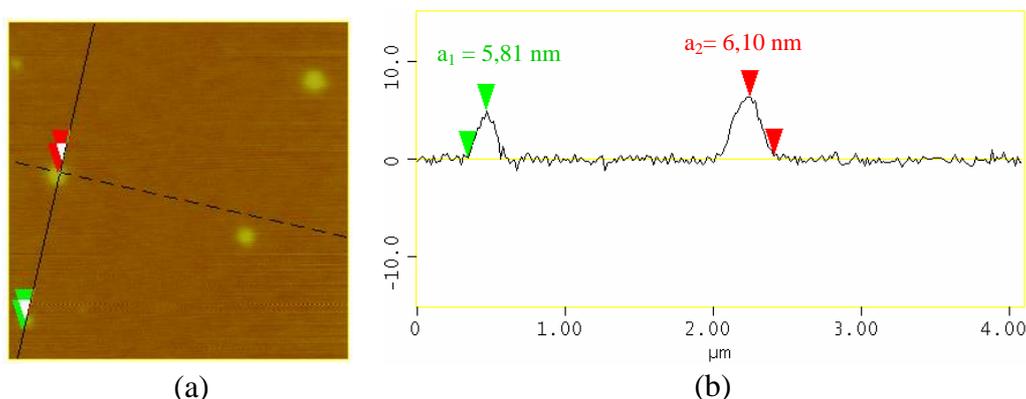
Figura 10: (a) Fotomicrografia bidimensional obtida por MFA da formulação e (b) perfil do diâmetro de algumas nanocápsulas



Devido à morfologia esférica, as nanocápsulas deveriam apresentar o diâmetro igual à altura, porém, como as partículas submetidas à análise por MFA sofrem deformação durante o procedimento, o diâmetro é aumentado e por consequência, a altura é reduzida (**Figura 11 (b)**).

Ambos os valores de diâmetro e altura foram semelhantes entre diferentes nanocápsulas, indicando a homogeneidade do sistema.

Figura 11: (a) Fotomicrografia bidimensional obtida por MFA da formulação e (b) perfil da altura de algumas nanocápsulas



5.5.4 – Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier

(FT-IR)

A análise por infravermelho foi realizada como um teste confirmatório de que os polímeros foram realmente formados nas respectivas nanocápsulas. O espectro padrão do poli(acrilato de 2-etilhexila) (**Figura 12**) foi usado para comparação com os obtidos neste trabalho, apresentados nas **Figuras 13 e 14**.

Figura 12: Espectro padrão do poli(acrilato de 2-etilhexila) (Fonte: <http://www.sigmaaldrich.com/spectra/ftir/FTIR002065.PDF>)

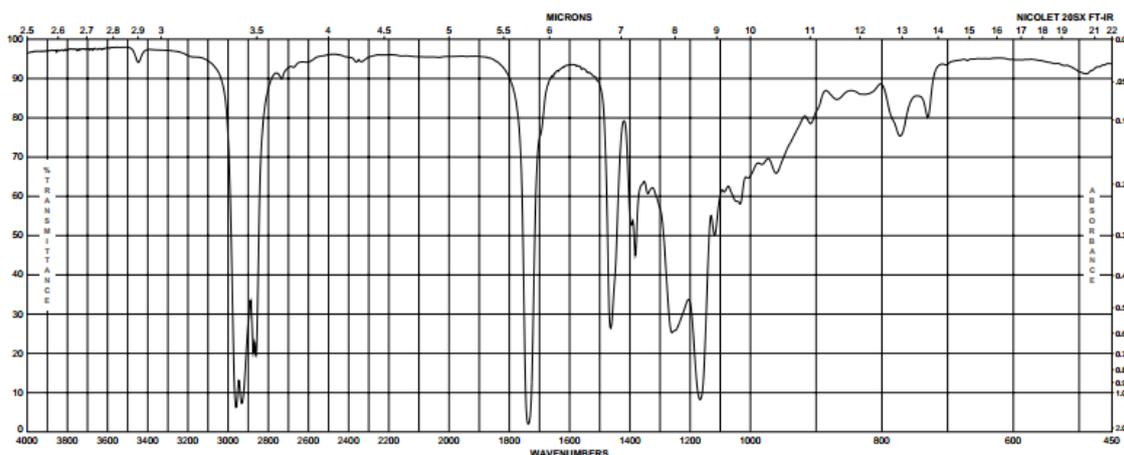


Figura 13: Espectro de infravermelho obtido para o polímero poli(acrilato de 2-etilhexila)

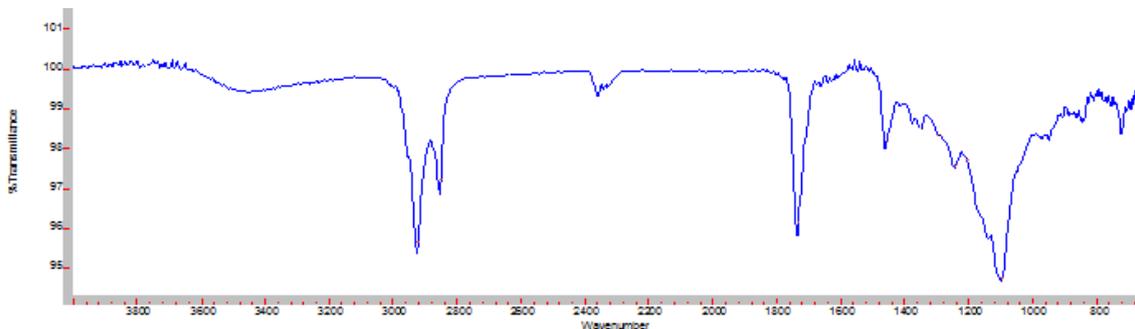
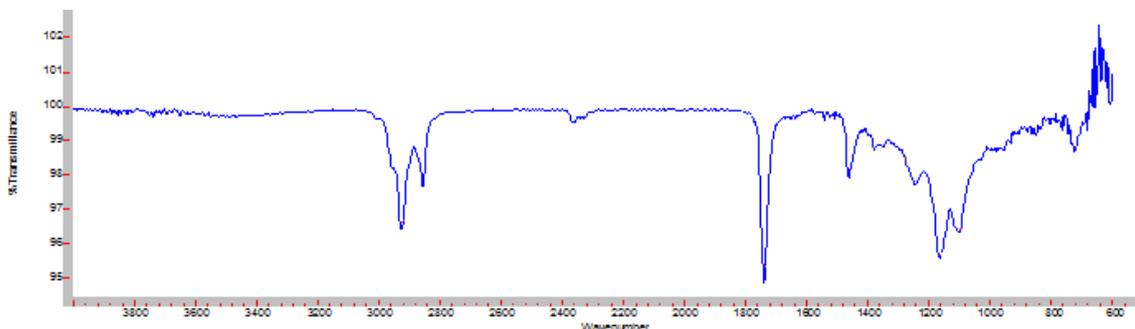


Figura 14: Espectro de infravermelho obtido para o co-polímero poli(acrilato de 2-etilhexila-acrilato de butila)



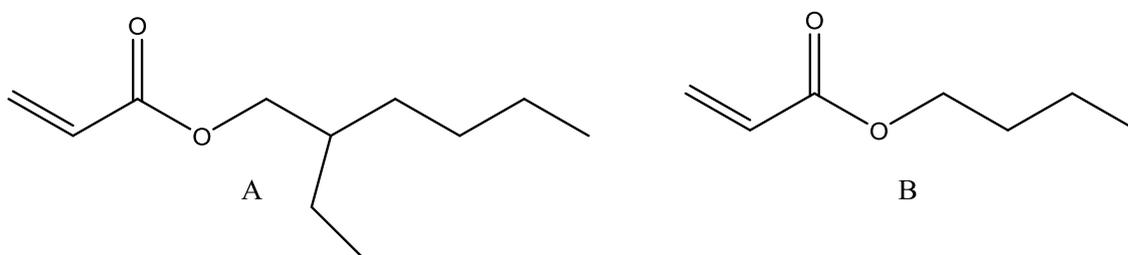
As principais bandas de absorção do polímero padrão, responsáveis pela caracterização de sua estrutura, estão também presentes nas amostras, que indicam sua formação nas nanocápsulas. Tais bandas registradas no espectro são identificadas conforme a classificação:

- 2948-2880 cm^{-1} – vibração das ligações alifáticas C-H (-CH₂ e -CH₃);
- 1732 cm^{-1} – característico do grupo éster;
- 1454-1400 cm^{-1} – vibração das ligações C-CH₃ assimétricas e simétricas, respectivamente;
- 1246-1170 cm^{-1} – vibração das ligações C-O-C assimétricas e simétricas, respectivamente;
- 766 cm^{-1} – característico da ligação -CH externa ao plano.

Nota-se que há diferença na resolução do espectro de referência (**Figura 12**) quando comparado aos das formulações (**Figuras 13 e 14**). Isso pode estar relacionado ao fato de que estes foram obtidos a partir da metodologia que envolve o dispositivo ATR, ao passo que aquele foi gerado a partir da produção de pastilhas de brometo de potássio. Apesar disso, conclui-se, também, que não há prejuízo para a análise comparativa entre os espectros, uma vez que as bandas de absorção características do polímero estão evidentes em ambos.

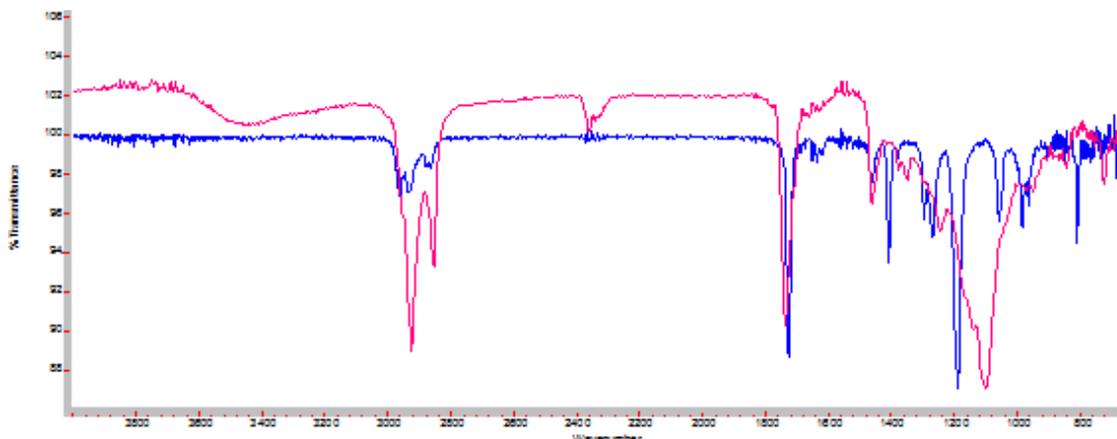
A espectroscopia no infravermelho foi usada, também, para comparação do espectro dos polímeros com o dos respectivos monômeros. Sendo assim, ao analisar as estruturas dos monômeros acrilato de 2-etilhexila e acrilato de butila (**Figura 15**), é possível verificar que elas diferem entre si apenas pelo comprimento da cadeia carbônica, mantendo-se idêntico o grupo acrilato. Paralelamente, durante a formação das nanocápsulas, o mecanismo da reação de polimerização sugere que os polímeros sejam formados a partir do ataque do radical sulfato (SO_4^-) à dupla ligação do grupo acrilato, desencadeando a reação em cascata.

Figura 15: Estrutura dos monômeros acrilato de 2-etilhexila (A) e acrilato de butila (B)



Desta maneira, esperava-se que as bandas de absorção referentes à frequência de deformação angular ($=\text{C}-\text{H}$) do carbono insaturado monossustituído presentes no espectro dos monômeros, em $905 - 920 \text{ cm}^{-1}$ e $985 - 1000 \text{ cm}^{-1}$, estivesse ausente no dos polímeros, como de fato ocorreu conforme mostrado nos espectros sobrepostos da **Figura 16**.

Figura 16: Espectros de infravermelho do monômero acrilato de 2-etilhexila (azul) e do polímero poli(acrilato de 2-etilhexila) (vermelho)



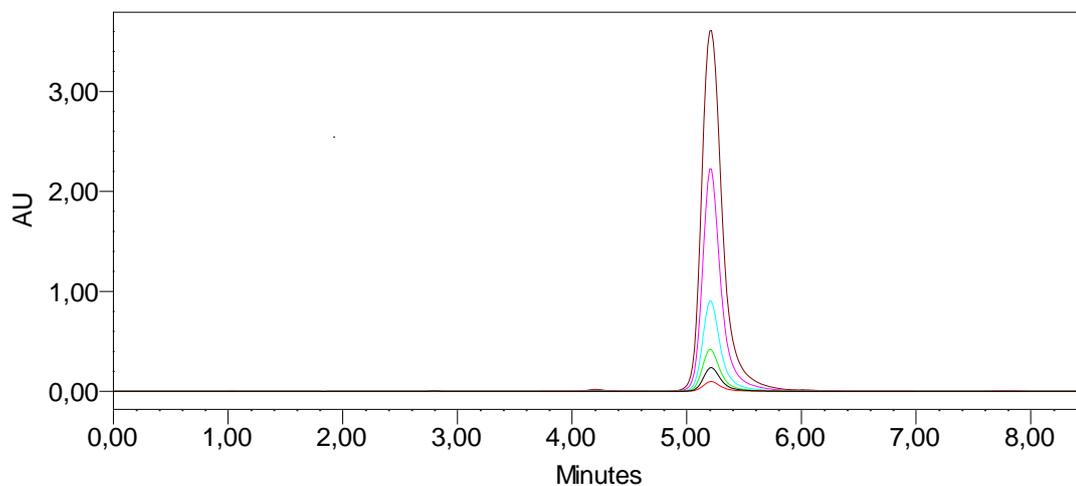
É importante ressaltar que os espectros são referentes apenas ao conteúdo polimérico das nanocápsulas, uma vez que os polímeros foram extraídos das mesmas antes de serem submetidos à espectroscopia por infravermelho. Logo, não há interferência do conteúdo oleoso, tensoativos, água, monômeros residuais, ou mesmo do propionato de clobetasol nestas análises.

5.6 - QUANTIFICAÇÃO DO PROPIONATO DE CLOBETASOL A PARTIR DAS NANOCÁPSULAS

5.6.1 - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Com o objetivo de se avaliar a concentração de propionato de clobetasol nos estudos de solubilidade, eficiência de encapsulação e liberação *in vitro*, utilizou-se a metodologia analítica validada por CLAE para quantificá-lo. A fase móvel empregada eluiu o fármaco rapidamente, através do tempo de retenção de 5,21 minutos e de picos finos e bem definidos. Estas características foram identificadas após preparação de soluções do padrão referentes às concentrações de 500,0; 250,0; 100,0; 50,0; 25,0 e 10,0 µg/mL de propionato de clobetasol (**Figura 17**).

Figura 17: Tempo de retenção do propionato de clobetasol após injeções do padrão de nas concentrações de 500,0; 250,0; 100,0; 50,0; 25,0 e 10,0 µg/mL



5.6.2 - Teste de solubilidade do propionato de clobetasol

O teste de solubilidade do propionato de clobetasol foi realizado com o intuito de selecionar um meio receptor adequado para solubilizar o fármaco, na ausência de solvente orgânico em sua composição. Esta restrição foi cuidadosamente seguida, pois caso contrário, durante o teste de liberação por diálise reversa, haveria a possibilidade do solvente orgânico presente no meio receptor entrar em contato com a amostra, solubilizando o polímero e forçando o rompimento das nanocápsulas. Isso induziria a uma liberação forçada do fármaco, alterando os resultados e gerando um perfil irreal de liberação e sem confiabilidade. Por este motivo, foram testados meios constituídos por diferentes tampões e tensoativos, em proporções variadas. Porém, caso esses meios não apresentassem condições satisfatórias de solubilidade do propionato de clobetasol, foi também testado um constituído por tampão acetato de sódio pH 5,5 : Etanol (1:1), como uma segunda opção, devido à solubilidade do fármaco comprovada neste solvente.

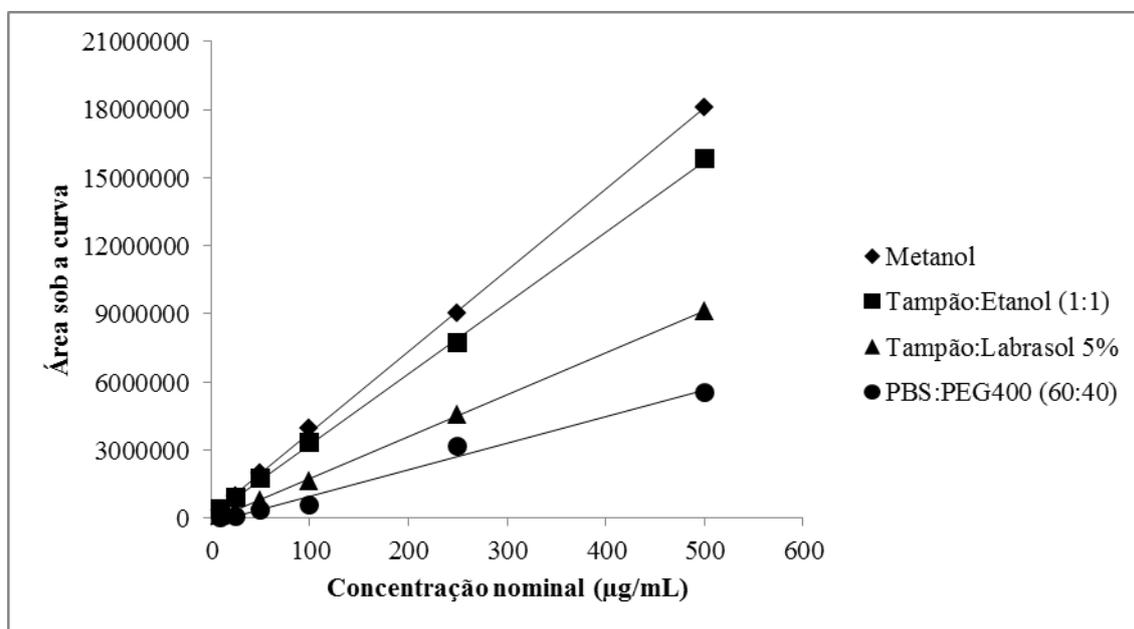
A concentração de propionato de clobetasol presente em cada meio foi obtida a partir de pesagem de um excesso do fármaco igual a 150,0 mg dissolvido em 30,0 mL do meio em teste, resultando numa solução supersaturada de concentração igual a 5,0 mg/mL. A evidência da obtenção de uma solução supersaturada foi dada pela observação de precipitado (ou corpo de fundo) mesmo após 48 horas do preparo, sob agitação e temperatura controladas; sua preparação é imprescindível para garantir a

máxima solubilização do princípio ativo pelo meio testado. Munghu e Singh, 2009, também destacaram a importância de se obter uma solução supersaturada ao prepararem uma solução de risperidona na concentração de 3,0 mg/mL para o teste de solubilidade.

De acordo com a literatura, ao se realizar um teste de liberação ou dissolução de um princípio ativo qualquer, é essencial que as condições SINK sejam satisfeitas. Isso significa que a concentração de fármaco naquele meio de liberação não deve ser superior a 20% da sua concentração de saturação, identificada pela determinação da sua solubilidade (MANADAS *et al.*, 2002). Desta maneira, há a garantia de que a liberação do fármaco a partir da formulação não será impedida por um meio receptor saturado.

A quantificação da concentração final de propionato de clobetasol em cada meio testado foi realizada por CLAE a partir da preparação de uma curva analítica para cada amostra, diluída com o mesmo meio em teste. Para comparação dos resultados, foi também preparada uma curva analítica do fármaco diluída em metanol, pois este solvente solubiliza 100% do fármaco (**Figura 18**).

Figura 18: Curvas analíticas do propionato de clobetasol em cada meio receptor testado



As concentrações da solubilidade obtidas para os meios tampão acetato de sódio pH 5,5 : Etanol (1:1), tampão acetato de sódio pH 5,5 : Labrasol a 5% e PBS : PEG 400 (60:40) foram iguais a: 346,95; 373,95 e 70,35 µg/mL, respectivamente.

Ao analisar os resultados, concluiu-se que os dois primeiros meios apresentaram os maiores valores de solubilidade do propionato de clobetasol. Por este motivo, é preferível que um deles seja selecionado para o teste de liberação, uma vez que devido à maior concentração de saturação, é permitida a adição de uma maior quantidade de amostra no meio de liberação, o que obedece às condições SINK e facilita a detecção do fármaco durante sua quantificação após o teste.

A curva referente ao meio constituído por tampão acetato de sódio pH 5,5 : Etanol (1:1) é a que mais se aproxima da curva de solubilização do fármaco em metanol, porém, devido à presença do solvente etanol em sua composição, este meio foi descartado. Portanto, o meio constituído por tampão acetato de sódio pH 5,5 : Labrasol a 5% foi selecionado para o teste de liberação, por apresentar valores satisfatórios de solubilidade e garantir as condições SINK.

De acordo com a **Tabela 10**, os coeficientes de correlação (r) obtidos estão de acordo com o preconizado pela legislação vigente ($r > 0,99$) para as curvas analíticas construídas para cada meio receptor e para solubilização do fármaco em metanol, o que demonstra a linearidade do método na faixa de trabalho de 10,0 a 500,0 $\mu\text{g/mL}$.

Tabela 10: Parâmetros das curvas analíticas obtidas para os meios testados para quantificação do propionato de clobetasol por CLAE

Meio	Equação da reta	Coefficiente de correlação linear (r)
Metanol	$y = 35899x + 139662$	0,9998
Tampão : Etanol (1:1)	$y = 31212x + 126459$	0,9998
PBS : PEG 400 (60:40)	$y = 11777x - 212730$	0,9921
Tampão : Labrasol 5%	$y = 18453x - 90565$	0,9998

5.6.3 – Determinação da eficiência de encapsulação

Segundo Anton *et al.*, 2008, uma das vantagens de desenvolver nanocápsulas como sistemas de liberação de fármacos é a alta eficiência de encapsulação associada a estes nanocarreadores, relacionada principalmente à alta solubilização de fármacos lipofílicos no núcleo oleoso.

Como descrito por Vauthier e Bouchemal, 2009, as nanocápsulas são constituídas por um invólucro polimérico que envolve seu núcleo oleoso; portanto, o fármaco pode estar adsorvido na parede polimérica ou solubilizado no núcleo. Por este motivo, o teste de eficiência de encapsulação foi realizado com a finalidade de determinar a real concentração de fármaco presente no interior das nanocápsulas, através da quantificação do clobetasol total, após rompimento da formulação, e do fármaco livre, ou seja, não associado às nanoestruturas (**Tabela 11**).

Tabela 11: Porcentagem da eficiência de encapsulação (EE) do propionato de clobetasol em ambas as nanocápsulas

Formulação	Fármaco total (mg/mL)	Fármaco livre (mg/mL)	% Eficiência encapsulação
NC A2EH	0,339 ± 0,01	0,000372 ± 5,98E-5	99,89 ± 0,02
NC A2EH +AB	0,337 ± 0,01	0,000186 ± 2,40E-5	99,94 ± 0,01

Dados representam média ± desvio padrão; n = 3

Os dados sugerem alta eficiência de encapsulação para o propionato de clobetasol em ambas as nanocápsulas (próxima de 100%), o que permite reafirmar que a fase oleosa empregada foi adequada para solubilização do fármaco lipofílico (Log P = 4,11) no núcleo das nanocápsulas. A baixa concentração de propionato de clobetasol livre em ambas as formulações (0,372 e 0,186 µg/mL para NC A2EH e NC A2EH + AB, respectivamente) é coerente com a alta eficiência de encapsulação, uma vez que confirma a pouca quantidade de fármaco não associada às nanocápsulas.

Os resultados obtidos estão em conformidade com os encontrados na literatura; Silva *et al.*, 2012, prepararam nanopartículas lipídicas sólidas de propionato de clobetasol e encontraram eficiência de encapsulação igual a 98,6%. Fontana *et al.*, 2009,

desenvolveram nanoemulsões, nanocápsulas e nanoesferas (as duas últimas contendo o polímero poli- ϵ -caprolactona) de propionato de clobetasol e a eficiência de encapsulação para cada formulação foi superior a 99%.

5.6.4 – Determinação da eficiência do processo

Após verificar a real quantidade de propionato de clobetasol encapsulada nas nanocápsulas, procedeu-se à análise da eficiência do processo (EP), a fim de constatar a quantidade de fármaco perdida durante o procedimento de obtenção das nanocápsulas de propionato de clobetasol (**Tabela 12**).

Tabela 12: Porcentagem da eficiência de processo (EP) do propionato de clobetasol em ambas as nanocápsulas

Formulação	Fármaco total início (mg/mL)	Fármaco total final (mg/mL)	% Eficiência do processo
NC A2EH	0,504 \pm 0,01	0,339 \pm 0,01	67,33 \pm 2,57
NC A2EH +AB	0,498 \pm 0,01	0,337 \pm 0,01	67,52 \pm 2,60

Dados representam média \pm desvio padrão; n = 3

De acordo com os dados obtidos, concluiu-se que houve uma perda de, aproximadamente, 32% de propionato de clobetasol durante o processo, partindo da pesagem do fármaco até a etapa final de encapsulação no nanocarreador. Isso pode estar relacionado ao método de preparo das nanocápsulas, que é executado em duas etapas: na primeira, são preparados 30,0 mL de nanoemulsão, ao passo que na segunda, apenas 20,0 mL da nanoemulsão é submetida à reação de polimerização *in situ* para obtenção das nanocápsulas; durante essa retirada de volume do nanocarreador intermediário (nanoemulsão), pode ter havido perda do fármaco, acarretando diminuição no rendimento do procedimento.

5.6.5 – Liberação *in vitro* do propionato de clobetasol

O estudo de liberação *in vitro* é realizado com a intenção de determinar a quantidade de fármaco liberada da formulação em função do tempo. A elucidação do perfil de liberação do fármaco é importante para fornecer informações quanto à

estrutura do sistema, o mecanismo envolvido no processo de liberação, a interação fármaco-carreador, e também, como ferramenta no controle de qualidade.

A liberação de fármacos a partir de nanopartículas depende da desorção do fármaco da superfície das partículas, da difusão do fármaco através da parede polimérica, da erosão do polímero ou ainda, da combinação dos processos de difusão e erosão (SOPPIMATH *et al.*, 2001). Assim, o fármaco dissolvido no meio receptor difunde facilmente pela membrana de diálise até que se atinja o equilíbrio entre os dois compartimentos (LEVY e BENITA, 1990).

Uma das principais vantagens da técnica de diálise reversa é a garantia das condições *sink* durante a liberação. Conforme calculado anteriormente, a solubilidade do propionato de clobetasol no meio de liberação constituído por tampão acetato de sódio pH 5,5 : Labrasol a 5% é igual a 373,95 µg/mL. Para que as condições *sink* sejam mantidas durante o experimento, a quantidade de amostra adicionada para iniciar o teste não deve ser superior a 20% deste valor, ou seja, o meio receptor deve conter quantidade de formulação equivalente a, no máximo, 74,79 µg de propionato de clobetasol. Desta maneira, ao adicionar 20,0 mL de amostras de nanocápsulas contendo o fármaco a 0,5 mg/mL em 200 mL do meio receptor, a quantidade de clobetasol presente no meio foi igual a 50,0 µg, o que está dentro da faixa adequada para manutenção das condições *sink*.

As concentrações de fármaco presentes no meio receptor e liberadas foram calculadas a partir da curva analítica do propionato de clobetasol obtida por CLAE (**Figura 19**). Conforme recomendado pela legislação vigente, o coeficiente de correlação linear maior que 0,99 demonstrou a linearidade do método na faixa de trabalho de 0,1 a 40,0 µg/mL.

O cálculo final da concentração de fármaco liberada foi feito por uma relação de proporcionalidade entre as concentrações de clobetasol obtidas no meio de liberação naquele tempo e dentro do saco de diálise (amostra). O resultado foi exibido em porcentagem de clobetasol liberada (**Figura 20**).

Figura 19: Curva analítica do propionato de clobetasol obtida para quantificação do fármaco liberado e presente no meio receptor

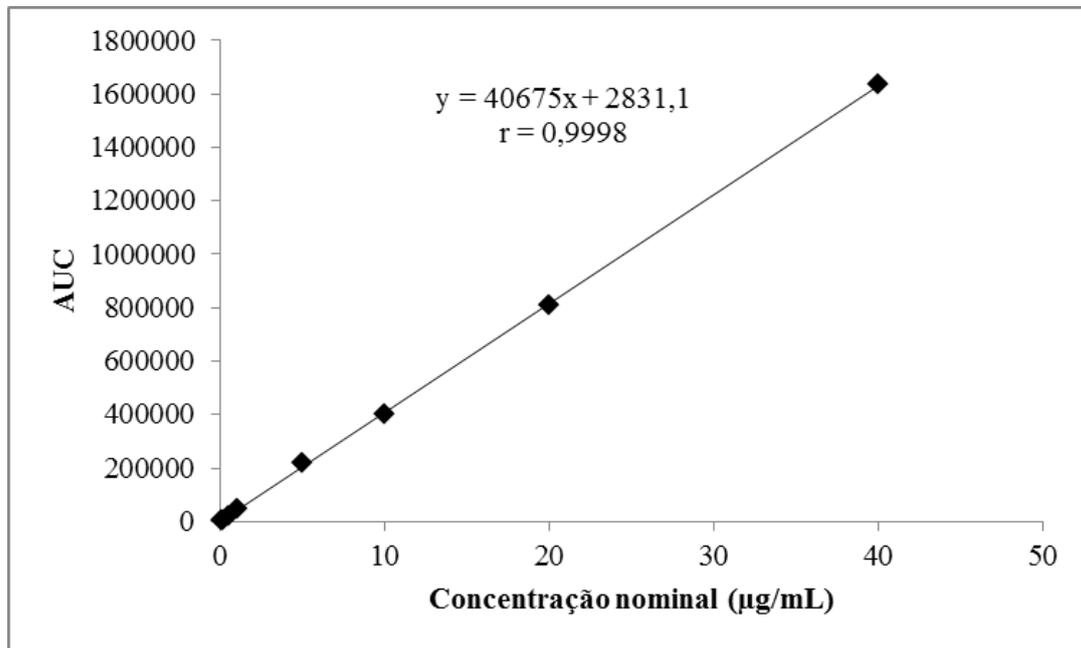
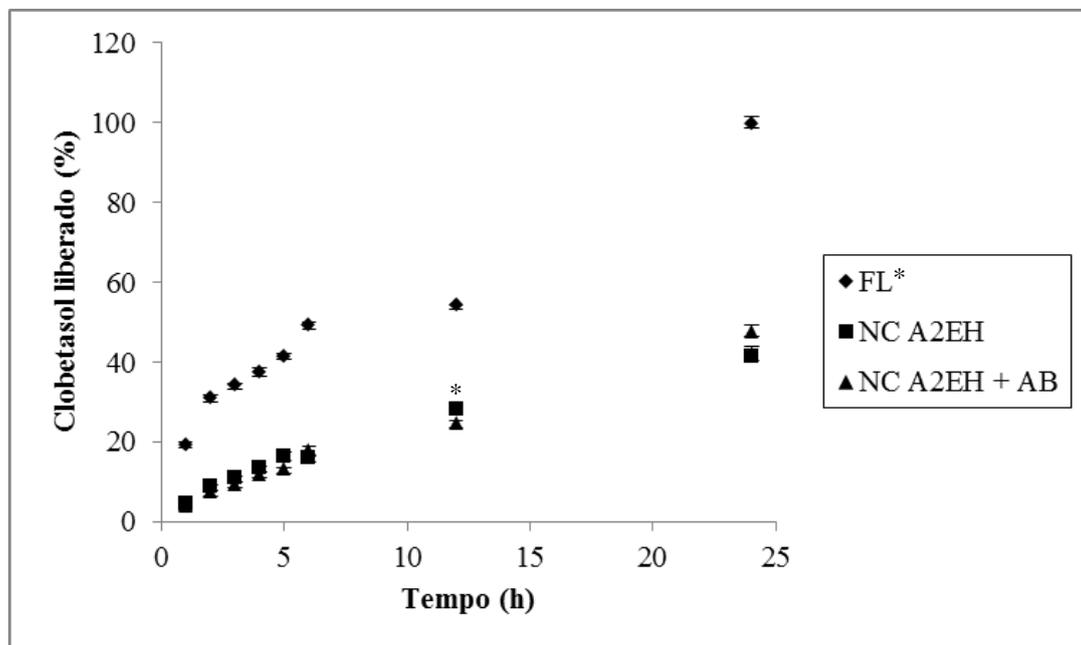


Figura 20: Porcentagem de propionato de clobetasol liberada ao longo do tempo para as formulações contendo o fármaco encapsulado (NC A2EH e NC A2EH + AB) e solução etanólica do fármaco livre (FL)



* Diferença significativa $p < 0,05$

Ao analisar a porcentagem de propionato de clobetasol liberada em cada tempo isolado, observa-se que as nanocápsulas constituídas por polímeros diferentes liberaram o fármaco em proporção similar, ao passo que a solução etanólica liberou quantidades superiores do fármaco. Este comportamento pode estar associado à estrutura das nanocápsulas, nas quais a liberação ocorre por difusão do fármaco pela barreira polimérica, a partir do núcleo oleoso, o que retarda o processo (SOPPIMATH *et al.*, 2001). Como na formulação livre não há esse impedimento polimérico, o fármaco é liberado rapidamente e, após um período de tempo, em sua totalidade (100%).

Ao comparar as médias da porcentagem de propionato de clobetasol liberada em cada tempo das formulações entre si pela análise estatística, foi observado que $p < 0,05$ para FL em relação a cada uma das nanocápsulas. Estas, porém, não apresentaram diferença estatística entre suas médias, pois o valor de p foi maior que 0,05. Desta maneira, foi possível demonstrar que a liberação do fármaco a partir da solução etanólica foi estatisticamente diferente das outras formulações em todos os tempos.

Como as nanocápsulas não apresentaram diferença estatística ao comparar suas médias obtidas para a liberação do clobetasol avaliou-se, então, se haveria alguma diferença estatística da porcentagem de cada liberação isolada que deu origem à média, em todos os tempos. Foi observado que, apenas em 12 horas, as formulações NC A2EH e NC A2EH + AB apresentaram $p < 0,05$, demonstrando que neste tempo houve diferença estatística entre a liberação do fármaco a partir destas formulações.

Os dados obtidos permitem, também, inferir que os diferentes polímeros envolvidos na composição das nanocápsulas (poli(acrilato de 2-etilhexila) para NC A2EH e poli(acrilato de 2-etilhexila-acrilato de butila) para NC A2EH + AB) não influenciaram na liberação do propionato de clobetasol ou atuaram da mesma maneira, uma vez que a proporção de liberação foi semelhante para ambas as formulações.

De maneira geral, durante a liberação de fármacos a partir de nanocápsulas, há eventualmente o efeito *burst*, caracterizado pela rápida liberação do princípio ativo nos primeiros minutos do teste. Este fato está relacionado à liberação do fármaco adsorvido ou fracamente ligado ao nanocarreador sendo, portanto, desprendido da formulação mais facilmente (FONTANA *et al.*, 2009). De acordo com os resultados de liberação

obtidos para as nanocápsulas deste trabalho, conclui-se que o efeito *burst* não ocorreu. Isso pode ser justificado pelo fato de essas amostras apresentarem baixa concentração de fármaco livre (**Tabela 11**), que seria responsável pelo efeito.

6. Conclusão

6 – CONCLUSÃO

Foram desenvolvidas duas nanocápsulas distintas de propionato de clobetasol (uma contendo o polímero poli(acrilato de 2-etilhexila) e outra, o co-polímero poli(acrilato de 2-etilhexila-acrilato de butila)) através da técnica de polimerização *in situ* a partir de nanoemulsões. As formulações foram caracterizadas quanto aos testes físico-químicos, que confirmaram a obtenção das nanocápsulas.

As nanoemulsões foram obtidas pelo método de inversão de fases, confirmado pela análise da condutividade, e consideradas estáveis, pois não foram evidenciados sinais de separação de fases, cremeação, floculação, precipitação ou alterações no seu aspecto físico. Também não foram encontrados cristais líquidos, o que demonstrou a homogeneidade do sistema.

De acordo com as análises de tamanho e IP, foram obtidas formulações nanométricas e monodispersas, que mantiveram essas características mesmo após os testes de centrifugação e estresse térmico. Além disso, as medidas de pH exibiram valores próximos da neutralidade e sofreram pequenas variações no período de 30 dias, indicando a estabilidade dos nanossistemas.

Através da microscopia de força atômica, a morfologia foi analisada e comprovada a formação de nanocápsulas de propionato de clobetasol de formato esférico. Os polímeros formados ao redor das nanocápsulas apresentaram espectros característicos ao dos poli(acrilato de 2-etilhexila) e poli(acrilato de 2-etilhexila-acrilato de butila) através de análises de espectroscopia por infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR).

Ambas as formulações apresentaram alta eficiência de encapsulação do fármaco e eficiência do processo satisfatória. O teste de liberação *in vitro* do propionato de clobetasol demonstrou que as nanocápsulas liberaram o fármaco em proporção similar e gradualmente ao longo do tempo, e não em sua totalidade como a solução etanólica do fármaco livre.

As nanocápsulas de propionato de clobetasol obtidas neste trabalho devem ser avaliadas em testes *in vivo* para, futuramente, serem indicadas como medicamentos promissores no tratamento da psoríase leve a moderada, uma vez que visam à redução dos efeitos adversos do fármaco e consequente aumento da adesão do paciente ao tratamento.

7.Referências

7 – REFERÊNCIAS

AGUIAR, T. A. **Desenvolvimento de nanoemulsões e emulsões com cristais líquidos para uso farmacêutico a partir de óleos vegetais de plantas mineiras**. 2010. 94f. Dissertação (mestrado) Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2010.

AMMAR, H. O.; SALAMA, H. A.; GHORAB, M.; MAHMOUD, A. A. Nanoemulsion as a potential ophthalmic delivery system for dorzolamide hydrochloride. **The American Association of Pharmaceutical Scientists Journal (AAPS Pharm Sci Tech)**, v. 10, n. 3, p. 808 – 819, 2009.

ANTON, N.; BENOIT, J. P.; SAULNIER, P. Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion. **Journal of Controlled Release**, v. 128, p. 185–199, 2008.

ANTON, N.; GAYET, P.; BENOIT, J.-P.; SAULNIER, P. Nano-emulsions and nanocapsules by the PIT method: an investigation on the role of the temperature cycling on the emulsion phase inversion. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 344, n. 1-2, p. 44-52, 2007.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Resolução RE nº 899, Diário da União, 2003.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Banco de Dados de Medicamentos, Monografias.

Disponível em:

www.anvisa.gov.br/divulga/public/livro_eletronico/dor.html#_Toc24791877. Acesso em 29 de julho de 2012.

AZULAY, R. D., AZULAY D. R., AZULAY-ABULAFIA L. **Dermatologia**. 5ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 992p. 2011.

BADILH, U., SEN, T., TARIMCI, N. Microparticulate Based Topical Delivery System of Clobetasol Propionate. **The American Association of Pharmaceutical Scientists Journal (AAPS Pharm Sci Tech)**. v. 12, n. 3, p. 949 – 957, 2011.

BATHEJA, P.; SHEIHET, L.; KOHN, J.; SINGER, A. J.; MICHNIAK-KOHN, B. Topical drug delivery by a polymeric nanosphere gel: Formulation optimization and in vitro and in vivo skin distribution studies. **Journal of Controlled Release**, v. 149, n. 2, p. 159-167, 2011.

BRUXEL, F.; LAUX, M.; WILD, L. B.; FRAGA, M.; KOESTER, L. S.; TEIXEIRA, H. F. Nanoemulsões como sistemas de liberação parenteral de fármacos. **Química Nova**, v. 35, n. 9, p. 1827 - 1840, 2012.

CABALLERO, N. E. D. Balanço da participação brasileira nas pesquisas em nano (bio) tecnologia. In: **Novas tecnologias na Genética Humana: Avanços e impactos para a saúde**. EMERIK, M. C.; MONTENEGRO, K. B. M.; DEGRAVE, W. Rio de Janeiro: FioCruz, p. 131-145, 2007.

CADIOLI, L. P.; SALLA, L. D. Nanotecnologia: um estudo sobre seu histórico, definição e principais aplicações desta inovadora tecnologia. **Revista de Ciências Exatas e Tecnologia**, v. 1, n. 11, p. 98 - 105, 2006.

CAPÓ, J. I. T., GUTIÉRREZ, X. P., DOMÍNGUEZ, C. C. Incremento de la actividad timolítica del clobetasol em forma liposomal. **Revista Cubana Farmacêutica**, v. 38, p. 1-6, 2004.

CARDOSO, A. O. Espalhamento de luz dinâmico aplicado no estudo de sistemas micelares. 2001.

Disponível em:

<http://www.iqm.unicamp.br/~wloh/offline/qp433/seminarios/textodeapoio-atilio.pdf>.

Acesso em: 12 de março de 2013.

CHERN, C. S. Emulsion polymerization mechanisms and kinetics. **Progress in Polymer Science**, v. 31, n. 5, p. 443-486, 2006.

DUARTE, I.; BUENSE, R. KOBATA, C. Fototerapia. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 1, n. 81, p. 74 - 82, 2006.

DURÁN, N.; DE AZEVEDO, M. M. M. O que é nanobiotecnologia? Atualidades e perspectivas. 2002.

Disponível em: www.ifi.unicamp.br/extensao/oficinas/anteriores/of_9_duran.doc.
Acesso em: 4 de fevereiro de 2013.

EUTIS, S.; EL-SAYED, M. A. Why gold nanoparticles are more precious than pretty gold: Noble metal surface plasmon resonance and its enhancement of the radiative and nonradiative properties of nanocrystals of different shapes. **Chemical Society Reviews**, v. 35, n. 3, p. 209 - 217, 2005.

FARBER, E. M.; NALL, M. L. The natural history of psoriasis in 5,600 patients. **Dermatologica**, v. 148, n. 1, p. 1-18, 1974.

FAUZEE, A. F. B.; WALKER, R. B. Forced degradation studies of clobetasol 17-propionate in methanol, propylene glycol, as bulk drug and cream formulations by RP-HPLC. **Journal of Separation Science**, v. 36, n. 5, p. 849 - 856, 2013.

FERNANDEZ, P.; ANDRÉ, V.; RIEGER, J.; KUHNLE, A. Nano-emulsion formation by emulsion phase inversion. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 251, p. 53-58, 2004.

FONTANA, M. C.; BASTOS, M. O.; BECK, R. C. R. Development and validation of a fast RP-HPLC method for the determination of clobetasol propionate in topical nanocapsule suspensions. **Journal of Chromatographic Science**, v. 48, n. 8, p. 637-640, 2010.

FONTANA, M. C.; CORADINI, K.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R.; BECK, R. C. R. Nanoencapsulation as a Way to Control the Release and to Increase the Photostability of Clobetasol Propionate: Influence of the Nanostructured System. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 5, n. 3, p. 1 - 10, 2009.

FONTANA, M. C.; REZER, J. F. P.; CORADINI, K.; LEAL, D. B. R.; BECK, R. C. R. Improved efficacy in the treatment of contact dermatitis in rats by a dermatological nanomedicine containing clobetasol propionate. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 79, n. 2, p. 241-249, 2011.

FRONZA, T.; CAMPOS, A.; TEIXEIRA, H. Nanoemulsões como sistema de liberação para fármacos oftálmicos. **Acto Farm. Bonaerense**, v. 23, n. 4, p. 552-566, 2004.

FRYD, M. M.; MASON, T. G. Advanced nanoemulsions. **Annual Review of Physical Chemistry**, v. 63, p. 493-518, 2012.

GONÇALO, R. Nanómetro: a dimensão que sempre existiu. **Ciência Hoje**. 2008. Disponível em <http://www.cienciahoje.pt/index.php?oid=24832&op=all>, acessado em 2 de fevereiro de 2013.

GOON, A. T-J.; YOSIPOVITCH, G.; CHAN, Y-H.; GOH, C. Barrier repair in chronic plaque-type psoriasis. **Research Skin and Technology**. v. 10, n. 1, p. 10 - 13, 2004.

GOTO, P. L. **Desenvolvimento de nanopartículas poliméricas por polimerização in situ a partir de nanoemulsões produzidas por inversão de fases**. 2011. 107 f. Dissertação (mestrado). Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto.

GOTO, P. L., VILELA, J. M. C, ANDRADE, M. S., SANTOS, O. D. H. Preparation and characterization of polymeric nanocapsules produced by in situ polymerization from nanoemulsions produced by direct emulsification. **Journal of Dispersion Science and Technology**. v. 34, n. 2, p. 228-233, 2013.

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

HENSELER, T.; CHRISTOPHERS, E. Psoriasis of early and late onset: Characterization of two types of psoriasis vulgaris. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 13, n. 3, p. 450-456, 1985.

HU, F. Q., YUAN, H., ZHANG, H. H., FANG M. Preparation of solid lipid nanoparticles with clobetasol propionate by a novel solvent diffusion method in aqueous system and physicochemical characterization. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 239, n. , p. 121 - 128, 2002.

IZQUIERDO, P.; ESQUENA, J.; TADROS, Th. F., DEDEREN, C., GARCIA, M. J., AZEMAR, N, SOLANS, C. Formation and Stability of Nano-Emulsions Prepared Using the Phase Inversion Temperature Method. **Langmuir**, v. 18, n. 1, p. 26-30, 2002.

JAFARI, S. M.; ASSADPOOR, E.; HE, Y.; BHANDARI, B. Re-coalescence of emulsion droplets during high-energy emulsification. **Food Hydrocolloids**, v. 22, n. 7, p. 1191-1202, 2008.

JARRATT, M. T.; CLARK, S. D.; SAVIN, R. C.; SWINYER, L. J.; SAFLEY, C. F.; BRODELL, R. T.; YU, K. Evaluation of the efficacy and safety of clobetasol propionate spray in the treatment of plaque-type psoriasis. **Cutis**, v. 78, p. 348 - 354, 2006.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 3ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 540p. 2004.

KAMALY, N.; XIAU, Z.; VALENCIA, P. M.; RADOVIC-MORENO, A. F.; FAROKHZAD, O. M. Targeted polymeric therapeutic nanoparticles: design, development and clinical translation. **Chemical Society Reviews**. n. 7, v. 41, p. 2971 - 3010, 2012.

KANWAR, A. J.; YADAV, S.; DOGRA, S. Psoriasis: What is new in nonbiologic systemic therapy in the era of biologics? **Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology**, n. 76, p. 622-633, 2010.

KASONGO, K. W. **Development and in vitro evaluation of a clobetasol 17-propionate topical cream formulation**. 2007. 252 f. Dissertação (mestrado). Rhodes University, Grahamstown, África do Sul.

KATARE, O. P.; RAZA, K.; SINGH, B.; DOGRA, S. Novel drug delivery systems in topical treatment of psoriasis: Rigors and vigors. **Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology**. v. 76, n. 6, p. 612 - 621, 2010.

KINGSLEY, J. D.; DOU, H.; MOREHEAD, J. et al. Nanotechnology: a focus on nanoparticles as a drug delivery system. **Journal of Neuroimmune Pharmacology**, v. 1, n. 3, p. 340-50, 2006.

KOROLEVA, M. Y.; YURTOV, E. V. Nanoemulsions: the properties, methods of preparation and promising applications. **Russian Chemical Reviews**, v. 81, n. 1, p. 21-43, 2012.

- KRUEGER, G.; ELLIS, C. N. Psoriasis - recent advances in understanding its pathogenesis and treatment. **Journal of American Academy of Dermatology**, v. 53, n. 1, p. S94 - S100, 2005.
- LANDFESTER, K. Miniemulsion polymerization and the structure of polymer and hybrid nanoparticles. **Angewandte Chemie**, v. 48, n. 25, p. 4488-507, 2009.
- LEBWOHL, M. Psoriasis. **The Lancet**. v. 361, p. 1197 - 1204, 2003.
- LEVY, M. Y.; BENITA, S. Drug release from submicronized o/w emulsion: a new in vitro kinetic evaluation model. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 66, n. 1 - 3, p. 29 - 37, 1990.
- LIU, D.; KOBAYASHI, T.; RUSSO, S.; LI, F.; PLEVY, S. E.; GAMBLING, T. M.; CARSON, J. L.; MUNPER, R. J. In vitro and in vivo evaluation of a water-in-oil microemulsion system for enhanced peptide intestinal delivery. **The American Association of Pharmaceutical Scientists Journal (AAPS Journal)**, v. 15, n. 1, p. 288-298, 2013.
- LIU, W.; SUN, D.; LI, C.; LIU, Q.; XU, J. Formation and stability of paraffin oil-in-water nano-emulsions prepared by the emulsion inversion point method. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 303, n. 2, p. 557-63, 2006.
- LOWE, N.; FELDMAN, S. R.; SHERER, D.; WEISS, J.; SHAVIN, J. S.; LIN, Y. L.; FOLEY, V.; SOTO, P. Clobetasol propionate lotion, an efficient and safe alternative to clobetasol propionate emollient cream in subjects with moderate to severe plaque-type psoriasis. **Journal of Dermatological Treatment**, v. 16, n. 3, p. 158 - 165, 2005.
- MANADAS, R.; PINA, M. E.; VEIGA, F. A dissolução *in vitro* na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada. **Brazilian Journal of Pharmaceuthical Sciences**, v. 38, n. 4, p. 375 - 399, 2002.
- MARTINS, P. R.; DULLEY, R. D.; RAMOS, S. F.; NOGUEIRA, E. A.; BARBOSA, M. Z.; ASSUMPCÃO, R.; JUNIOR, S. N.; LACERDA, A. L. S. Nanotecnologias na indústria de alimentos. 2007.

Disponível em:

http://www.pucsp.br/eitt/downloads/vi_ciclo_paulomartins_marisabarbosa_nano_puc.pdf. Acesso em 18 de fevereiro de 2013.

McCLEMENTS, D. J. Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities. **Soft Matter**, v. 8, n. 6, p. 1719, 2012.

MINISTÉRIO DA CIÊNCIA E TECNOLOGIA (MCT), *Desenvolvimento da nanociência e nanotecnologia*. Proposta do grupo de trabalho criado pela portaria MCT n° 252, como subsidio ao programa de nanociência e nanotecnologia do PPA 2004-2007. Brasília, 2004. Disponível em:<http://mct.gov.br/UserFiles/Documento%20GT.pdf> Acesso em: 30/07/2012.

MORAIS, J. M. **Desenvolvimento e avaliação do processo de obtenção de emulsões múltiplas A/O/A em etapa única empregando óleo de canola e tensoativo não-iônico derivado do óleo de rícino**. 2008. 216 f. Tese (doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

MORAIS, J. M.; SANTOS, O. D. H.; DELICATO, T.; GONÇALVES, R. A.; ROCHA-FILHO, P. A. MORAIS, G. G.; SANTOS, O. D. H.; MASSON, D. S.; OLIVEIRA, W. P.; ROCHA-FILHO, P. A. Physicochemical characterization of canola oil/water nanoemulsions obtained by determination of required HLB number and emulsion phase inversion methods. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 26, n. 6, p. 109 - 115, 2006.

MOREIRA, E. R.; SOUZA, P. R. K. Psoríase: a doença e sua terapêutica. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, n. 15, p. 75-81, 2008.

MUTHU, M. S.; SINGH, S. Poly (D, L-Lactide) nanosuspensions of risperidone for parenteral delivery: formulation and *in-vitro* evaluation. **Current Drug Delivery**, n. 1, v. 6, p. 62 - 68, 2009.

MYHRANYAN, A.; FERRAZ, N.; STROMME, M. Current status and future prospects of nanotechnology in cosmetics. **Progress in Material Science**, v. 57, n. 5, p. 875 - 910, 2012.

NAAHIDI, S.; JAFARI, M.; EDALAT, F.; RAYMOND, K.; KHADEMHOSEINI, A.; CHEN, P. Biocompatibility of engineered nanoparticles for drug delivery. **Journal of Controlled Release**. n. 2, v. 166, p. 182 - 194, 2012.

ORGANIZAÇÃO NACIONAL DA PSORÍASE. Disponível em: www.psoriase.org.br. Acesso em 31 de janeiro de 2013.

PAPINI, C. J. **Estudo comparativo de métodos de determinação do tamanho de partícula**. 2003. 130 f. Dissertação (mestrado). Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.

PARDEIKE, J.; HOMMOSS, A.; MÜLLER, R. H. Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. **International Journal of Pharmaceutics**. n. 1-2, v. 366, p. 170-184, 2009.

PEREIRA, M. A.; MOSQUEIRA, V. C. F.; VILELA, J. M. C.; ANDRADE, M. S.; RAMALDES, G. A.; CARDOSO, V. N. PLA-PEG nanocapsules radiolabeled with ^{99m}Tc-HMPAO: Release properties and physicochemical characterization by atomic force microscopy and photon correlation spectroscopy. **European Journal Of Pharmaceutical Sciences**, v. 33, p. 42–51, 2008.

PROW, T. W.; GRICE, J. E.; LIN, L. L. et al. Nanoparticles and microparticles for skin drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, n. 6, p. 470-91, 2011.

QUINTANAR-GUERRERO, D., ALLÉMANN, E., DOELKER, E., FESSI, H. Preparation and characterization of nanocapsules from preformed polymers by a new process based on emulsification diffusion technique. **Pharmaceutical Research**, v. 15, n. 7, p. 1056 – 1062, 1998.

REIS, C. P., NEUFELD, R. J., RIBEIRO, A. J., VEIGA, F. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**. v. 2, n. 1, p. 8 – 21, 2006.

RENZI, C.; PICARDI, A.; ABENI, D.; AGOSTINI, E.; BALIVA, G.; PASQUINI, P.; PUDDU, P.; BRAGA, M. Association of dissatisfaction with care and psychiatric

morbidity with poor treatment compliance. **Archives of Dermatology**. v. 138, n. 3, p. 337 - 342, 2002.

ROLAND, I PIEL, G.; DELATTRE, L.; EVRARD, B.. Systematic characterization of oil-in-water emulsions for formulation design. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 263, n. 1-2, p. 85-94, 2003.

SADURNÍ, N.; SOLANS, C.; AZEMAR, N.; GARCÍA-CELMA, M. J. Studies on the formation of O/W nano-emulsions, by low-energy emulsification methods, suitable for pharmaceutical applications. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 26, n.5, p. 438-45, 2005.

SAJJADI, S. Nanoemulsion formation by phase inversion emulsification: on the nature of inversion. **Langmuir**, v. 22, n. 13, p. 5597-603, 2006.

SALAGER, J.-L.; FORGIARINI, A.; MÁRQUEZ, L. et al. Using emulsion inversion in industrial processes. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 108-109, p. 259-72, 2004.

SALTÃO, R.; VEIGA, F. Ciclodextrinas em novos sistemas terapêuticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. n. 1, v. 37, p. 1 - 17, 2001.

SANTOS, O. H. D. **Desenvolvimento e avaliação das propriedades físico-químicas e atividade cosmética in vivo de emulsões de óleo de *Calendula officinalis* com cristais líquidos**. 2006. 147f. Tese (doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

SANTOS-MAGALHÃES, N. S.; PONTES, A; PEREIRA, V. M. W.; CAETANO, M. N. P. Colloidal carriers for benzathine penicillin G: nanoemulsions and nanocapsules, **International Journal of Pharmaceutics**. v. 208, n. 1 - 2, p. 71 -80, 2000.

SAWADA, N. O.; NICOLUSSI, A. C.; OKINO, L.; CARDOZO, F. M. C.; ZAGO, M. M. F. Avaliação da qualidade de vida de pacientes com câncer submetidos à quimioterapia. **Revista da Escola de Enfermagem - USP**, v. 43, n. 3, p. 581 - 587, 2009.

- 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, n. 5, p. 726-737, 2003.
- SCHAFFAZICK, S. R.; POHLMANN, A. R.; MEZZALIRA, G.; GUTERRES, S. S. Development of nanocapsule suspensions and nanocapsule spray-dried powders containing melatonin. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 17, n. 3, p. 562-569, 2006.
- SENYIĞIT, T.; PADULA, C.; ÖZER, Ö.; SANTI, P. Different approaches for improving skin accumulation of topical corticosteroids. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 380, n. 1-2, p. 155-60, 2009.
- SENYIĞIT, T.; SONVICO, F.; BARBIERI, S.; ÖZER, Ö.; SANTI, P.; COLOMBO, P. Lecithin/chitosan nanoparticles of clobetasol-17-propionate capable of accumulation in pig skin. **Journal of Controlled Release**, v. 142, n. 3, p. 368-373, 2010.
- SHINODA, K.; ARAI, H. The Correlation between phase inversion temperature in emulsion and cloud point in solution of nonionic emulsifier. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 68, n. 12, p. 3485-3490, 1964.
- SILVA, H. D.; CERQUEIRA, M. Â.; VICENTE, A. A. Nanoemulsions for food applications: development and characterization. **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, n. 3, p. 854-867, 2011.
- SILVA, L. A. D.; TAVEIRA, S. F.; LIMA, E. M.; MARRETO, R. M. *In vitro* skin penetration of clobetasol from lipid nanoparticles: drug extraction and quantitation in different skin layers. **Brazilian Journal of Pharmaceuthical Sciences**, v. 48, n. 4, p. 811 - 817 2012.
- SOLANS, C.; SOLÉ, I. Nano-emulsions: formation by low-energy methods. **Current Opinion in Colloids & Interface Science**, v. 17, n.5 , p. 246 - 254, 2012.
- SOPPIMATH, K. S.; AMINABHAVI, T. M.; KULKARNI, A. R.; RUDZINSK, W. E. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **Journal of Controlled Release**, v. 70, n. 1 -2, p. 1 - 20, 2001.

SPERNATH, L.; MAGDASSI, S. A new method for preparation of poly-lauryl acrylate nanoparticles from nano-emulsions obtained by the phase inversion temperature process. **Polymers for Advanced Technologies**, v. 18, p. 705–711, 2007.

STICHERLING, M. Mechanisms of psoriasis. **Drug Discovery Today: Disease Mechanisms**, v. 2, n. 2, p. 275-281, 2005.

TADROS, T.; IZQUIERDO, P.; ESQUENA, J.; SOLANS, C. Formations and stability of nano-emulsions. **Advances in Colloids and Interface Science**, v. 108-109, p. 303-318, 2004.

TAS, H.; MATHIAS, L. J. Poly(methyl methacrylate) copolymers containing multiple, pendent plasticizing groups. **Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry**, v. 48, p. 2302-2310, 2010.

TIARKS, F.; LANDFESTER, K.; ANTONIETTI, M. Preparation of polymeric nanocapsules by miniemulsion polymerization. **Langmuir**, v. 17, n. 3, p. 908-918, 2001.

TSAI, T-F.; HO, J-C.; SONG, M.; SZAPARY, P.; GUZZO, C.; SHEN, Y-K.; LI, S.; KIM, K-J.; KIM, T-Y.; CHOI, J-H.; YOUN, J-I. Efficacy and safety of ustekinumab for the treatment of moderate-to-severe psoriasis: A phase III, randomized, placebo-controlled trial in Taiwanese and Korean patients (PEARL). **Journal of Dermatological Science**, v. 63, n. 3, p. 154 - 163, 2011.

UNILEVER (2011). Disponível em:

www.unileverusa.com/innovation/productinnovations/coolicecreaminnovations/.

Acesso em 13 de abril de 2013.

VAN DE KERKHOFF, P.; HORN, L. Topical therapy for psoriasis - current perspectives. **US Dermatology Review**, p. 9 - 11, 2007.

VAUTHIER, C.; BOUCHEMAL, K. Methods for the preparation and manufacture of polymeric nanoparticles. **Pharmaceutical Research**, v. 26, n. 5, p. 1025-58, 2009.

WIEDERSBERG, S.; LEOPOLD, C. S.; GUY, R. H. Bioavailability and bioequivalence of topical glucocorticoids. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 68, n. 3, p. 453-66, 2008.

ZAGHLOUL, S. S.; GOODFIELD, M. J. D. Objective assessment of compliance with psoriasis treatment. **Archives of Dermatology**. v. 140, n. 4, p. 408 - 414, 2004.

8. Anexo


INPI INSTITUTO
NACIONAL
DA PROPRIEDADE
INDUSTRIAL

INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
Sistema de Gestão da Qualidade
Diretoria de Patentes

DIRPA	Tipo de Documento:	Formulário	DIRPA	Página:	2/3
	Título do Documento:		Código:	Versão:	
Depósito de Pedido de Patente			FQ001	2	
			Procedimento: DIRPA-PQ006		

6. Inventor (72):
 Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seus nome(s), neste caso não preencher os campos abaixo.

6.1 Nome: ORLANDO DAVID HENRIQUE DOS SANTOS

6.2 Qualificação: PROF. UNIVERSITÁRIO

6.3 CPF: 260.362.798-84

6.4 Endereço Completo: R. FRANCISCO AUGUSTO DA SILVA, 52, B. CABEÇAS - OURO PRETO/MG

6.5 CEP: 35400-000

6.6 Telefone: 3135591638

6.7 FAX: 3135591628

6.8 E-mail: orlando@ef.ufop.br

 continua em folha anexa

7. Declaração de divulgação anterior não prejudicial.

Artigo 12 da LPI – período de graça.

Informe no item 11.13 os documentos anexados, se houver.

8. Declaração na forma do item 3.2 da Instrução Normativa PR nº 17/2013:
 Declaro que os dados fornecidos no presente formulário são idênticos ao da certidão de depósito ou documento equivalente do pedido cuja prioridade está sendo reivindicada.

9. Procurador (74):

9.1 Nome: RODRIGO FERNANDO BIANCHI

9.2 CNPJ/CPF: 141.017.098-58

9.3 API/OAB:

9.4 Endereço Completo: AV. JK, 170, APTO 180, BAIRRO BAUXITA OURO PRETO/MG

9.5 CEP: 35400-000

9.6 Telefone: 3135591742

9.7 FAX: 3135591370

9.8 E-mail: bianchi@iceb.ufop.br

 continua em folha anexa

10. Listagem de sequências biológicas.

Informe nos itens 11.9 ao 11.12 os documentos anexados, se houver.

ANEXO DE DADOS

Título da Invenção: **“PRODUÇÃO DE SISTEMAS NANOMÉTRICOS - NANOEMULSÕES E NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS DE PROPIONATO DE CLOBETASOL ASSOCIADO À ÓLEOS VEGETAIS PARA USO TÓPICO EM TRATAMENTO DE DERMATITES”**

Continuação do Item 01 – Depositante

- 1.1 Nome: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG
- 1.2 CNPJ: 2194880001-83
- 1.3 Endereço: Rua Raul Pompéia, 101, Bairro São Pedro, 30330-080
Belo Horizonte/MG
- 1.4 Telefone: 31 3280-2161
- 1.5 Fax: 31 3280-2160
- 1.6 Email: dtf@fapemig.br

Continuação do Item 06 – Inventor

- 6.1 Nome: Simone Pinto Carneiro
- 6.2 Qualificação: Mestranda da UFOP
- 6.3 CPF: 062156316-12
- 6.4 Endereço: Praça Silviano Brandão, 21, Bairro Centro, Ouro Preto /MG
- 6.5 CEP: 35.400-000
- 6.6 Telefone: 31 88051031
- 6.7 Fax:
- 6.8 E-mail: simonepcarneiro@yahoo.com.br

- 6.1 Nome: Vanessa Teixeira Jerônimo
- 6.2 Qualificação: Mestranda da UFOP
- 6.3 CPF: 067675286-17
- 6.4 Endereço: R. Manoel Francisco Gomes, 31, Bairro Bauxita, Ouro Preto /MG
- 6.5 CEP: 35.400-000
- 6.6 Telefone: 31 88063659
- 6.7 Fax:
- 6.8 E-mail: vanessavtj@yahoo.com.br

- 6.1 Nome: Tatiana Araújo Aguiar
- 6.2 Qualificação: Mestranda da UFOP
- 6.3 CPF: 093419917-57

