

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
DEPARTAMENTO DE PRODUÇÃO E CONTROLE DE MEDICAMENTOS
DISCIPLINA DE ESTÁGIO CURRICULAR EM FARMÁCIA**



**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE TEOSFERAS ELÁSTICAS
DESTINADAS À APLICAÇÃO TÓPICA**

GUILHERME SOARES DOS SANTOS

Porto Alegre, novembro de 2010

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
DEPARTAMENTO DE PRODUÇÃO E CONTROLE DE MEDICAMENTOS
DISCIPLINA DE ESTÁGIO CURRICULAR EM FARMÁCIA**

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE TEOSFERAS ELÁSTICAS
DETINADAS À APLICAÇÃO TÓPICA**

Trabalho de Conclusão de Curso da Disciplina de Estágio Curricular em Farmácia

Guilherme Soares dos Santos

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Sílvia Stanisquaski Guterres

Co-orientadora: MSc. Leticia Marques Colomé

Porto Alegre, novembro de 2010

APRESENTAÇÃO

O presente trabalho de conclusão da disciplina de Estágio Curricular em Farmácia, pré-requisito parcial para obtenção do grau Farmacêutico, foi elaborado no formato de artigo científico, de acordo com as normas da revista *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. Para a análise da banca examinadora, as instruções para a formatação de artigos a serem submetidos à revista acima referida encontram-se como anexo deste trabalho.

**Desenvolvimento e caracterização de teosferas elásticas destinadas à aplicação
tópica**

**Guilherme Soares dos Santos¹; Letícia Marques Colomé¹; Gabriela Garrastazu
Pereira¹; Daniel Canema²; Gilberto Weissmüller²; Sílvia Stanisçuaski Guterres^{1,*}**

¹Faculdade de Farmácia - Universidade Federal do Rio Grande do Sul,

²Instituto de Biofísica Carlos Chagas – Universidade Federal do Rio de Janeiro

* Correspondência:

S. S. Guterres

Faculdade de Farmácia – UFRGS, Av. Ipiranga, 2752, sala 404, Porto Alegre-RS, Brasil, CEP 90610-000

Fone: 55 51 3308-5215, Fax 55 51 3308-5437

Email: silvia.guterres@ufrgs.br

RESUMO

A dapsona é uma sulfona que possui atividade antimicrobiana e anti-inflamatória, sendo utilizada no tratamento da hanseníase ou doenças inflamatórias crônicas, especialmente as dermatológicas. Embora a administração tópica não seja ideal para o tratamento da hanseníase, outras patologias de pele podem ser tratadas através da aplicação cutânea, contexto no qual sistemas carreadores podem melhorar a penetração através do estrato córneo. Neste trabalho, carreadores lipídicos inovadores denominados teosferas foram preparados pelo método de homogeneização à alta pressão utilizando variados sistemas tensoativos. Estas formulações apresentaram tamanho nanométrico e adequada distribuição de tamanho. Uma formulação foi selecionada para encapsulação de dapsona e a presença do fármaco não alterou as características de tamanho de partícula da formulação inicial. As partículas contendo dapsona mostraram-se elásticas quando analisadas por microscopia de força atômica, sendo ainda capazes de controlar a liberação do fármaco encapsulado. Assim, estes sistemas representam uma alternativa para a aplicação cutânea de dapsona, especialmente pelo reduzido tamanho de partícula, elasticidade e capacidade de liberar o ativo de maneira controlada na pele.

UNITERMOS: nanopartículas lipídicas, sistemas coloidais elásticos, dapsona, liberação *in vitro*

ABSTRACT

Dapsone is a sulfone that present antimicrobiana and anti-inflammatory activity and is used to treat leprosy or chronic inflammatory skin diseases. Although topical administration is not narrow for the leprosy treatment, other skin diseases can be treated

by topical application. In this field carrier systems can improve the penetration through the stratum corneum. In this work, theospheres (an inovative lipid nanoparticles) were prepared by high pressure homogenization technique using different surfactants. These formulations presented size in nanometrical range and narrow size distribution. One formulation was selected for encapsulation of dapsona. The presence of the drug did not change the particle size of the initial formulation. The particles containing dapsona proved to be elastic when examined by atomic force microscopy. Besides, theospheres were able to control the release of the encapsulated drug. Thus, these carriers represent an alternative approach for dapsona dermal application due to its small particle size, elasticity and capability for releasing the drug in a controlled way on the skin.

UNITERMS: lipid nanoparticles, elastic colloids, dapsona, *in vitro* release study

INTRODUÇÃO

A dapsona (4-4'diaminofenilsulfona) é uma sulfona derivada de uma anilina que, assim como todas as sulfonas, possui um átomo de enxofre ligado a dois átomos de carbono (Figura 1). Por causa de sua dupla atividade - antimicrobiana e anti-inflamatória/imunomoduladora - a dapsona é utilizada mundialmente como terapia única ou em conjunto com outros fármacos no tratamento de doenças provocadas por patógenos (como hanseníase e pneumonia por *Pneumocystis jiroveci* em indivíduos infectados pelo HIV) ou ainda doenças inflamatórias crônicas, especialmente as dermatológicas (Crowson e Magro, 2001; Cohen, 2002) .

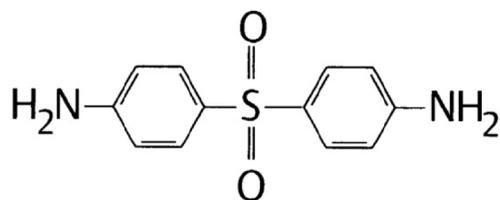


FIGURA 1 - Estrutura química da dapsona

De modo semelhante às demais sulfonamidas, a atividade antimicrobiana da dapsona é bacteriostática e o mecanismo de ação está relacionado com a inibição da síntese do ácido fólico pela competição com o ácido p-aminobenzóico em organismos susceptíveis (Coleman, 1993).

A atividade antiinflamatória é conhecida desde o início de 1950 e não tem relação com a atividade antibacteriana. A patogênese das dermatoses sensíveis à dapsona não foi totalmente elucidada, assim o mecanismo da ação antiinflamatória continua sob investigação. Contudo, muitos achados indicam que dapsona pode afetar sistemas efetores da resposta inflamatória através de: inibição dos produtos da 5-lipoxigenase (por exemplo, leucotrieno B4); inibição da ciclooxygenase I e II mediadoras da geração de tromboxano B2; interferência na ativação ou função da proteína G, resultando em uma inibição do sinal de transdução; inibição da produção de interleucina 8; entre outros (Wozel, 2010). Um estudo mostrou que dapsona é efetiva na supressão da migração de neutrófilos para lesões extravasculares, através do bloqueio da função de adesão destes neutrófilos às células endoteliais vasculares, função que é mediada por receptores de integrina (Coleman, 1993).

A capacidade da dapsona de inibir espécies reativas de oxigênio (ROS) parece contribuir para o efeito antiinflamatório. Doenças inflamatórias que respondem à dapsona são constantemente caracterizadas por uma infiltração de um grande número de

leucócitos polimorfonucleares (predominantemente neutrófilos) no tecido afetado. Uma vez ativados, os neutrófilos liberam mieloperoxidase, enzima atrelada à ativação da NADPH oxidase, a qual converte oxigênio a superóxido, formando peróxido de hidrogênio que se combina com a mieloperoxidase para produzir uma forma da enzima altamente oxidante (composto I), a qual reage com íons cloreto para formar ácido hipocloroso, o mais potente oxidante neutrofílico. A dapsona comporta-se como um substrato fraco da peroxidase e converte o composto I a composto II, o qual é inativo, prevenindo assim a formação de ácido hipocloroso (Coleman, 1993). Corroborando com a hipótese de inibição de ROS, dapsona é tão eficaz quanto catalase na redução dos níveis de H_2O_2 e tão potente quanto colchicina, catalase, benzoato e xantina na redução dos níveis de OH. Assim, os efeitos benéficos da dapsona em lesões cutâneas graves envolvem provavelmente a capacidade de interceptar as reações mediadas por intermediários de oxigênio gerados pela excessiva presença de polimorfonucleares (Wozel, 2010).

Quando administrada pela via oral a dapsona é metabolizada originando hidroxilaminas, responsáveis por efeitos adversos importantes como metemoglobinemia, (observada em todos os pacientes tratados com dapsona pela via oral), bem como hemólise. O tempo de meia-vida dos eritrócitos é diminuído e hemólise grave pode ocorrer em pacientes que apresentam deficiência na enzima glicose-6-fosfato desidrogenase. Outros efeitos colaterais menos frequentes observados com o tratamento utilizando dapsona pela via oral incluem ainda reações idiossincráticas como agranulocitose, erupção cutânea, leucopenia, neuropatia periférica, além de sintomas neurológicos e gastrointestinais (Helton *et al.*, 2000).

A determinação da concentração de dapsona em biópsias de pele de pacientes tratados com medicamento pela via oral sugere que concentrações na pele e concentrações plasmáticas são semelhantes. Assim, uma abordagem para reduzir os

efeitos colaterais é a administração de dapsona diretamente na área afetada. A aplicação cutânea pode fornecer concentrações eficazes da dapsona no tecido alvo e reduzir a exposição sistêmica ao fármaco, diminuindo a gravidade dos efeitos colaterais. Embora a administração tópica não seja ideal para o tratamento da hanseníase ou como uma terapia única para a dermatite herpetiforme, outras patologias de pele que comumente respondem ao tratamento com dapsona, tais como vasculite leucocitoclástica, artrite reumatóide e outras dermatites (Goodman & Gilman, 2001), além de lúpus eritematoso (Wonzel, 2010) poderiam ser adequadamente tratadas através da administração tópica deste fármaco (Helton *et al.*, 2000). Nos últimos anos, uma formulação tópica em gel foi aprovada para o tratamento de acne leve a moderada (Draelos *et al.*, 2007). A formulação tópica mostrou-se uma opção segura dispensando o monitoramento de anemia hemolítica, mesmo em pacientes com deficiência de glicose 6-fosfato desidrogenase (Lio e Kaye, 2009).

Ainda que o tratamento tópico de doenças da pele seja favorável devido ao menor risco de efeitos colaterais sistêmicos, o estrato córneo representa uma barreira à penetração de xenobióticos na pele viável. Assim sistemas carreadores podem ser uma opção para melhorar a penetração cutânea. Uma vez que lipídios epidérmicos são o constituinte primordial da barreira de penetração tópica, carreadores baseados em lipídios podem aderir-se à superfície da pele e permitir a interação entre os constituintes do carreador e aqueles das camadas mais externas do estrato córneo, favorecendo a permeação (Schafer-Korting *et al.*, 2007). Além de lipossomas, nanopartículas lipídicas têm sido estudadas intensivamente com esta finalidade. Nanopartículas lipídicas são sistemas coloidais derivados de emulsões O/A pela simples substituição do óleo por um lipídeo sólido. Estes sistemas representam uma alternativa a lipossomas e nanopartículas poliméricas, uma vez que podem contornar limitações existentes quanto à estabilidade e biocompatibilidade. Esta importante e promissora alternativa repousa nas características

das nanopartículas lipídicas que possibilitam conferir proteção a compostos lábeis contra degradação química e alcançar a liberação controlada da substância encapsulada (Müller *et al.*, 2000).

Dentro deste contexto, nosso grupo de pesquisa desenvolveu as teosferas, que são nanopartículas lipídicas inovadoras destinadas à aplicação tópica, apresentando como principais componentes a manteiga de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) e o óleo de castanha do Brasil (*Bertholletia excelsa*) (Colomé *et al.*, 2010). A manteiga de cupuaçu apresenta vários compostos interessantes para administração tópica como ácidos graxos insaturados, aminoácidos e vitaminas (Rogez *et al.*, 2004). Também possui dois flavonóides glicosídicos específicos (teograndinas I e II) e flavonóides antioxidantes (catequina, epicatequina, quercetina e kaempferol) (Yang *et al.*, 2003). O óleo de castanha do Brasil apresenta compostos como ácidos palmítico, esteárico, linoléico, mirístico, dentre outros, que também se caracterizam como substâncias interessantes para aplicação tópica (Gonçalves *et al.*, 2002).

Considerando o exposto, o objetivo deste trabalho foi preparar diferentes formulações de teosferas a fim de selecionar um sistema adequado para encapsulação de dapsona e passível de aplicação tópica cutânea. Constitui também objetivo da pesquisa a caracterização físico-química das teosferas sem fármaco e daquelas contendo dapsona, o estudo de liberação da dapsona a partir destes sistemas, bem como a investigação das características de elasticidade deste novo carreador.

MATERIAL E MÉTODOS

Preparação das teosferas sem fármaco

As teosferas foram preparadas pela técnica de homogeneização à alta pressão, utilizando o equipamento Panda 2K NS 1001L (Niro Soavi, Itália) a 500 bar e com 3 ciclos de

homogeneização. A fase oleosa foi composta de manteiga de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) (formulações A) misturada ou não ao óleo de castanha (*Bertholletia excelsa*) (formulações B). Diferentes tensoativos foram utilizados no desenvolvimento das formulações originando os sistemas denominados I A a IV B (Tabela I) com o objetivo de preparar sistemas lipídicos com constituição adequada para aplicação tópica, além de fornecer características elásticas ao carreador preparado.

TABELA I. Composição quali-quantitativa (% p/p) das formulações das teosferas

Componentes	Formulações							
	IA	IB	IIA	IIB	IIIA	IIIB	IVA	IVB
<i>Manteiga de Cupuaçu</i>	10	5	10	5	10	5	10	5
<i>Óleo de castanha</i>	-	5	-	5	-	5	-	5
BHT	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
<i>Imidazolidinil Uréia</i>	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
<i>Lecitina de soja</i>	3	3	-	-	3	3	-	-
<i>Poloxamer 188</i>	2	2	-	-	-	-	-	-
<i>Monooleato de sorbitano</i>	-	-	2	2	-	-	-	-
<i>Polissorbato 80</i>	-	-	2	2	2	2	2	2
<i>Óleo de Rícino 4000E</i>	-	-	-	-	-	-	3	3
<i>Água</i>	Qsp	qsp	qsp	qsp	Qsp	Qsp	qsp	qsp

Incorporação de dapsona nas teosferas

Dentre as formulações preparadas na etapa descrita anteriormente, um sistema foi selecionado com base em suas características físico-químicas para a incorporação da dapsona. Teosferas contendo dapsona (2,5 mg/ml) foram preparadas de maneira semelhante mediante a adição do fármaco na fase oleosa da formulação, devido ao caráter lipofílico deste fármaco.

Caracterização físico-química das teosferas

Todas as formulações de teosferas foram caracterizadas em termos de tamanho de partícula, distribuição de tamanho (índice de polidispersão - *polydispersion index*, PDI), potencial zeta, pH e viscosidade. Análises de tamanho de partícula foram realizadas por espectroscopia de correlação de fótons (*photon correlation spectroscopy*, PCS) e a avaliação do potencial Zeta foi realizada através de mobilidade eletroforética, ambas a temperatura de 25°C utilizando o equipamento Zetasizer ZS (Malvern Instruments, Reino Unido). O tamanho de partícula e o índice de polidispersão foram determinados com amostras diluídas (500 vezes) com água Milli Q. A análise do potencial zeta foi realizada após diluição das amostras (500 vezes) com solução de NaCl 10 mM.

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

$$Span = \frac{d_{90\%} - d_{10\%}}{d_{50\%}} \quad \text{Eq.(1)}$$

Além destas análises, a avaliação reológica das formulações foi realizada em viscosímetro Brookfield, modelo LVDV II + Pro utilizando o spindle ULA (Brookfield, EUA). Os valores de pH das suspensões foram determinados em potenciômetro B474 (Micronal, Brasil).

Validação do método analítico para quantificação de dapsona

Para a quantificação da dapsona presente na formulação selecionada foi utilizada cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando equipamento Perkin-Elmer Série 200 (Perkin-Elmer Instruments, EUA), equipado com detector UV e coluna LiChrospher® RP-18 (5 µm, 250x3mm, Merk, Alemanha) em comprimento de onda de 260 nm. A fase móvel foi composta de acetonitrila:água (75:25) acidificada com ácido acético glacial 1,5% v/v, em sistema isocrático a um fluxo de 0,7 mL/min. O método para quantificação da dapsona foi validado em termos de especificidade, linearidade, repetibilidade, precisão intermediária e exatidão (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

Determinação da eficiência de encapsulação

A eficiência de encapsulação da dapsona nas teosferas foi determinada pelo método de ultrafiltração-centrifugação (Amicon Ultrafree CL, 10.000 MW, Millipore, Japão). A porcentagem da dapsona encapsulada foi calculada pela diferença entre a concentração total na formulação (medida após a desestruturação das partículas em acetonitrila) e a concentração livre de dapsona presente na fase aquosa (determinada no ultrafiltrado da suspensão de teosferas) dividida pela concentração total multiplicada por 100. A quantificação da dapsona total e presente na fase aquosa externa foi realizada pela metodologia validada por CLAE.

Estudo de liberação *in vitro*

O estudo de liberação *in vitro* da dapsona foi realizado pelo método de diálise. Oito mililitros da formulação de teosferas contendo dapsona e o mesmo volume da dapsona na forma livre (solução aquosa de propilenoglicol 50%, v/v) foram colocados em sacos de diálise (12.000-14.000 Da) (Sigma, EUA). As membranas de diálise foram incubadas em 150 mL de meio de liberação constituído de solução aquosa de polissorbato 20 a 2% (p/v)

a 32°C com contínua agitação. Alíquotas (2 mL) do meio de liberação foram coletadas nos intervalos de tempo de 0,5; 1; 2; 3; 4; 6; 8; 10 e 12h. O meio de liberação foi repostado a cada coleta. A quantidade de dapsona liberada foi avaliada por metodologia previamente validada por CLAE.

Microscopia de força atômica

As teosferas foram avaliadas por microscopia de força atômica (Microscópio MFP-3D AFM, Asylum Research, EUA) no Instituto de Biofísica Carlos Chagas da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Para tanto, a suspensão de teosferas foi diluída em água na proporção de 1:200 e posteriormente depositada sobre mica clivada, sendo lavada com 10µL de água MilliQ® anteriormente à análise.

A lâmina contendo a amostra foi colocada no scanner XY do microscópio e a câmera CCD foi usada para localizar as partículas. As imagens foram adquiridas no modo água/contato. Para as imagens de contato foi utilizado o cantilever modelo NPS D4 (Veeco Probes, Camarillo, CA). A constante de força usada foi de 0.08 N/m e as amostras foram scaneadas com uma frequência constante de 0.6 Hz com o intuito de reduzir os interferentes e minimizar os danos na imagem. As imagens foram obtidas com 512 x 512 pixels de resolução e processadas no programa IGOR-PRO. Para melhor visualização da topografia, as imagens foram dispostas em 3D.

Avaliação da elasticidade das teosferas

A elasticidade da formulação selecionada contendo dapsona foi avaliada através da construção das curvas de força. A imagem de modulação de força é uma técnica da Microscopia de Força Atômica que identifica e mapeia diferenças qualitativas na rigidez ou na elasticidade de superfícies. Esta técnica estuda várias propriedades de superfície com a finalidade de distinguir materiais ou características mecânicas que compõem as

superfícies heterogêneas. Através desta técnica podemos extrair grandezas físicas tais como elasticidade, adesão e viscosidade. O cantilever permite a realização de ciclos de aproximação-retração em que a força de contato máxima, tempo de interação e as taxas de retração podem ser controlados de forma independente. A força máxima foi limitada a aproximadamente 3nN, o tempo de interação foi definido para zero e a taxa de retração foi definida em 7500 nm/s.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Teosferas sem fármaco, constituídas de manteiga de Cupuaçu misturadas ou não ao óleo de castanha do Brasil foram preparadas utilizando diferentes sistemas tensoativos (Tabela I). A Figura 2 mostra o tamanho médio das partículas e o índice de polidispersão (PDI) obtidos pelo método de PCS.

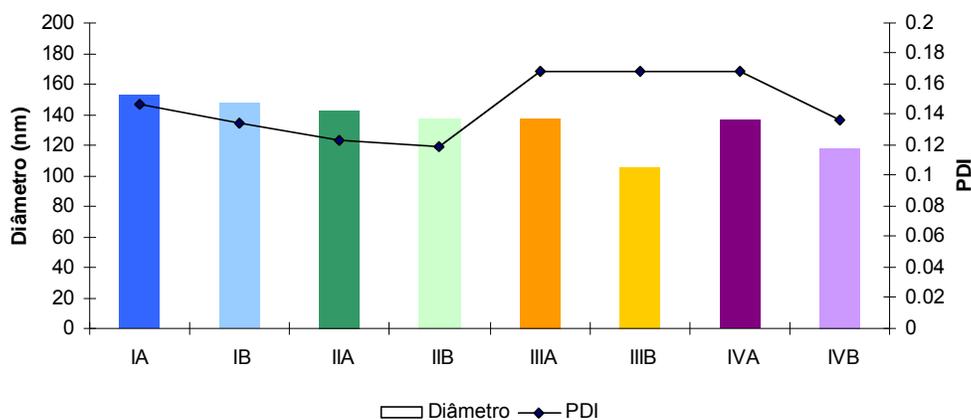


FIGURA 2 – Tamanho médio das partículas e índice de polidispersão (PDI)

As formulações de teosferas IA, IB, IIA, IIB, IIIA, IIIB, IVA e IVB, apresentaram tamanho médio de partícula de 152,8; 148,1; 142,5; 137,2; 137,2; 105,4; 135,9; 117,5; respectivamente. Formulações preparadas utilizando manteiga de cupuaçu com principal componente lipídico (grupo A) não apresentaram diferença em termos de diâmetro médio, independente do sistema tensoativo utilizado. Contudo, as formulações constituídas por

manteiga de cupuaçu e óleo de castanha do Brasil (grupo B) apresentaram menor diâmetro médio com a utilização dos sistemas tensoativos lecitina/polissorbato 80 e óleo de mamona etoxilado/polissorbato 80 (formulações IIIB e IVB, respectivamente). Este resultado pode representar a maior efetividade dos sistemas tensoativos III e IV em obter diâmetros de partícula reduzidos. Esta efetividade foi mais claramente demonstrada nas formulações contendo óleo, que possuem uma matriz lipídica menos cristalina devido à presença do lipídeo líquido (Müller *et al.*, 2002). Para todas formulações preparadas neste estudo, os valores de PDI apresentaram-se inferiores a 0,2, indicando uma estreita distribuição de tamanho.

A técnica de difratometria de laser foi empregada para avaliar a possível presença de micropartículas nas formulações de teosferas (Tabela II), já que o método de PCS é limitado para detectar partículas micrométricas. Os resultados obtidos (Tabela II) indicam que o diâmetro de partícula correspondente a 90% da distribuição acumulada não excedeu 248 nm e nenhuma partícula de tamanho micrométrico foi encontrada, considerando todas as formulações preparadas. Os valores de Span, que avalia a distribuição granulométrica, indicam uma estreita distribuição de tamanho, uma vez que quanto menor os valores de Span, mais estreita é a distribuição (Teeranachaideekul *et al.*, 2007). Além disso, valores de $d_{4,3}$, que representam o diâmetro médio em volume, foram similares aos obtidos por PCS

TABELA II - Granulometria das teosferas

Teosferas	d 10% ^a	d 50% ^b	d 90% ^c	d 4,3 ^d	Span ^e
IA	0,066	0,129	0,248	0,149	1,423
IB	0,063	0,119	0,213	0,129	1,260
IIA	0,068	0,124	0,217	0,136	1,208
IIB	0,074	0,127	0,211	0,136	1,074
IIIA	0,071	0,128	0,223	0,142	1,187
IIIB	0,076	0,113	0,169	0,118	0,830
IVA	0,064	0,124	0,238	0,135	1,402
IVB	0,076	0,122	0,195	0,130	0,975

^adiâmetro de partícula correspondente a 10% da distribuição acumulada; ^bdiâmetro de partícula correspondente a 50% da distribuição acumulada; ^cdiâmetro de partícula correspondente a 90% da distribuição acumulada; ^ddiâmetro médio em volume; ^edispersão granulométrica.

O potencial zeta é o potencial elétrico no plano de cisalhamento e sua análise pode prever a estabilidade física de sistemas coloidais. De acordo com a literatura, valores de potencial zeta em torno de -30mV demonstram uma boa estabilidade física do sistema coloidal durante a estocagem, sendo este valor considerado ótimo quando atinge valores próximos a -60 mV (Chen *et al.*, 2006; Teeranachaideekul *et al.*, 2007). Neste estudo, as teosferas pertencentes ao grupo I apresentaram valores de potencial zeta elevados, sendo os maiores registrados (Tabela III). Estes valores eram esperados para estes sistemas e são atribuídos à presença de lecitina que se encontra provavelmente recobrando as partículas (Mosqueira *et al.*, 2001). Comportamento semelhante foi observado para as formulações do grupo III, também constituídas por lecitina, no entanto para este grupo foram observados valores um pouco menores ao grupo anterior, o que se deve provavelmente à presença adicional do polissorbato 80, tensoativo não-iônico (Morais, 2008) que atua por estabilização estérica e provoca uma redução no potencial atribuído à presença de lecitina. Esta redução poderia ser esperada também para as formulações do grupo I, uma vez que a presença de poloxamer 188 como estabilizador estérico pode reduzir o potencial zeta devido a modificações no plano de cisalhamento na

superfície das partículas. Assim mesmo, teosferas do grupo I apresentaram potencial zeta bastante elevado, de modo semelhante ao observado em outros estudo (CHEN *et al.*, 2006; Colomé *et al.*, 2010) utilizando os mesmo tensoativos – lecitina e poloxamer 188.

TABELA III. Características físico-químicas das formulações

Formulações	pH	Viscosidade (cP)	Potencial Zeta (mV)
IA	5,69	3,0	-50,4
IB	5,72	3,1	-59,5
IIA	5,64	2,1	-17,3
IIB	5,66	2,0	-38,7
IIIA	5,64	2,1	-42,2
IIIB	5,20	2,1	-29,4
IVA	5,91	2,2	-9,15
IVB	5,95	2,1	-3,79

Na formulação IIB temos na constituição dois tensoativos não-iônicos (monooleato de sorbitano e polissorbato), mas mesmo assim obtivemos um potencial zeta elevado nessa formulação, o que pode ser explicado considerando a possibilidade de formação de pontes de hidrogênio entre os grupos etóxi da cadeia polietilênica, com subsequente formação de grupos oxônio e interações dipolo-dipolo. Assim, valores negativos de potencial zeta podem ser produzidos em sistemas dispersos obtidos a partir de misturas de tensoativos não-iônicos. Outro aspecto relevante para a análise dos valores de potencial zeta para formulações obtidas a partir de tensoativos não-iônicos é que em altas concentrações, as moléculas de tensoativo na interface podem se rearranjar e proteger os grupos éter-oxigênio possivelmente formados, diminuindo os valores de potencial zeta observados (Morais, 2008)

Por outro lado, a associação dos tensoativos não-iônicos óleo de mamona etoxilado e polissorbato 80 resultou em formulações com baixo valor de potencial zeta. Como já comentado, nestes sistemas a estabilização das partículas em suspensão pode se dar por estabilização estérica.

De um modo geral, a inserção do óleo de castanha provoca alteração no valor de potencial zeta quando comparado com a formulação preparada com manteiga de cupuaçu como componente lipídico principal. Essa alteração foi mais evidente nas formulações do grupo II, contendo monooleato de sorbitano e polissorbitato 80. Pode-se perceber ainda que os diferentes sistemas tensoativos utilizados nas formulações influenciaram os valores de potencial zeta obtidos. O emprego de lecitina e monooleato de sorbitano resultaram em formulações com potencial zeta mais elevado, o que sugere que teosferas contendo esses tensoativos apresentem adequada estabilidade durante períodos de armazenamento.

A partir da caracterização reológica das teosferas observou-se que todas as formulações apresentam comportamento Newtoniano (dados não apresentados). As viscosidades das amostras foram avaliadas (Tabela III) e não foi verificada diferença entre os valores obtidos para as diferentes formulações. Os valores variaram de 2,0 a 3,1 cP. Quanto ao pH (Tabela III), as suspensões apresentaram valores que variaram entre 5,2 e 5,9, os quais são considerados adequados para aplicação tópica cutânea (Santos, 2006).

Levando-se em conta as características físico-químicas das teosferas preparadas, observa-se que todas as formulações apresentaram tamanho nanométrico (inferior a 200 nm) e adequada distribuição de tamanho. Os valores de pH e viscosidades também apresentaram-se bastante semelhantes para as diferentes formulações. Os valores de potencial zeta apresentaram-se variados de acordo com o sistema tensoativo utilizado. Assim, este foi o parâmetro determinante para a escolha da formulação a ser utilizada para a incorporação de dapsona. Considerando que os valores com potencial zeta mais elevados foram obtidos com a utilização de lecitina ou monooleato de sorbitano, as formulações dos grupos I, II e III foram pré-selecionadas. Dentre estas, aquelas contendo óleo (formulações IB, IIB e IIIB) apresentam sabidamente probabilidade de maior

encapsulação do fármaco, devido à presença de espaços amorfos na matriz lipídica (Müller *et al.*, 2002). Por fim, a formulação IIB demonstrou a melhor reprodutibilidade nas análises de potencial zeta, provavelmente por apresentar uma população unimodal (Figura 3), sendo então selecionada para a continuidade do trabalho.

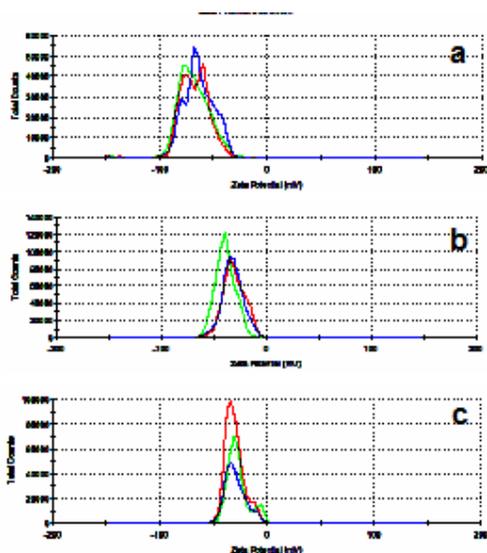


FIGURA 3 - Gráfico do potencial zeta das formulações IB (a), IIB (b) e IIBB (c). Diferentes cores nos gráficos representam replicatas de análise.

A formulação II B foi então utilizada para a incorporação do fármaco modelo (dapsona), visando avaliar o perfil de liberação do fármaco, bem como analisar a eficiência de encapsulação das teosferas e sua elasticidade. A caracterização físico-química dessa formulação demonstrou valores semelhantes aos já apresentados para as partículas sem o fármaco considerando características como pH, viscosidade e tamanho de partícula (Tabela IV). Contudo, a incorporação de dapsona provocou redução do potencial zeta (-38,7 para -16,9 mV), o que pode ser devido à ionização de grupamentos de moléculas do fármaco localizadas na superfície das partículas.

TABELA IV - Características físico-químicas das teosferas contendo dapsona

	pH	Viscosidade (cP)	Potencial zeta (mV)	Tamanho de partícula (nm)
Teosferas de dapsona	5,8	2,1	- 16,9	145,8

Visando confiabilidade na quantificação de dapsona, o método analítico foi validado em termos de especificidade, linearidade (5 a 25 µg/mL, $r^2 = 0,9965$, equação da reta $y = 94361x + 125831$), repetibilidade (DPR= 4,4%), precisão intermediária (DPR=3,3%) e exatidão (recuperação = 108, 7%). A eficiência de encapsulação da dapsona nas teosferas foi de 91,4%. Em geral, fármacos lipofílicos possuem compatibilidade adequada com lipídeos e geralmente são selecionados para incorporação dentro de nanopartículas lipídicas com o intuito de aumentar a eficiência de encapsulação (Esposito et al., 2008).

Os valores obtidos para as curvas de força das teosferas contendo dapsona foram em torno de 2 MPa, embora a variação tenha se dado entre 0,5 e 7MPa. O gráfico abaixo demonstra a elasticidade de uma teosfera. O baixo valor encontrado para o módulo de elasticidade para o vidro (7 MPa), quando comparado aos valores conhecidos, que giram em torno de 50GPa, sugerem a presença de material macio – as teosferas - depositado na superfície da lâmina durante a preparação da amostra.

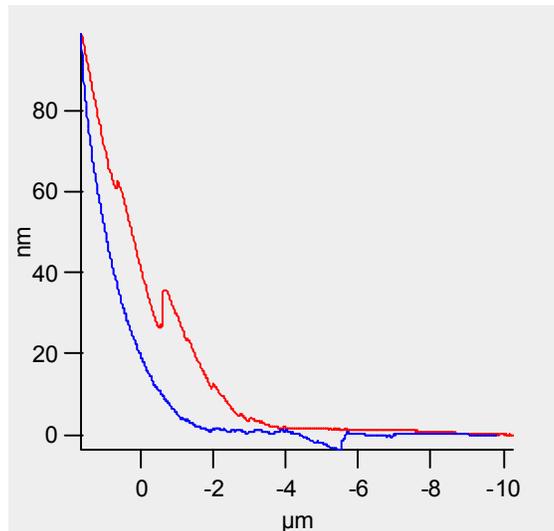


Figura 4 – Curvas de força da teosfera IIB contendo dapsona

Numa curva de força a deflexão é proporcional à força que a sonda aplica na amostra. Assim, a diferença entre a curva obtida sobre o substrato duro e aquela obtida sobre uma região macia, corresponde a indentação nessa região. A indentação elástica da partícula resulta em uma curva de força não linear, considerando o indutor (sonda), infinitamente mais rígido que a amostra (a sonda de nitreto de silício possui módulo elástico em torno de 150GPa). A análise das curvas mostradas na Figura 4 revela que a indentação produzida na teosfera é de natureza elástica. Isso se deve ao fato de que a curva de retração é bastante semelhante a de aproximação, o que indica que a superfície da partícula volta à sua forma original após o término do contato com a sonda.

A imagem de modulação de força é uma técnica da Microscopia de Força Atômica que identifica e mapeia diferenças qualitativas na rigidez ou na elasticidade de superfícies, sendo uma entre as diversas técnicas desenvolvidas como extensões da microscopia de força atômica. Esta técnica estuda várias propriedades de superfície com a finalidade de distinguir materiais ou características mecânicas que compõem as superfícies heterogêneas.

Observando a primeira imagem (Figura 5) é possível visualizar uma dispersão de partículas de tamanhos variados, com prevalência de partículas de tamanhos reduzidos o que confirma as análises realizadas pelas diversas técnicas anteriormente descritas para determinação de diâmetro. A Figura 6 mostra uma partícula única, sendo uma imagem de fase (Figura 6a) e uma imagem em 3D (Figura 6b), ambas evidenciando o formato esférico das teosferas de dapsona.

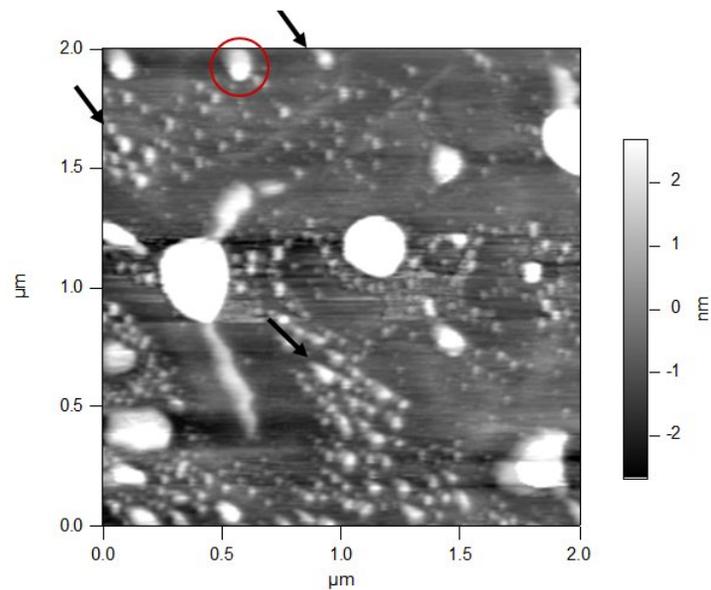
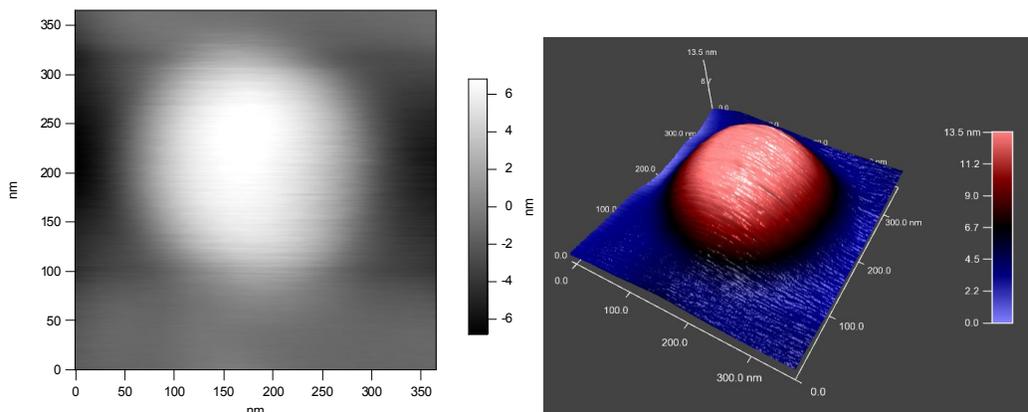


Figura 5 - Imagem das teosferas contendo dapsona, seca em vácuo. As setas indicam as partículas com tamanho semelhante aos encontrados nas outras análises. O círculo indica a área onde foi realizada imagem com maior aproximação (demonstrado na figura subsequente).



(a)

(b)

Figuras 6 – Imagem da teosfera contendo dapsona (a) e imagem em 3D da mesma partícula (b).

A liberação de um ativo a partir de um colóide é um processo bastante complexo, que pode ser afetado por diversos fatores, a exemplo de degradação da matriz do colóide, cristalinidade do fármaco, afinidade entre o fármaco e a matriz coloidal, entre outros fatores (Wu *et al.*, 2009). Devido à característica lipofílica da dapsona, este fármaco apresenta elevada afinidade pela matriz lipídica, o que é corroborado pelo valor obtido para a eficiência de encapsulação. Assim, o aprisionamento da dapsona na matriz lipídica pode explicar a menor taxa de liberação da dapsona contida nas teosferas ($52,7 \pm 1,6$ % em 12 h) quando comparada à dapsona livre ($103,1 \pm 1,9$, no mesmo período) (Figura 8). Essa característica pode ser vantajosa para a aplicação pretendida, uma vez que além de atuar como uma barreira de permeação, a camada córnea é também um reservatório de substâncias aplicadas topicamente, especialmente quando veiculadas em carreadores de fármacos (Schafer-Korting *et al.*, 2007).

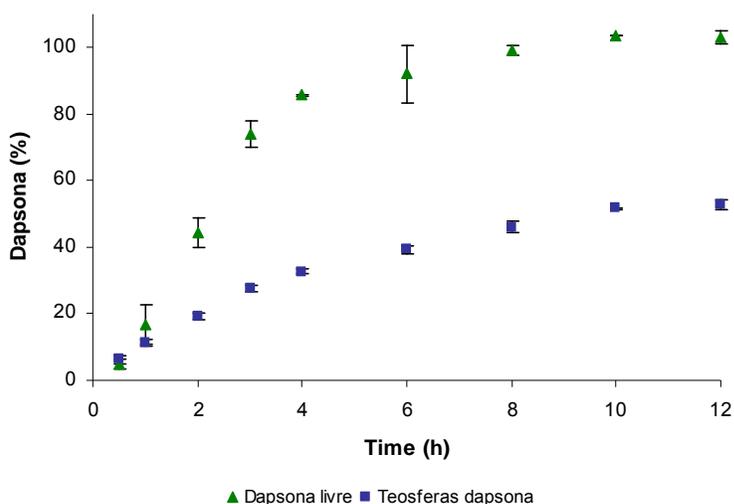


FIGURA 8 - Perfil de liberação da dapsona livre e encapsulada nas teosferas

CONCLUSÃO

Teosferas de tamanhos nanométricos foram preparadas com diferentes pares de tensoativos. Dentre as formulações desenvolvidas, aquela contendo o par de tensoativos monooleato de sorbitano e polissorbato 80 se mostrou mais adequada para incorporação do fármaco modelo. A dapsona foi incorporada com alta eficiência de encapsulação mantendo tamanho de partícula inicial. As teosferas contendo dapsona apresentaram características elásticas através de análise de microscopia de força atômica e apresentaram uma liberação sustentada quando comparadas ao fármaco livre. Estes sistemas representam uma alternativa às formulações já existentes de dapsona para o uso tópico em doenças dermatológicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AYER, J.; BURROWS, N. Acne: more than skin deep. *Postgraduate Medical Journal*, v. 82, p. 500-506, 2006

BRASIL. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. *Agência Nacional de Vigilância Sanitária*, RE 899 de 29 de maio de 2003

CESTARI SCP, AZULAY DR, AZULAY RD. Eczemas e Dermatites afins. In: Azulay DR, Azulay RD, eds. *Dermatologia Azulay & Azulay*, 3a edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

CHEN, H. B. *et al.* Podophyllotoxin-loaded solid lipid nanoparticles for epidermal targeting. *Journal of Controlled Release* [S.l.], v. 110, n. 2, p. 296-306, Jan 2006

COHEN, J. B. Cutaneous involvement of dermatomyositis can respond to dapsona

therapy. *Int. Jour. Dermatol.* 41: 184-184, 2002

COLEMAN, M. D. Dapsone: modes of action toxicity and possible strategies for increasing patient tolerance. *Br. J. Dermatol.* V. 129, p. 507-13, 1993.

COLOMÉ, L. M. *et al.* Theosphere Based on Theobroma Grandiflorum Seed Butter: Development of Innovative Nanoparticles for Skin Application. *Soft materials*, *in press*

DRAELOS, Z. D.; CARTER, E.; MALONEY, M.; ELEWSKI, B.; POULIN, Y.; LYNDE, C.; GARRETT, S.; Two randomized studies demonstrate the efficacy and safety of dapsone gel, 5% for the treatment of *acne vulgaris*, *J. Am. Acad. Dermatol.*; 439 e1 – 439 e9, 2007.

ESPOSITO, E. *et al.* Solid lipid nanoparticles as delivery systems for bromocriptine. *Pharmaceutical Research* [S.I.], v. 25, n. 7, p. 1521-1530, Jul 2008

FOSS NT. Immunological aspects of leprosy. **Medicina, Ribeirão Preto**, 30: 335-339, july/sept. 1997

GONÇALVES, J.F. *et al.* Primary metabolism components of seeds from Brazilian Amazon tree species. *Brazilian Journal of Plant Physiology.* V. 14, n.2, p. 139-142, 2002

GOODMAN & GILMAN; as bases farmacológicas da terapêutica 11 ed, 2003

HABIF TP. Connective tissue diseases. In. *Clinical dermatology: a color guide to diagnosis and therapy.* 2nd ed. St Louis: C. V. Mosby, 1990. p.422-52

HELTON D. R. *et al.* Pharmacokinetic Profiles in Rats After Intravenous, Oral, or Dermal Administration of Dapsone. *Drug Metabolism & Disposition.* V. 28, n. 8, p. 925-929, 2000

INOVAM. Technical publication. N. 1, p. 1-5, 2009

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION (ICH). Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1). *International Conference on Harmonization*, 2005

JOSHI, A. *et al.* Modification of lecithin by physical, chemical and enzymatic methods. *European Journal of Lipid Science and Technology* [S.l.], v. 108, n. 4, p. 363-373, Apr 2006

KRAKOWSKI, A.C.; STENDARDO, S.; EICHENFIELD, L.F. Practical considerations in acne treatment and the clinical impact of topical combination therapy. *Pediatric Dermatology*, v. 25, suppl. 1, p. 1-14, 2008.

LEYDEN, J.J. Topical treatment of acne vulgaris: Retinoids and cutaneous irritation. *Journal of American Academy of Dermatology*, v. 38, p. S1-4, 1998.

Lio e Kaye. Topical Antibacterial Agents. *Infectious Disease Clinics of North America*. V. 23, n. 4, p. 945, 2009

MAGRO CM, CROWSON AN, HARRIST TJ. The use of anti body to C5b-9 in the subclassification of lupus erythematosus. *Br J Dermatol*. 1996;134:855-62.

MORAIS, J. M. (2008) Desenvolvimento e avaliação do processo de obtenção de emulsões múltiplas A/O/A em etapa única à base de óleo de canola e tensoativo não iônico derivado do óleo de rícino. Ribeirão Preto, 2008.

MORAR N, WILLIS-OWEN SA, MOFFATT MF, COOKSON WO. The genetics of atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2006 Jul;118(1):24-34.

MOSQUEIRA, V. C. F. *et al.* Relationship between complement activation, cellular uptake and surface physicochemical aspects of novel PEG-modified nanocapsules. *Biomaterials*

[S.I], v. 22, n. 22, p. 2967-2979, 2001

MULLER, R. H. *et al.* Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. 2002. p.S131-S155

ROGEZ, H.; LE BRUXANT, R.; MIGNOLET, E.; SOUSA, J.N.S.; SILVA, E.M.; LARONDELLE, Y. (2004) Chemical composition of the pulp of three typical Amazonian fruits: araçá-boi (*Eugenia stipitata*), bacuri (*Platonia insignis*) and cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*). *Eur. Food Res. Technol.* 218:380-384

SANTOS, O. D. H. Desenvolvimento e avaliação das propriedades físico- químicas e atividade cosmética in vivo de emulsões com óleo de *Calendula officinalis* apresentando cristais líquidos. 2006. 113 f. Dissertação (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

SCHAFER-KORTING, M.; MEHNERT, W.; KORTING, H. (2007) Lipid nanoparticles for improved topical application of drugs for skin diseases. *Adv. Drug Del. Rev.* 59: 427-443

SONTHEIMER RD, THOMAS JR, GILLIAM JN. Subcutaneous Lupus Erythematosus - A cutaneous marker for a distinct lupus subset. *Arch Dermatol.* 1997; 115:1409-15

SONTHEIMER RD. Clinical manifestations of cutaneous lupus erythematosus. In: Wallace DJ, Hahn BH. *Dubois' lupus erythematosus*. Pennsylvania: Lea & Febiger; 1993. p.285-301.

SPERGEL JM, PALLER AS. Atopic dermatitis and the atopic march. *J Allergy Clin Immunol.* 2003;112(6 Suppl):S118-127.

SPRIKKELMAN AB, TUPKER RA, BURGERHOF H, SCHOUTEN JP, BRAND PL, HEYMANS HS, VANAALDEREN WM. Severity scoring of atopic dermatitis: a comparison

of three scoring systems. *Allergy*. 1997 Sep;52(9):944-9.

TAN EM, COHEN A, FRIES JF, MASI, AT, MCSHANE DJ, ROTHFIELD NF, et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 1982;25:1271-7.

TEERANACHAIDEEKUL, V. *et al.* Cetyl palmitate-based NLC for topical delivery of Coenzyme Q(10)- Development, physicochemical characterization and in vitro release studies. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* [S.I.], v. 67, n. 1, p. 141-148, Aug 2007

WILLIAMS HC. Clinical practice. Atopic dermatitis. *N Engl J Med*. 2005 Jun 2;352(22):2314-24.

Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema: ISAAC. The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Steering Committee. *Lancet*. 1998;351(9111):1225-1232.

WOZEL, G. V. E. Innovative Use of Dapsone, *Dermatol Clin* 28 (2010) 599–610.

Wu, Y. *et al.* Polymeric micelle composed of PLA and chitosan as a drug carrier. *Journal of Polymeric Research* [S.I.], v. 16, n. 1, p. 11-18, Jan 2009

YANG, H.; PROTIVA, P.; CUI, B.; MA, C.; BAGGETT, S.; HEQUET, V.; MORI, S.; WEINSTEIN, B.; KENNEL, E.J. (2003) New Bioactive Polyphenols from *Theobroma grandiflorum* ("Cupuaçu"). *J. Nat. Prod.* 66:1501-1504

YATES, V. Acne: current treatment. *Clinical Medicine*, v. 5, p. 569-572, 2005

YOSIPOVITCH, G.; TANG, M.; DAWN A.G.; CHEN, M.; GOH C.L.; CHAN, Y.H.; SENG, L.F. Study of psychological stress, sebum production and *acne vulgaris* in adolescents. *Acta dermato-venereologica*, v. 87, p. 135-139, 2007.

ANEXO

Normas para Publicação de Artigos na Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences:

ESTRUTURA

Cabeçalho: constituído por: Título do trabalho, que deve ser breve e indicativo da exata finalidade do trabalho; Autor(es) por extenso, indicando a(s) instituição(ões) a(s) qual(is) pertence(m) mediante números. O autor para correspondência deve ser identificado com asterisco, fornecendo o endereço completo, incluindo o eletrônico. Estas informações devem constar na margem esquerda do texto e logo após a filiação.

Resumo: deve apresentar a condensação do conteúdo, expondo metodologia, resultados e conclusões, não excedendo 200 palavras.

Unitermos: devem representar o conteúdo do artigo, evitando-se os de natureza genérica. Observar o limite máximo de 6(seis) unitermos.

Resumo em português: deve ser apresentado junto ao resumo em inglês e ser antecedido do título do artigo em português. O conteúdo deve acompanhar o resumo em inglês.

Unitermos em português: devem acompanhar os unitermos em inglês e estar abaixo do Resumo.

Introdução: deve estabelecer com clareza o objetivo do trabalho e sua

relação com outros trabalhos no mesmo campo. Extensas revisões de literatura devem ser substituídas por referências aos trabalhos bibliográficos mais recentes, nos quais tais revisões tenham sido apresentadas.

Material e Métodos: a descrição dos métodos usados deve ser breve, porém suficientemente clara para possibilitar a perfeita compreensão e repetição do trabalho. Processos e Técnicas já publicados, a menos que tenham sido extensamente modificados, devem ser apenas referidos por citação. Estudos em humanos e em animais devem, obrigatoriamente, fazer referência à aprovação do Comitê de Ética correspondente.

Resultados e Discussão: deverão ser apresentados de forma concisa e em ordem lógica. Tabelas ou figuras, quando possível, devem substituir o texto, na apresentação dos dados. Sempre que pertinente, fornecer as faixas, desvios padrão e indicar as significâncias das diferenças entre os valores numéricos obtidos. A discussão deve se restringir ao significado dos dados obtidos e resultados alcançados, procurando, sempre que possível, relacionar sua significância em relação a trabalhos anteriores da área. Especulações que não encontram justificativa para os dados obtidos devem ser evitadas. É facultativa a apresentação desses itens em separado.

Conclusões: quando pertinentes, devem ser fundamentadas no texto.

Agradecimentos: devem constar de parágrafo à parte, antecedendo as referências bibliográficas, e ser compatíveis com as exigências de

cortesia e divulgação.

Referências bibliográficas: devem ser organizadas de acordo com as normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas - ABNT NBR-6023, ordenadas alfabeticamente no fim do artigo incluindo os nomes de todos os autores. **A exatidão das referências bibliográficas é de responsabilidade dos autores. Para exemplos, consultar o site www.bcq.usp.br.**

APRESENTAÇÃO DOS ORIGINAIS

Os trabalhos devem ser apresentados em lauda padrão (de 30 a 36 linhas com espaço 1,5), utilizando o programa Word for Windows. Os trabalhos, acompanhados de carta de encaminhamento assinada por todos os autores, devem ser enviados, apenas por via eletrônica.

Informações Adicionais:

Citação bibliográfica: As citações bibliográficas devem ser apresentadas no texto pelo(s) nome(s) do(s) autor(es), com apenas a inicial em maiúsculo, seguidas do ano de publicação. No caso de haver mais de três autores, citar o primeiro e acrescentar a expressão et al. Caso haja mais de uma citação com mesmos autores e mesmo ano de publicação, diferencia-las com letras minúsculas junto ao ano.

Ilustrações: As ilustrações (gráficos, tabelas, fórmulas químicas, equações, mapas, figuras, fotografias) devem ser incluídas no texto, o mais próximo possível das respectivas citações. Mapas, figuras e fotografias devem ser, também, apresentados em arquivos separados e

digitalizadas em formato TIF ou JPG com resolução de 300 dpi. **Cada fascículo da BJPS reproduzirá, na capa, figura escolhida de um dos trabalhos.** As tabelas devem ser numeradas consecutivamente em algarismos romanos e as figuras em algarismos arábicos, seguidos do título. As palavras TABELA e FIGURA devem aparecer em maiúsculas apenas no título ou na legenda, respectivamente. Legendas e títulos devem acompanhá-las nos arquivos separados, assim como no texto.

Nomenclatura: pesos, medidas, nomes de plantas, animais e substâncias químicas devem estar de acordo com as regras internacionais de nomenclatura. A grafia dos nomes de fármacos deve seguir, no caso de artigos nacionais, as Denominações Comuns Brasileiras (DCB) em vigor, podendo ser mencionados uma vez (entre parênteses, com inicial maiúscula) os registrados.