

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Nanocápsulas de Núcleo Lipídico: Estudos de penetração cutânea e proposição de estratégias para a avaliação da liberação *in vitro*

DIEGO FONTANA DE ANDRADE

PORTO ALEGRE, 2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Nanocápsulas de Núcleo Lipídico: Estudos de penetração cutânea e proposição de estratégias para a avaliação da liberação *in vitro*

Dissertação apresentada por **Diego Fontana de Andrade** para obtenção do GRAU DE MESTRE em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. Ruy Carlos Ruver Beck

Porto Alegre, 2013

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 08.11.2013, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dr. Andréa Inês Horn Adams
Universidade Federal de Santa Maria

Profa. Dr. Irene Cledes Külkamp Guerreiro
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Pedro Eduardo Fröhlich
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Andrade, Diego Fontana de
Nanocápsulas de Núcleo Lipídico: Estudos de
penetração cutânea e proposição de estratégias para a
avaliação da liberação in vitro / Diego Fontana de
Andrade. -- 2013.
156 f.

Orientador: Ruy Carlos Ruver Beck.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa
de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto
Alegre, BR-RS, 2013.

1. Nanocápsulas de núcleo lipídico. 2. Estratégias
para avaliação da liberação in vitro de fármacos. 3.
Propionato de clobetasol. 4. Permeação e penetração
cutânea. 5. Células de difusão de Franz. I. Beck, Ruy
Carlos Ruver, orient. II. Título.

Este trabalho foi realizado no laboratório 405, do Departamento de Produção e Controle de Medicamentos, da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, na cidade de Porto Alegre, com financiamento da CAPES, CNPq e FAPERGS. O autor recebeu bolsa de estudos da CAPES.

Aos meus pais, **Giselda e Elemar Andrade**, que ensinaram todos os valores que definem meus princípios, propósitos e objetivos.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao professor **Dr. Ruy Carlos Ruver Beck**, pela oportunidade de integrar seu grupo de pesquisa. Pela receptividade para a realização do estágio final da graduação. Pelos ensinamentos científicos, profissionais e humanos. Pelo apoio incondicional, pelo exemplo de pesquisador correto, ético e competente. Agradeço a confiança na realização deste projeto e dos próximos que virão. Muito obrigado!

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e pela saúde para buscar meus objetivos.

Ao professor Ruy Carlos Ruver Beck, pela orientação e pela dedicação na construção deste trabalho.

Às professoras Sílvia Stanisçuaski Guterres e Adriana Raffin Pohlmann, pelas oportunidades concedidas, pelo incentivo, pelas contribuições no meu amadurecimento científico e no desenvolvimento profissional.

À Universidade Federal de Santa Maria, todos os funcionários e professores que direta ou indiretamente contribuíram para a minha formação como profissional farmacêutico.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade.

À CAPES, órgão financiador da bolsa de pesquisa, ao CNPq e FAPERGS pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho.

Aos colegas dos laboratórios 405, da Faculdade de Farmácia, e K204 do Instituto de Química, pelas contribuições, ensinamentos e companheirismo.

Às colegas Márcia Camponogara Fontana e Carine Zuglianelo, pela colaboração direta na construção dos estudos apresentados nesta dissertação.

À professora Letícia Cruz, pelo apoio e encorajamento de realizar a Pós-Graduação na Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Aos meus pais, Giselda e Elemar Andrade, pelo amor, suporte, apoio e incentivo.

À minha irmã amada, Sabrina Fontana de Andrade, pelo exemplo e cumplicidade.

À minha sobrinha, Laura Andrade de Lima, pela inspiração para a construção de um mundo melhor.

Às minhas irmãs de coração, Aline Palma, Claudia Romero e Luiza Lena, pela amizade, pelo suporte emocional, pelas experiências que já compartilhamos.

Ao Ricardo Citolin, pelo apoio em todos os momentos, pela cumplicidade e companheirismo.

Ao amigo de longa data, Fernando Freitas, pelo incentivo e amizade.

À minha vó, Maria Regina, a todos os familiares, especialmente ao primo Bruno Fontana, às tias Anilza, Gilsonea, Carolina, Jurema e ao tio Amadeo.

RESUMO

Neste trabalho foi avaliada a permeação/penetração cutânea *in vitro* (pele suína) de propionato de clobetasol nanoencapsulado incorporado em um semissólido, empregando células de difusão de Franz. A nanoencapsulação foi capaz de reduzir a quantidade de fármaco que penetra nas camadas da pele (estrato córneo, epiderme e derme) sem alterar a forma (distribuição percentual) como o propionato de clobetasol se distribui. A adequabilidade de diferentes membranas sintéticas (acetato de celulose, policarbonato e membrana de diálise) para a avaliação da liberação *in vitro*, empregando células de difusão de Franz, a partir desta formulação foi também estudada. A partir da combinação de diferentes técnicas analíticas (espalhamento de luz dinâmica, microscopias eletrônicas de transmissão e varredura) foi observado que a membrana de menor tamanho de poro (membrana de diálise, 12 kDa de cut off) é a mais adequada para a condução deste tipo de avaliação, pois é a única capaz de evitar a passagem de nanocápsulas íntegras da formulação para o meio receptor das células de difusão, em detrimento das membranas de policarbonato e acetato de celulose (0,05 μm e 0,45 μm de tamanho de poro, respectivamente). Além disso, uma nova estratégia para a avaliação da liberação *in vitro* de fármacos associados a nanocápsulas de núcleo lipídico, combinando fluxo contínuo de meio de liberação e sacos de diálise foi proposta neste trabalho. A técnica mostrou-se adequada para a obtenção do perfil de liberação *in vitro* a partir de suspensões de nanocápsulas contendo diferentes fármacos modelo (prednisolona e propionato de clobetasol), possibilitando a diferenciação destes sistemas de soluções contendo os fármacos livres, graficamente e pelos valores de fluxo calculados. Adicionalmente, esta estratégia mostrou-se apropriada para a manutenção da concentração de fármaco no meio de liberação afastada da saturação, contribuindo para o atendimento da condição *sink*. Ainda, classificamos o sistema como um protótipo semi-automatizado para a avaliação da liberação *in vitro* de fármacos, capaz de gerar resultados com maior precisão em relação à diálise convencional.

Palavras-chave: Nanocápsulas de núcleo lipídico, semissólidos, propionato de clobetasol, prednisolona, liberação *in vitro*, diálise, fluxo contínuo.

ABSTRACT

Lipid-core nanocapsules: cutaneous penetration studies and proposition of strategies to assess the *in vitro* drug release

The *in vitro* cutaneous permeation/penetration (porcine skin) of clobetasol propionate-loaded lipid-core nanocapsules incorporated into a semisolid dosage form was evaluated, using the Franz diffusion cells technique. It was shown that the nanoencapsulation was able to reduce the drug amount penetration into skin layers (stratum corneum, epidermis and dermis) without changing the way (percentual distribution) that it was distributed. The suitability of different synthetic membranes (cellulose acetate, polycarbonate, and dialysis membrane) to assess the *in vitro* drug release using Franz diffusion cells from this formulation was also studied. It was ascertained by combining different analytical techniques (dynamic light scattering, scanning and transmission electron microscopy) that the membrane with smaller pore size (dialysis membrane, 12 kDa cut off) is the most appropriate for conducting this kind of study, because it is the only one able of preventing the passage of intact nanocapsules from formulation to Franz diffusion cells receptor media, instead of polycarbonate and cellulose acetate membranes (0.05 and 0.45 pore size, respectively). In addition, a new strategy to assess *in vitro* drug release drug-loaded lipid-core nanocapsules was proposed, associating continuous flow of release media and dialysis sac. The proposed system was adequate to assess the *in vitro* drug release profiles from nanocapsule suspensions containing different model drugs (prednisolone and clobetasol propionate), enabling the differentiation of these systems from drug solutions, graphically and by the calculated flux values. Furthermore, this strategy was suitable to maintain the drug concentration into release media far away from saturation, contributing to the sink condition. Also, the proposed system was described as a semi-automated prototype for *in vitro* drug release evaluation, able to produce results with greater accuracy than conventional dialysis technique.

Keywords: lipid-core nanocapsules, semisolid, clobetasol propionate, prednisolone, *in vitro* drug release, dialysis, continuous flow.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DA LITERATURA

Figura 1. Estrutura química do propionato de clobetasol.....	34
Figura 2. Estutura química da prednisolone	35

CAPÍTULO I

Figure 1. Amount of CP/area ($\mu\text{g.cm}^{-2}$) in different layers of porcine skin.....	59
Figure 2. Percentage amount (%) of CP in different layers of porcine skin.....	61

CAPÍTULO II

Figure 1. Amount of released CP /area ($\mu\text{g.cm}^{-2}$) after 16 h of experiment using Diffusion Franz Cell Apparatus and different synthetic membranes.....	81
Figure 2. Images obtained by SEM of synthetic membranes.....	82
Figure 3. Particle size distribution by PCS of the receptor medium (PBS 0.1M:Ethanol - 70:30 v/v).....	83
Figure 4. TEM images of the receptor medium.....	84
Figure 5. Particle size distribution by PCS of the receptor medium (water:ethanol - 70:30 v/v).....	85

CAPÍTULO III

Figure 1. Design of the proposed release device.....	114
Figure 2. Scheme of the proposed system (continuous flow apparatus) for <i>in vitro</i> drug release studies.....	115
Figure 3. Particle size distribution of LNC-PD and LNC-CP by laser diffraction...	117
Figure 4. <i>In vitro</i> PD diffusion/release profiles from ethanolic solution and lipid-core nanocapsules.....	119
Figure 5. <i>In vitro</i> CP diffusion/release profiles from ethanolic solution and lipid-core nanocapsules.....	120

Figure 6. Mean values obtained by the ratio between the drug concentration measured in samples throughout the experiment and the drug saturation in the release medium employing the different methods.....	122
Figure 7. Ratio by relative standard deviation (RSD) observed from <i>in vitro</i> drug release from LNC throughout experiments using the different methods.....	124
Figure 8. <i>In vitro</i> CP release profiles from ethanolic solution using the conventional dialysis sac technique when the samples were obtained from different sampling sites.....	125

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO III

Table 1. Physicochemical characteristics of prednisolone-loaded lipid-core nanocapsules (LNC-PD) and clobetasol propionate lipid-core nanocapsules (LNC-CP).....	118
Table 2. Steady-state fluxes (J) obtained by fitting the <i>in vitro</i> PD and CP diffusion/release profiles acquired using the conventional dialysis sac technique and the continuous flow apparatus to the Fick's first law.....	121
Table 3. Steady-state fluxes (J) obtained by fitting the <i>in vitro</i> CP diffusion profiles from ethanolic solutions using the conventional dialysis sac technique and samples collected from different sites (higher, medium and lower sites) to the Fick's first law.....	126

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
2. OBJETIVOS	25
2.1 Objetivo geral	27
2.2 Objetivos específicos	27
3. REVISÃO DA LITERATURA	29
3.1 Nanocápsulas de núcleo lipídico	31
3.2 Anti-inflamatórios esteroides: propionato de clobetasol e prednisolona	33
3.3 Sistemas semissólidos contendo nanocápsulas poliméricas	36
3.4 Avaliação do perfil de liberação <i>in vitro</i> de fármacos associados a sistemas nanoestruturados	38
4. CAPÍTULO I	43
4.1 Apresentação	45
4.2 Manuscrito I	47
5. CAPÍTULO II	65
5.1 Apresentação	67
5.2 Manuscrito II	69
6. CAPÍTULO III	95
6.1 Apresentação	97
6.2 Manuscrito III	97
7. DISCUSSÃO	137
8. CONCLUSÃO	143
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	147

1.INTRODUÇÃO

A aplicação da nanotecnologia é uma realidade nos mais diversos setores industriais e econômicos (STAGGERS et al., 2008; MANGEMATIN & WALSH, 2012). Na área farmacêutica o conhecimento proveniente desta ciência vem sendo amplamente aplicado no desenvolvimento de carreadores de fármacos, estruturas coloidais capazes de agregar vantagens aos sistemas que integram por promover um maior controle da liberação de fármacos, em relação às formulações convencionais disponíveis na terapêutica (SCHAFFAZICK et al., 2003).

Dentre as diversas estruturas nanométricas empregadas a partir desta abordagem, destacam-se as nanocápsulas de núcleo lipídico. Estes nanocarreadores, de diâmetro inferior a 1000 nm, são organizados como um núcleo lipídico, contendo uma dispersão de um lipídio sólido, em geral um tensoativo de baixo EHL em um lipídio líquido, envolto por uma parede polimérica constituída por um polímero, como por exemplo, a poli(ϵ -caprolactona), um polímero biocompatível e biodegradável (JÄGER et al., 2009; FIEL et al., 2011).

Diversos trabalhos têm demonstrado as potencialidades destes sistemas como carreadores de fármacos, capazes de aumentar a estabilidade de moléculas lábeis (OURIQUE et al., 2008), promover um maior aporte de moléculas bioativas ao sistema nervoso central (BENVEGNÚ et al., 2012; ZANOTTO-FILHO et al., 2013), possibilitar o controle da velocidade de liberação de substâncias encapsuladas (FONTANA et al., 2009), entre outros.

Além do crescente interesse no desenvolvimento de sistemas nanoestruturados como plataformas destinadas ao controle da liberação de fármacos, BAMRUNGSAP e colaboradores (2012) projetaram, em seu trabalho, um aumento do investimento da indústria farmacêutica no desenvolvimento de produtos que contemplem a nanotecnologia no seu processo produtivo para a próxima década. Porém, apesar da existência de formas farmacêuticas contendo nanotecnologia no mercado mundial, ainda não há uma regulamentação consolidada que estabeleça técnicas padrões para a caracterização destes sistemas com fins de registro.

Recentemente nosso grupo de pesquisa desenvolveu um nanomedicamento promissor, um hidrogel contendo propionato de clobetasol associado a nanocápsulas de núcleo lipídico (FONTANA et al., 2011). A partir da formulação proposta, foi

observada uma série de vantagens do seu emprego em modelos animais de dermatite de contato em relação à utilização do sistema convencional, contendo o corticosteroide em sua forma livre (FONTANA et al., 2011).

A partir dos resultados observados nos modelos *in vivo*, despertou-se o interesse sobre o comportamento do fármaco associado a este sistema no que diz respeito a sua distribuição nas diferentes camadas da pele e, a partir deste conhecimento, buscar a compreensão global acerca das vantagens observadas frente à formulação convencional, uma vez que estudos de penetração/permeação cutânea do propionato de clobetasol a partir deste nanomedicamento ainda não foram descritos.

Com base neste cenário, é muito importante que estudos sejam conduzidos, avaliando o comportamento de sistemas nanoestruturados aplicados à terapêutica, como as nanocápsulas de núcleo lipídico, quando em forma de suspensão ou incorporadas a sistemas semissólidos; além disso, é necessário que técnicas de caracterização, como a avaliação da liberação *in vitro*, parâmetro bastante relevante no desenvolvimento e controle de qualidade deste tipo diferenciado de forma farmacêutica (SCHAFFAZICK, et al., 2003; MORA-HUERTAS et al., 2010), sejam exaustivamente propostos, estudados e discutidos buscando um consenso sobre quais são as melhores alternativas para fornecer informações necessárias sobre o comportamento deste tipo de sistema.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Compreender o comportamento do propionato de clobetasol nanoencapsulado, associado a uma formulação de uso tópico em relação a sua distribuição nas camadas da pele, aperfeiçoar as condições experimentais para a avaliação da liberação *in vitro* de fármacos associados a nanocápsulas de núcleo lipídico e incorporadas em bases semissólidas, empregando células de difusão de Franz e, ainda, propor um sistema inovador para a avaliação da liberação *in vitro* de fármacos a partir de suspensões de nanocápsulas de núcleo lipídico.

2.2 Objetivos específicos

- Produzir e caracterizar hidrogéis contendo propionato de clobetasol associado a nanocápsulas de núcleo lipídico;
- Avaliar a permeação cutânea do propionato de clobetasol a partir de hidrogéis contendo propionato de clobetasol nanoencapsulado, comparando com controles contendo o fármaco livre, através de técnica de Células de Difusão de Franz, empregando pele de abdômen de porco como membrana biológica;
- Avaliar a adequabilidade da utilização de diferentes membranas sintéticas (policarbonato, acetato de celulose e membrana de diálise) como membranas limitantes entre os compartimentos doadores e receptores de Células de Difusão de Franz, em método para a avaliação do perfil de liberação *in vitro* do propionato de clobetasol a partir dos hidrogéis contendo o fármaco nanoencapsulado;
- Desenvolver e avaliar um novo método para a obtenção de perfis de liberação *in vitro* de fármacos nanoencapsulados, que combina sacos de diálise e fluxo contínuo de meio de liberação, empregando propionato de clobetasol e prednisolona como fármacos modelos.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Nanocápsulas de núcleo lipídico

É crescente o interesse de diferentes setores industriais e econômicos na utilização dos conhecimentos advindos da nanotecnologia como ferramenta para o melhoramento de produtos e processos. Na área farmacêutica, há uma notória progressão na produção de estudos científicos contemplando o desenvolvimento e caracterização de nanocarreadores.

Nanocarreadores podem ser definidos, de forma ampla, como sistemas coloidais que, no campo da medicina, podem ser explorados como vetores de fármacos, capazes de controlar sua liberação em sítios específicos e a sua velocidade de liberação a partir da forma farmacêutica (SCHAFFAZICK et al., 2003).

Tanto plataformas inorgânicas quanto orgânicas ou híbridas vem sendo propostas como sistemas destinados ao controle da liberação de fármacos (DOUROUMIS et al., 2013; GEORGE et al, 2012; BAMRUNGSAP et al, 2012). Dentre estas, as plataformas orgânicas tornam-se atrativas pela possibilidade do emprego de materiais biocompatíveis e biodegradáveis em sua composição, características desejáveis para a produção de sistemas destinados à aplicação terapêutica.

Nanopartículas poliméricas são exemplos de estruturas orgânicas, com diâmetro inferior a 1000 nm, que vem sendo exploradas como carreadores de fármacos na atualidade. Estes sistemas coloidais são comumente produzidos empregando métodos de polimerização “*in situ*” ou ainda obtidos a partir de polímeros pré-formados (VAUTHIER & BOUCHEMAL, 2009; MORA-HUERTAS et al., 2010). Dentre os polímeros mais empregados para a produção de nanopartículas poliméricas, destacamos a poly(ϵ -caprolactona), um polímero semicristalino reconhecido pelas suas características de biocompatibilidade e biodegradabilidade, que vem sendo aplicado à produção de sistemas que visam a promover a liberação controlada de moléculas, como microesferas, nanoesferas, microcápsulas, nanocápsulas e implantes medicamentosos (SINHA et al., 2004).

As nanopartículas poliméricas podem ainda ser classificadas, de acordo com sua composição e organização supramolecular, como nanoesferas ou nanocápsulas. As nanoesferas são estruturas matriciais, compostas por uma rede de polímeros auto-organizados, de forma esférica, onde o fármaco associado pode estar incluso, retido ou adsorvido na matriz polimérica. Já as nanocápsulas, diferenciam-se das nanoesferas primeiramente pela presença de um componente oleoso em sua constituição. Estas nanopartículas são estruturas vesiculares, onde as gotículas nanométricas do óleo são envoltas por uma parede polimérica, podendo o fármaco associado estar incluso ou dissolvido no núcleo lipídico, disperso ou adsorvido na parede polimérica (SCHAFFAZICK et al., 2003; MORA-HUERTAS et al., 2010).

Nosso grupo de pesquisa desenvolveu, nos últimos anos, uma formulação diferenciada de nanocápsulas poliméricas, denominadas nanocápsulas de núcleo lipídico. Este sistema difere dos sistemas convencionais pelo núcleo destes carreadores ser formado por uma dispersão de um lipídio sólido, como o monoestearato de sorbitano, em um lipídio líquido. Este núcleo, por sua vez, é envolto por uma parede polimérica, da mesma forma que as nanocápsulas convencionais (JÄGER et al, 2009; VENTURINI et al.; 2011).

É importante ressaltar que a alteração na composição do núcleo das nanocápsulas de núcleo lipídico confere a esta plataforma propriedades mecânicas diferenciadas em relação às formulações convencionais de nanocápsulas. FIEL e colaboradores (2011) demonstraram a versatilidade deste sistema, uma vez que suas propriedades mecânicas e de deformabilidade podem ser moduladas, de acordo com o objetivo para os quais estas serão empregadas.

Além disso, JORNADA e colaboradores (2012) demonstraram a capacidade de controlar as variáveis do processo para a obtenção de formulações de nanocápsulas de núcleo lipídico com características nanotecnológicas adequadas, utilizando estratégias que possibilitam ainda o aumento da capacidade de carga de fármacos no sistema, sem comprometimento das suas características físico-químicas, o que reforça o seu potencial promissor para a aplicação nas áreas cosmética e farmacêutica.

A estabilização das nanocápsulas de núcleo lipídico se dá pelo revestimento das nanoestruturas com um tensoativo hidrofílico, o polissorbato 80.

Estudos na literatura tem demonstrado a contribuição deste tensoativo, quando presente como revestimento de nanopartículas, no aumento do tempo de circulação dos carreadores no organismo após a administração e ainda a sua potencialidade em aumentar o aporte de moléculas de interesse biológico associadas a nanoestruturas ao sistema nervoso central (KAUR et al, 2008).

Diversos trabalhos publicados na literatura científica nos últimos 10 anos exploram e demonstram com sucesso as diferentes vantagens promovidas pela associação de substâncias ativas a nanocápsulas de núcleo lipídico, como o aumento do aporte de moléculas de interesse biológico ao sistema nervoso central (BERNARDI et al., 2009; FROZZA et al., 2010), o aumento do índice terapêutico (BENVEGNÚ et al., 2012; DETONI et al., 2012), a proteção do fármaco frente à inativação e degradação no meio fisiológico ou outros fatores extrínsecos (OURIQUE et al., 2008; ALMEIDA et al., 2010; FONTANA et al., 2009; DETONI et al., 2012) além do aumento da eficiência terapêutica (ZANOTTO-FILHO et al., 2013).

3.2 Anti-inflamatórios esteroides: propionato de clobetasol e prednisolona

O propionato de clobetasol (figura 1) é um glicocorticoide de alta potência bastante explorado na terapêutica pelas suas propriedades imunossupressoras, principalmente no tratamento tópico de doenças de origem inflamatória, imunológica ou idiopática que acometem a pele, como a psoríase, o vitiligo e a dermatite atópica (TAMESIS & MORELLI, 2010).

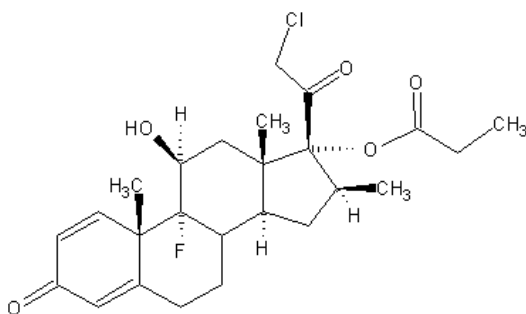


Figura 1. Estrutura química do propionato de clobetasol

Apesar do já estabelecido efeito anti-inflamatório deste medicamento, assim como para os demais compostos pertencentes à classe dos glicocorticoides, há uma limitação da sua utilização, decorrente do grande número e severidade dos efeitos adversos associados ao emprego destas substâncias (WIEDESBERG et al., 2008).

Como exemplos de efeitos colaterais estabelecidos na literatura científica para o propionato de clobetasol podemos citar efeitos locais como hipopigmentação ou púrpura e ainda efeitos sistêmicos como a síndrome de Cushing ou a supressão do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (TEMPARK et al., 2010).

WIEDESBERG e colaboradores (2008) destacam o uso de corticosteroides tópicos como parte integrante da terapia dermatológica, aponta as limitações em relação à maneira como os fármacos são liberados das formas farmacêuticas na pele e atenta para a necessidade da proposição e avaliação de novas estratégias para otimizar o desempenho dos glicocorticoides como medicamentos.

Atendendo esta necessidade, FONTANA e colaboradores (2009) produziram e caracterizaram formulações de propionato de clobetasol associado a diferentes tipos de nanocarreadores (nanoemulsões, nanoesferas e nanocápsulas de núcleo lipídico). Esses sistemas demonstraram serem capazes de controlar temporalmente a liberação *in vitro* do fármaco, de maneira bastante pronunciada. É importante ressaltar que a formulação contendo o propionato de clobetasol associado às nanocápsulas de núcleo lipídico demonstrou maior estabilidade durante o armazenamento a temperatura ambiente e

promoveu maior controle da liberação do fármaco se comparada com a formulação de nanoesferas e a nanoemulsão.

Em estudos posteriores, foram produzidas, caracterizadas e avaliadas frente a um modelo animal de dermatite de contato, formulações semissólidas obtidas a partir da incorporação das suspensões de nanocápsulas de núcleo lipídico de propionato de clobetasol em hidrogéis de carbopol ultrez[®].

Como resultados foi observado um efeito anti-inflamatório superior, avaliado pelo aumento na atividade da NTPDase (ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase) e potencial de redução do dano tecidual, evidenciado através de análises de marcadores de estresse oxidativo e análises histológicas, das formulações semissólidas preparadas com o fármaco nanoencapsulado em relação aos controles (FONTANA et al., 2011; JAQUES et al., 2012).

A prednisolona (Figura 2), por sua vez, é um glicocorticoide de potência média, bastante empregada para o tratamento de distúrbios inflamatórios e administrada principalmente pela via oral.

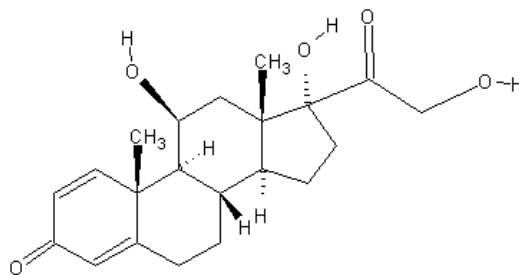


Figura 2. Estrutura química da prednisolona.

A prednisolona é a forma biologicamente ativa da prednisona após a sua conversão *in vivo*, decorrente da metabolização hepática. A administração oral da primeira molécula em detrimento da segunda é recomendada principalmente para pacientes com distúrbios hepáticos, com menor capacidade de converter o pró-fármaco na forma capaz de exercer o efeito terapêutico almejado (RANG et al., 2007).

A preparação de sistemas contendo prednisolona associada à nanocarreadores como lipossomas e nanocápsulas poliméricas tem demonstrado resultados promissores

na produção de plataformas destinadas ao tratamento de doenças inflamatórias intestinais locais e no aumento da atividade antitumoral frente a linhagens celulares de mieloma de camundongos (BANCIU et al., 2006; KSHIRSAGAR et al., 2012).

O propionato de clobetasol e a prednisolona foram selecionados como fármacos modelos para a realização do trabalho apresentado no capítulo III desta dissertação com base nos seus valores de coeficientes de partição (log D). A partir do estudo porposto por OLIVERA e colaboradores (2013) podemos predizer a maneira como os fármacos estão distribuídos nas nanocápsulas de núcleo lipídico.

Enquanto o propionato de clobetasol (log D = 3.98) distribui-se completamente no núcleo das nanocápsulas, a prednisolona (log D = 1.49) distribui-se parcialmente na água enquanto a outra parte localiza-se dispersa no carreador, principalmente na parede polimérica, quando integrando as suspensões de nanocápsulas de núcleo lipídico.

3.3 Sistemas semissólidos contendo nanocápsulas poliméricas

Géis e cremes são exemplos de formas farmacêuticas semissólidas, desenvolvidas para a aplicação tópica de fármacos, objetivando tanto efeitos locais, quando se trata de um produto dermatológico tópico, quanto efeitos sistêmicos, quando o objetivo é a liberação do fármaco através da pele (absorção percutânea), caracterizando um produto transdérmico (ALLEN et al., 2007).

Devido à complexidade da pele como barreira biológica, decorrente de sua constituição e da ação efetiva do estrato córneo como obstáculo a passagem de fármacos às camadas mais profundas da pele, se faz necessário o estudo e emprego de estratégias, como a nanoencapsulação, que permitam a manipulação de parâmetros inerentes as diferentes moléculas como os coeficientes de partição, difusão e solubilidade. Estas estratégias devem ser aplicadas visando ao aperfeiçoamento de formulações semissólidas e o direcionamento dos ativos à camada da pele onde a ação

terapêutica é requerida ou ainda o aumento da sua absorção percutânea a partir destas formas farmacêuticas (GUTERRES et al., 2007).

Hidrogéis produzidos pela incorporação de suspensões de nanocápsulas poliméricas em sistemas que empregam Carbopol 940[®] e Carbopol Ultrez[®] como polímeros espessantes foram produzidos e caracterizados nos últimos anos (TERROSO et al., 2009; MARCHIORI et al., 2010; OURIQUE et al., 2011; FONTANA et al., 2011).

Além disso, recentemente, HOFFMEINSTER e colaboradores (2012) demonstraram a viabilidade da produção de hidrogéis de Carbopol 940[®] empregando pós redispersíveis contendo melatonina associada à nanocápsulas polimérica, produzidos pela técnica de secagem por aspersão.

A incorporação de moléculas nanoencapsuladas em sistemas semissólidos apresenta vantagens frente a sua incorporação na forma livre, como a possibilidade do aumento do tempo de residência de fármacos ou ativos na pele, redução do seu metabolismo nos tecidos cutâneos e o aumento da estabilidade de substâncias intrinsecamente fotoinstáveis (GUTERRES et al., 2007; PAESE et al., 2009; OURIQUE et al., 2011).

A caracterização de formas farmacêuticas contendo nanopartículas poliméricas tem sido descrita através de diversos parâmetros como o teor de fármaco ou ativo na formulação, avaliado por técnicas cromatográficas e espectrofotométricas, o pH, avaliado por potenciometria, o comportamento reológico, perfil de espalhabilidade, estudos de estabilidade, avaliação do perfil de liberação *in vitro* das substâncias ativas a partir destes sistemas e análise sensorial (JIMENÉZ et al., 2004; GUTERRES et al., 2007; PAESE et al., 2009; MARCHIORI et al., 2010; OURIQUE et al., 2011; FONTANA et al., 2011; KÜLKAMP-GUERREIRO et al., 2013).

O perfil de liberação *in vitro* de fármacos ou ativos é uma ferramenta importante no desenvolvimento e controle de qualidade de formas farmacêuticas contendo nanopartículas poliméricas, onde se almeja maior controle da liberação das substâncias em relação às formas farmacêuticas convencionais (SCHAFFAZICK et al., 2003; MORA-HUERTAS et al., 2010).

MARCHIORI e colaboradores (2010) e FONTANA e colaboradores (2011) empregaram a técnica de células de difusão de Franz, utilizando como barreira limitante entre os meios receptor e doador uma membrana sintética de acetato de celulose, de 450 nm de tamanho de poro, para a avaliação da liberação *in vitro* de diferentes corticosteroides associados a nanocápsulas de núcleo lipídico, incorporados em hidrogéis de carbopol. Esta técnica é recomendada pelo FDA para a avaliação de sistemas semissólidos convencionais (US FDA, 1997). Porém, não há estudos na literatura que comprovem que este seja o método mais adequado para a obtenção do perfil de liberação *in vitro* de fármacos ou ativos a partir de sistemas contendo as substâncias associadas a carreadores nanoestruturados.

Por outro lado, HOFFMEINSTER e colaboradores (2012) avaliaram o perfil de liberação *in vitro* da melatonina nanoencapsulada incorporada em hidrogéis de carbopol empregando a técnica convencional de sacos de diálise.

A falta de padronização de técnicas para a avaliação da liberação *in vitro* de fármacos a partir de sistemas semissólidos contendo nanopartículas poliméricas dificulta a comparação entre os resultados apresentados em diferentes estudos descritos na literatura científica.

3.4 Avaliação do perfil de liberação *in vitro* de fármacos associados a sistemas nanoestruturados

Mesmo com o avanço das tecnologias, dificuldades técnicas ainda são encontradas na caracterização físico-química de nanopartículas, em função da natureza coloidal destes sistemas. Desta forma, as informações obtidas através da combinação de técnicas de caracterização de sistemas nanoestruturados são de grande valor para que se possa propor a organização das nanopartículas em nível molecular e sugerir o comportamento destes sistemas no meio biológico (SCHAFFAZICK et al., 2003).

Na caracterização de sistemas nanoestruturados, como as nanocápsulas poliméricas, a cinética de liberação *in vitro* é um parâmetro bastante importante a ser estudado. A liberação de fármacos é o processo pelo qual o fármaco deixa a forma

farmacêutica e passa a estar sujeito à absorção, distribuição, metabolização e excreção, tornando-se disponível para a ação farmacológica (SINKO, 2008). Podemos extrapolar este conceito para os nanocarreadores, uma vez que as substâncias ativas associadas a essas nanoestruturas devem ser inicialmente liberadas para que se obtenha a atividade farmacológica esperada.

Ainda hoje não existem métodos oficiais para a avaliação da liberação de fármacos a partir de carreadores submicrométricos, tampouco consenso entre os pesquisadores sobre qual seria a melhor técnica a ser empregada. A principal dificuldade no desenvolvimento de métodos destinados à avaliação do perfil de liberação de fármacos a partir de nanocarreadores envolve a separação do fármaco ainda presente na partícula, do fármaco já liberado, no meio de liberação (FERRONATO, 2010).

Esta limitação hoje é contornada pela utilização da técnica de diálise, que consiste no emprego de uma membrana seletiva (saco de diálise) que apresenta tamanho de poro reduzido, por exemplo, 12.000 Da, que impede a passagem da nanopartícula para o meio de liberação, sendo que o fármaco liberado permanece em solução dentro do saco de diálise, podendo atravessar a membrana, seguindo as leis de difusão e o princípio da diálise (ATTWOOD, 2005; FERRONATO, 2010). É de extrema importância que nos experimentos de dissolução e liberação *in vitro* seja atendida a condição *sink* durante todo o tempo de duração do mesmo, para evitar que a velocidade de dissolução seja influenciada, artificialmente, pela aproximação da saturação durante a realização do estudo (D'SOUZA & DELUCA, 2006; FERRONATO, 2010).

Trabalhos na literatura sugerem que, na técnica de diálise convencional, não é garantida a manutenção da condição *sink* no interior da bolsa de diálise, devido ao fato das nanopartículas estarem dispersas em um pequeno volume de fase aquosa no compartimento de diálise, o que representaria uma limitação, pois neste contexto há uma redução na força motriz que conduz a passagem do fármaco livre para o meio de liberação externo.

Sugere-se como forma de contornar esta limitação o emprego da técnica de diálise reversa, onde a formulação é adicionada ao meio externo a bolsa de diálise, garantindo uma diluição “infinita” do fármaco liberado. Nesta técnica, utiliza-se do princípio de que o fármaco, ao se liberar da nanopartícula, atravessa a membrana em direção às bolsas de diálise presentes no meio de dissolução, seguindo as leis da difusão e é quantificado no interior dessas, em intervalos de tempo determinados (FERRONATO, 2010). Porém esta técnica de avaliação da liberação *in vitro* também apresenta desvantagens, como a necessidade de métodos mais sensíveis para a quantificação do fármaco e limitação do poder discriminatório entre formulações (HENRIKSEN, 1995; BHARDWAJ & BURGESS, 2010). Além disso, o emprego de um número de sacos de diálise equivalentes ao número de pontos de análise para a construção do perfil de liberação pode tornar essa técnica de custo elevado se comparada à técnica convencional.

Muitos trabalhos recentes tem investigado a adaptação de acessórios de dissolução, descritos nas farmacopeias, para a obtenção do perfil de liberação *in vitro* de substâncias a partir de sistemas nanoestruturados.

HENG e colaboradores (2008) propõem a utilização das células de difusão, o aparato IV da USP, em sistema fechado (recirculando meio de liberação) como sendo o sistema mais adequado para a avaliação da liberação de fármacos a partir de nanopartículas de cefuroxima, em relação aos aparatos I (cesto) e II (pás) da USP e a técnica convencional de sacos de diálise.

De maneira semelhante, outro trabalho descrito na literatura aponta uma adaptação do aparato IV combinado com a utilização de membranas de diálise em sistema fechado (recirculando meio de liberação), como sendo uma alternativa capaz de gerar perfis de liberação *in vitro* de dexametasona a partir de lipossomas. O sistema proposto neste trabalho apresenta uma habilidade discriminatória superior em relação a técnicas como a diálise convencional e a diálise reversa para diferenciar lipossomas, obtidos por diferentes processos e de diferentes constituições (BHARDWAJ & BURGESS, 2010).

Um estudo conduzido por ABDEL-MOTTALEB & LAMPRECHT (2011) apresenta a adaptação do aparato I da USP, o método do cesto, combinado com a utilização de membranas de diálise, para a obtenção dos perfis de liberação *in vitro* de ibuprofeno a partir de diferentes nanocarreadores: lipossomas, nanoesferas e nanocápsulas. Os resultados demonstram que o método proposto é sensível, reprodutível e adequado para discriminar o perfil de liberação *in vitro* do fármaco associado a diferentes sistemas nanoestruturados. Porém além do fármaco empregado como modelo neste estudo ter uma solubilidade considerável (14.69 g/L) no meio de liberação utilizado no estudo (tampão fosfato pH 7.4), as formulações apresentam concentrações entre 2 e 5 mg mL⁻¹, o que não reflete a realidade de formulações de nanocápsulas lipídicas, que apresentam fármacos em concentrações mais baixas (0.5 a 1 mg mL⁻¹).

Ainda, SIEVENS-FIGUEROA (2012) também apresentam a aplicação do aparato IV da USP com sucesso, demonstrando o alto potencial discriminativo para diferenciar o perfil de liberação *in vitro* de fármacos a partir de filmes produzidos com micropartículas ou nanopartículas de griseofulvina. Da mesma forma, neste estudo, as suspensões de nanocápsulas e microcápsulas, empregadas para a produção dos filmes, apresentam altas concentrações de fármaco (em torno de 4% w/w).

Neste contexto, podemos afirmar que não há na literatura científica, até o presente momento, trabalhos que contemplem o desenvolvimento de métodos para a avaliação da liberação *in vitro* de fármacos a partir de nanocápsulas de núcleo lipídico, associando a renovação contínua de meio de liberação (sistema aberto) e a técnica de diálise.

4. CAPÍTULO I

4.1 Apresentação

Nos últimos anos a nanotecnologia tem recebido grande atenção na área farmacêutica, devido às vantagens da utilização de sistemas contendo fármacos ou ativos associados a carreadores nanoestruturados, no controle da liberação de substâncias, quando incorporados a sistemas destinados a aplicações na terapêutica e na cosmética (GUTERRES et al., 2009; PAESE et al., 2009; POHLMANN et al., 2013).

Recentemente, nosso grupo de pesquisa desenvolveu um nanomedicamento dermatológico, um hidrogel contendo propionato de clobetasol associado a nanocápsulas de núcleo lipídico, destinado ao tratamento de dermatite de contato (FONTANA et al., 2011). Esse sistema foi capaz de promover um maior controle da liberação do fármaco em relação ao sistema convencional, contendo o fármaco livre; além disso, foi capaz de promover uma maior eficácia *in vivo* no tratamento de dermatite de contato empregando um modelo animal; também preveniu o dano tecidual observado através de marcadores de estresse oxidativo e análises histológicas (FONTANA et al., 2011; JAQUES et al., 2012).

O incremento da resposta *in vivo* foi observado quando os tratamentos dos animais que apresentavam dermatite de contato foram conduzidos, considerando um intervalo de 48 horas entre as aplicações das formulações (nanomedicamento ou controles), durante cinco dias (FONTANA et al., 2011).

Para compreender de que forma o sistema descrito é capaz de promover a melhor resposta biológica, delineou-se, no presente trabalho, um estudo para avaliar a permeação cutânea *in vitro* do propionato de clobetasol, empregando células de difusão de Franz a partir das formulações semissólidas contendo o fármaco livre ou associado a nanocápsulas de núcleo lipídico.

Os resultados deste estudo foram aceitos para a publicação, na forma de um artigo, no periódico *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*.

4.2 Manuscrito I

Em um trabalho anterior do nosso grupo de pesquisa foram produzidos e caracterizados hidrogéis de carbopol ultrez[®] contendo propionato de clobetasol associado a nanocápsulas de núcleo lipídico. A atividade biológica desta formulação foi atestada frente a um modelo de dermatite de contato em ratos, onde se observou o incremento do efeito imunossupressor quando a formulação proposta foi empregada para o tratamento dos animais, em comparação a um hidrogel contendo o fármaco na forma livre.

A fim de investigar os fatores que contribuíram para o melhor desempenho do hidrogel que continha o anti-inflamatório esteroide associado a carreadores nanoestruturados, no presente trabalho foram avaliados os perfis de permeação e penetração cutânea das formulações proposta (HG-LNC-CP) e controle (HG-CP).

Para isso, foi empregada a técnica de células de difusão de Franz, utilizando, como barreira limitante entre os compartimentos doadores e receptores das células de difusão, membranas de pele de abdômen de porcas.

Após 24 horas de experimento, não foram encontradas quantidades significativas do propionato de clobetasol nos meios receptores das células de difusão de Franz, independente da formulação avaliada (HG-LNC-CP ou HG-CP). Esta observação sugere que não há permeação do propionato de clobetasol, nas condições avaliadas.

Considerando a penetração do fármaco, a nanoencapsulação do propionato de clobetasol foi capaz de reduzir significativamente a quantidade do anti-inflamatório nas diferentes camadas da pele (estrato córneo, epiderme viável e derme). Porém, quando se compara a distribuição relativa do fármaco, não são identificadas diferenças nos percentuais de propionato de clobetasol encontrados no estrato córneo, epiderme e derme.

Os resultados observados neste trabalho sugerem que a encapsulação do propionato de clobetasol é capaz de controlar temporalmente a liberação do fármaco a partir do hidrogel e, conseqüentemente, reduzir as quantidades penetradas do fármaco

nas camadas da pele. É importante salientar que, embora menores quantidades do propionato de clobetasol sejam encontradas na epiderme viável, local onde o fármaco deve exercer o efeito farmacológico durante o tratamento da dermatite de contato, não há prejuízo na resposta biológica, demonstrada em trabalho publicado anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa. Ainda, uma menor quantidade do fármaco na derme indica uma redução na possibilidade do anti-inflamatório esteroide ser absorvido sistemicamente, o que pode contribuir para a minimização dos efeitos adversos relacionados à absorção sistêmica não desejada do propionato de clobetasol.

Este estudo reforça a potencial aplicação do hidrogel contendo propionato de clobetasol associado a nanocápsulas de núcleo lipídico (HG-LNC-CP) como um promissor nanomedicamento dermatológico para o tratamento de doenças cutâneas.

O manuscrito gerado a partir do presente trabalho foi aceito em 14 de outubro de 2013 para publicação no periódico *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* na forma de um artigo (*Nanoencapsulation of Clobetasol Propionate Decreases Its Penetration to Skin Layers Without Changing Its Relative Skin Distribution*).

Por se tratar de material já aceito para a publicação, este texto explicativo substitui o manuscrito apresentado entre as páginas **47** e **64** da versão completa desta dissertação, atendendo a Resolução nº 002/2011 do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, visando preservar os direitos de publicação das editoras de periódicos científicos.

5. CAPÍTULO II

5.1 Apresentação

No trabalho apresentado no capítulo I desta dissertação foram produzidos hidrogéis contendo propionato de clobetasol associado a nanocápsulas de núcleo lipídico, desenvolvidos em trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa (FONTANA et al., 2011). No presente trabalho, no momento da caracterização do sistema, foram avaliados os perfis de liberação *in vitro* do fármaco a partir das formulações semissólidas contendo o fármaco livre e encapsulado, empregando células de difusão de Franz e membranas sintéticas de diferentes composições e diâmetros de poro.

Os perfis de liberação *in vitro* observados foram distintos para as diferentes formulações em função do tipo de membrana sintética utilizada para separar os compartimentos receptores e doadores das células de difusão. Este fato despertou nosso interesse; então a literatura disponível, sobre o desenvolvimento e caracterização de sistemas semissólidos contendo nanopartículas poliméricas em sua composição (MARCHIORI et al., 2010; FONTANA et al.; 2011), foi consultada. Para nossa surpresa, verificou-se uma lacuna no que diz respeito a padronização das técnicas e materiais empregados para a avaliação do perfil de liberação *in vitro* de fármacos e ativos associados a nanocápsulas poliméricas em formulações semissólidas.

É notória a importância da avaliação do perfil de liberação *in vitro* de fármacos e ativos, a partir de sistemas nanoestruturados, como ferramenta para o desenvolvimento e controle de qualidade destas formas farmacêuticas diferenciadas (SCHAFFAZICK, et al., 2003; MORA-HUERTAS et al., 2010). Neste contexto, este trabalho foi desenvolvido objetivando avaliar, através da combinação de diferentes técnicas analíticas, o emprego de três diferentes tipos de membrana como barreira entre os compartimentos das células de difusão de Franz, quando esta metodologia é aplicada à obtenção de perfis de liberação *in vitro* a partir de formas farmacêuticas semissólidas contendo nanopartículas poliméricas.

Os resultados deste estudo foram submetidos, na forma de um artigo, ao periódico *Current Nanoscience* e o manuscrito encontra-se sob avaliação.

5.2 Manuscrito II

A técnica de células de difusão de Franz é comumente empregada para a avaliação do perfil de liberação *in vitro* de fármacos associados a nanocarreadores poliméricos incorporados em formas farmacêuticas semissólidas. Porém, até o presente momento, não haviam relatos na literatura de estudos que apontassem qual(is) seria(m) a(s) membrana(s) sintética(s) adequada(s) para atuar(em) como barreira limitante entre os compartimentos doadores e receptores das células de difusão de Franz, quando hidrogéis contendo ativos associados a nanocápsulas poliméricas são avaliados.

No presente trabalho avaliamos a adequabilidade de três membranas sintéticas de diferentes composições e tamanhos de poro, para a avaliação da liberação *in vitro* do propionato de clobetasol nanoencapsulado incorporado em hidrogéis de carbopol ultrez[®].

Foram avaliados os perfis de liberação *in vitro* do propionato de clobetasol, a partir da formulação acima mencionada, empregando a técnica de células de difusão de Franz, utilizando membranas de acetato de celulose (0.45 µm de tamanho de poro), policarbonato (0.05 µm de tamanho de poro) e membranas de diálise (12 kDa de *cut off*).

Observou-se que para um mesmo tempo de experimento (16 horas) menores quantidades do propionato de clobetasol são encontradas nos meios receptores das células de difusão, quando membranas de diálise são empregadas. Em contrapartida, quantidades intermediárias do fármaco são obtidas quando membranas de acetato de celulose são utilizadas e maiores quantidades são encontradas quando usam-se membranas de policarbonato, demonstrando a influência da seleção da membrana sintética na construção do perfil de liberação *in vitro* do fármaco.

Como hipótese para justificar as diferenças observadas em relação as concentrações do fármaco que atingem os meios receptores das células de difusão de Franz, para uma mesma formulação avaliada, variando-se apenas as membranas sintéticas empregadas na técnica, sugerimos que nanocápsulas íntegras poderiam estar

atravessando as membranas de maior tamanho de poro (acetato de celulose e policarbonato) em direção aos meios receptores. Isto ocasionaria uma superestimação do fármaco liberado.

Através da análise morfológica das membranas sintéticas (microscopia eletrônica de varredura), observou-se que o tamanho e a irregularidade dos poros observados nas membranas de acetato de celulose e policarbonato possibilitariam a passagem de nanocápsulas dos hidrogéis para os meios receptores das células de difusão.

Pela combinação de técnicas de espalhamento de luz dinâmico e microscopia eletrônica de transmissão, confirmou-se a presença de nanocápsulas integras no meio receptor das células de Franz, quando membranas de policarbonato ou acetato de celulose foram empregadas para a condução da avaliação da liberação *in vitro* do propionato de clobetasol, corroborando nossa hipótese. Diferentemente, quando membranas de diálise foram empregadas, não houveram indícios da presença de nanocápsulas integras nos meios receptores.

A partir da análise global dos resultados observados, podemos sugerir que as membranas de diálise (12 kDa) devem ser as membranas de primeira escolha para a avaliação da liberação *in vitro* de fármacos a partir de formas farmacêuticas semissólidas contendo ativos associados a nanocápsulas poliméricas.

O manuscrito gerado a partir do presente trabalho foi submetido ao periódico *Current Nanoscience* na forma de um artigo e encontra-se sob avaliação.

Por se tratar de material submetido à publicação, este texto explicativo substitui o manuscrito apresentado entre as páginas **69** e **94** da versão completa desta dissertação, atendendo a Resolução nº 002/2011 do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, visando preservar os direitos de publicação das editoras de periódicos científicos.

6. CAPÍTULO III

6.1 Apresentação

A partir das observações realizadas no trabalho anterior, atentamos para outra questão bastante relevante na caracterização de sistemas compostos por fármacos associados a nanocápsulas de núcleo lipídico: a inexistência de regulamentações oficiais e consenso científico acerca das técnicas empregadas para a obtenção do perfil de liberação *in vitro* de fármacos e ativos associados a nanopartículas poliméricas (FERRONATO et al., 2010).

Diversas são as técnicas empregadas para a obtenção do perfil de liberação *in vitro* de substâncias associadas a carreadores nanoestruturados: ultrafiltração-centrifugação, diálise convencional, diálise reversa, microdiálise. Cada técnica apresenta vantagens e desvantagens descritas na literatura científica (HITZMAN et al., 2005; FERRONATO et al., 2010; MORENO-BAUTISTA & TAM, 2011; XU et al., 2012). Dentre as técnicas mencionadas, a diálise convencional ainda é uma das mais comumente empregadas para a caracterização de sistemas compostos por substâncias associadas a nanocápsulas poliméricas.

Recentemente, alguns trabalhos têm investigado a utilização de aparatos de dissolução descritos nas farmacopeias, adaptados para a obtenção do perfil de liberação *in vitro* de substâncias a partir de sistemas nanoestruturados (HENG et al.; 2008; BHARDWAJ & BURGESS, 2010; ABDEL-MOTTALEB & LAMPRECHT, 2011; SIEVENS-FIGUEROA et al., 2012; ESPOSITO et al., 2013). Dentre as diversas abordagens, a utilização do aparato IV, as células de difusão, que consiste em um sistema que possibilita a renovação constante do meio de liberação empregado, tem se mostrado promissora para a obtenção de perfis de liberação de fármacos a partir de carreadores nanométricos (HENG et al., 2008; BHARDWAJ & BURGESS, 2010; SIEVENS-FIGUEROA et al., 2012).

Em vista do exposto, este trabalho teve como objetivo propor um novo sistema para a obtenção dos perfis de liberação *in vitro* de fármacos associados a nanocápsulas de núcleo lipídico, associando as vantagens da técnica convencional de diálise e o fluxo contínuo de meio de liberação, investigando quais as vantagens analíticas e

metodológicas do sistema proposto em relação ao sistema convencional de diálise comumente utilizado.

Os resultados deste trabalho deverão ser submetidos a um periódico a ser definido.

6.2 Manuscrito III

No presente trabalho foi proposta uma nova abordagem para a avaliação da liberação *in vitro* de fármacos associados a nanocápsulas de núcleo lipídico. Um sistema combinando renovação constante de meio de liberação e sacos de diálise foi desenvolvido para avaliar o perfil de liberação *in vitro* de diferentes suspensões de nanocápsulas de núcleo lipídico contendo prednisolona ou propionato de clobetasol como fármacos modelos.

O sistema proposto consiste em um aparato de vidro, com capacidade para aproximadamente 220 mL de meio de liberação, onde com o auxílio de uma bomba peristáltica, o meio de liberação é constantemente renovado durante todo o experimento. Sacos de diálise contendo 5 mL das formulações de nanocápsulas de propionato de clobetasol, prednisolona, ou formulações controles, contendo os fármacos em suas formas livres (soluções) foram mantidas no interior do aparato de vidro, sob condições controladas de temperatura e agitação magnética.

Para fins comparativos, foram conduzidos estudos de liberação *in vitro* com as mesmas formulações acima mencionadas, empregando a técnica convencional de sacos de diálise, em condições experimentais similares.

Foi possível discriminar os perfis de liberação *in vitro* da prednisolona e do propionato de clobetasol nanoencapsulados das soluções dos respectivos fármacos tanto quando o sistema de fluxo contínuo foi empregado, quanto quando a técnica convencional de diálise foi utilizada. Este resultado demonstra que o emprego da técnica proposta não traz prejuízos ao poder discriminativo entre formulações, quando estudos de liberação *in vitro* são conduzidos, tanto para fármacos com baixa eficiência de encapsulação, como a prednisolona, quanto para fármacos com alta eficiência de encapsulação, como o propionato de clobetasol.

Como vantagens do sistema de fluxo contínuo, proposto neste estudo, observamos que a estratégia foi capaz de melhorar a condição *sink* quando as diferentes formulações foram avaliadas, mantendo a concentração dos fármacos no meio de liberação mais afastadas da concentração de saturação em comparação a

técnica convencional de diálise. Esta observação é atribuída a renovação constante do meio de liberação, empregada na técnica proposta.

Ainda, pode-se observar que quando o sistema de fluxo contínuo é utilizado para a avaliação da liberação *in vitro* de fármacos associados a nanocápsulas de núcleo lipídico, problemas associados a erros durante a amostragem (coletas em diferentes zonas do meio de liberação) podem ser facilmente eliminados, visto que, no sistema proposto a coleta é realizada de forma constante e sem a interferência do analista durante todo o protocolo experimental.

O sistema de fluxo contínuo, proposto neste estudo, apresenta importantes vantagens analíticas e metodológicas para a avaliação da liberação *in vitro* de fármacos a partir de sistemas nanoestruturados. Ainda, podemos considerá-lo um protótipo de aparato automatizado para a realização da avaliação da liberação *in vitro* de fármacos associados a nanocápsulas poliméricas.

Por se tratar de material à ser submetido para a publicação, este texto explicativo substitui o manuscrito apresentado entre as páginas **99** e **138** da versão completa desta dissertação, atendendo a Resolução nº 002/2011 do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, visando preservar os direitos de publicação das editoras de periódicos científicos.

7. DISCUSSÃO

A partir dos resultados observados nos manuscritos apresentados nesta dissertação, foi possível compreender o impacto da associação de um corticosteróide de uso tópico, o propionato de clobetasol, a nanocápsulas de núcleo lipídico, integrando um nanomedicamento inovador, quando avaliada *in vitro* a permeação cutânea do fármaco a partir desta forma farmacêutica.

Ficou bastante claro que, quando associado às nanocápsulas de núcleo lipídico, o propionato de clobetasol é liberado gradativamente da forma farmacêutica semissólida e que quantidades menores do fármaco atingem as diferentes camadas da pele em relação à forma farmacêutica convencional, contendo o fármaco em sua forma livre; ainda, observou-se que a associação do fármaco ao nanocarreador, neste caso, não alterou a forma como o ativo se distribui entre o estrato córneo, epiderme e derme, ou seja, a distribuição percentual, ou ainda, as proporções do fármaco nas diferentes camadas da pele não são alteradas pela nanoencapsulação.

Também a partir das investigações conduzidas neste trabalho foi possível sugerir que a membrana de diálise (12 kDa) deve ser a membrana sintética de primeira escolha para a realização de estudos de liberação *in vitro* de fármacos associados a nanocápsulas poliméricas contidas em formulações semissólidas, quando a técnica de células de Franz é utilizada.

Foram empregadas nos estudos membranas de diálise, 12 kDa de cut-off, policarbonato, tamanho de poro de 0,05 μm e acetato de celulose, tamanho de poro de 0,45 μm , sendo estes tamanhos de poro declarados pelos fabricantes. Demonstrou-se pela combinação de diferentes técnicas analíticas que, dentre as membranas sintéticas analisadas com diferentes composições e diferentes características, a membrana de diálise foi a única capaz de evitar a passagem de nanopartículas da formulação para o meio receptor das células de Franz, evitando assim a superestimação da quantidade de fármaco liberado em função do tempo.

Este trabalho, particularmente, é de grande contribuição científica uma vez que não há nenhum outro trabalho descrito na literatura que avalie os materiais empregados para a obtenção dos perfis de liberação *in vitro* de fármacos associados à nanopartículas poliméricas em formulações semissólidas, usando o método de células de difusão de Franz.

Por fim, um novo método proposto para a realização de estudos de liberação *in vitro* de fármacos associados à nanocápsulas de núcleo lipídico mostrou-se adequado. A combinação entre a técnica convencional de diálise e a constante renovação do meio de liberação agregou vantagens analíticas e metodológicas para a realização dos estudos de liberação *in vitro* frente à técnica convencional de diálise.

O desenho de um aparato de liberação, produzido racionalmente para a realização deste estudo, foi eficiente para a obtenção de perfis de liberação de fármacos associados de diferentes formas às nanocápsulas poliméricas. Além disso, o sistema como um todo pode ser descrito como um protótipo semi-automatizado para a realização de estudos de liberação *in vitro* a partir de nanocápsulas poliméricas.

8. CONCLUSÃO

- Há redução na quantidade de propionato de clobetasol nas diferentes camadas da pele (estrato córneo, epiderme viável e derme) quando o fármaco é associado a nanocápsulas de núcleo lipídico e incorporado em um hidrogel de carbopol ultrez[®], em relação ao hidrogel contendo o propionato de clobetasol em sua forma livre;
- Não há alteração na distribuição percentual do propionato de clobetasol nas diferentes camadas da pele (estrato córneo, epiderme viável e derme) quando o fármaco é associado a nanocápsulas de núcleo lipídico e incorporado em um hidrogel de carbopol ultrez[®], em relação ao hidrogel contendo o propionato de clobetasol em sua forma livre;
- Membranas de diálise (12 kDa de cutoff) podem ser consideradas membranas sintéticas adequadas para a avaliação da liberação *in vitro* de fármacos a partir de hidrogéis contendo fármacos nanoencapsulados, quando a metodologia de células de difusão de Franz é empregada;
- O aparato proposto nesta dissertação, combinando sacos de diálise e fluxo contínuo de meio de liberação demonstrou-se adequado para a avaliação da liberação *in vitro* de fármacos a partir de nanocápsulas de núcleo lipídico;
- O aparato proposto nesta dissertação pode ser empregado como estratégia para a manutenção da condição *sink* em estudos de liberação *in vitro* a partir de suspensões contendo fármacos associados a nanocápsulas de núcleo lipídico;
- Ainda, o aparato proposto nesta dissertação pode ser considerado um protótipo de aparato automatizado para a realização de estudos de liberação *in vitro* de fármacos a partir de nanocápsulas poliméricas.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-MOTTALEB, M. M. A.; LAMPRECHT, A. Standardized in vitro drug release test for colloidal drug carriers using modified USP dissolution apparatus I. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 37(2), p. 178-184, 2011.

ALLEN, L. V. J.; POPOVICH, N. G.; ANSEL, H. C. *Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos* (8ª ed.), Artmed: Porto Alegre, Brasil, 2007.

ALMEIDA, J. S.; LIMA, F.; DA ROS, S.; BULHÕES, L. O. S.; CARVALHO, L. C.; BECK, R. C. R. Nanostructured systems containing rutin: *in vitro* antioxidant activity and photostability studies. *Nanoscale Research Letters*, v. 5, p. 1603-1610, 2010.

ATWOOD, D. Sistemas Dispersos in *Delineamento de Formas Farmacêuticas* (AUTON, M.E.) (2ª Ed.), Artmed: Porto Alegre, Brasil, 2005.

BAMRUNGSAP, S.; ZHAO, Z.; CHEN, T.; WANG, L.; LI, C.; FU, T.; TAN, W. Nanotechnology in therapeutics: a focus on nanoparticles as a drug delivery system. *Nanomedicine*, v. 7(8), p. 1253-1271, 2012.

BANCIU, M.; SCHIFFELERS, R. M.; FENS, M. H.; METSELAAR, J. M. STORM, G. Anti-angiogenic effects of liposomal prednisolone phosphate on B16 melanoma in mice. *Journal of Controlled Release*, v. 113, p. 1-8, 2006.

BENVEGNÚ, D. M.; BARCELOS, R. C. S.; BOUFLEUR, N.; PASE, C. S.; RECKZIEGEL, P.; FLORES, F. C.; OURIQUE, A. F.; DALLA NORA, M.; SILVA, C. B.; BECK, R. C. R.; BÜRGER, M. E. Haloperidol-loaded polysorbate-coated polymeric nanocapsules decrease its adverse motor side effects and oxidative stress markers in rats. *Neurochemistry International*, v. 61, p. 623-631, 2012.

BERNARDI, A.; BRAGANHOL, E.; JÄGER, E.; FIGUEIRÓ, F.; EDELWEISS, M. I.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S.; BATTASTINI, A. M. O. Indomethacin-

loaded nanocapsules treatment reduces *in vivo* glioblastoma growth in a rat glioma model. *Cancer Letters*, v. 281, p. 53-63, 2009.

BHARDWAJ, U. BURGESS, D. J. A novel USP apparatus 4 based release testing method for dispersed systems. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 388, p. 287-294, 2010.

DETONI, C. B.; SOUTO, G. D.; SILVA, A. L.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Photostability and skin penetration of different E-resveratrol-loaded supramolecular structures. *Photochemistry and Photobiology*, v. 88(4), p. 913-921, 2012.

DOUROUMIS, D.; ONYESOM, I.; MANIRUZZAMAN, M.; MITCHELL, J. Mesoporous silica nanoparticles in nanotechnology. *Critical Reviews in Biotechnology*, v. 33(3), p. 229-245, 2013.

D'SOUZA, S. S.; DELUCA, P. P. Methods to Assess *in vitro* Drug Release from Injectable Polymeric Particulate Systems. *Pharmaceutical Research*, v. 23(3), p. 460-474, 2006.

ESPOSITO, E.; MAZZITELLI, S.; CORTESI, R.; DRECHSLER, M.; RAVANI, L.; NASTRUZZI, C. Analysis of the Drug Release Profiles from Formulations Based on Micro and Nano Systems. *Current Analytical Chemistry*, v. 9, p. 37-46, 2013.

FERRONATO, K.; BRUXEL, F.; ARAÚJO, F. A.; TEIXEIRA, H. F.; KÖESTER, L. S. Emprego do método da bolsa de diálise da avaliação da liberação de fármacos a partir de emulsões submicrométricas. *Latin American Journal of Pharmacy*, v. 29(2), p. 313-320, 2010.

FIEL, L. A.; REBELO, L. M.; SANTIAGO, T. M.; ADORNE, M. D.; GUTERRES, S. S.; SOUSA J. S.; POHLMANN, A. R. Diverse deformation properties of polymeric nanocapsules and lipid-core nanocapsules. *Soft Matter*, v. 7, p. 7240-7247, 2011.

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, p. 254-263, 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. 70, p. 241-249, 2011.

FROZZA, R. L.; BERNARDI, A.; PAESE, K.; HOPPE, J. B.; SILVA, T.; BATTASTINI, A. M. O.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S.; SALBEGO, C. Characterization of trans-Resveratrol-Loaded Lipid-Core Nanocapsules and Tissue Distribution Studies in Rats. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, v. 6, p. 1-10, 2010.

GEORGE, J.; SAJEEVKUMAR, V. A.; RAMANA, K. V.; SABAPATHY, S. N.; SIDDARAMAIAH. Augmented properties of PVA hybrid nanocomposites containing cellulose nanocrystals and silver nanoparticles. *Journal of Materials Chemistry*, v. 22, p. 22433-22439, 2012.

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

HENG, D.; CUTLER, D. J.; CHAN, H.; YUN, J.; RAPER, J. A. What is a Suitable Dissolution Method for Drug Nanoparticles? *Pharmaceutical Research*, V 25 (7), p. 1696-1701, 2008.

HENRIKSEN, I.; SANDE, S. A.; SMISTAD, G.; AGREN, T.; KARLSEN, J. In vitro evaluation of drug release kinetics from liposomes by fractional dialysis. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 119, p. 231-238, 1995.

HITZMAN, C. J.; WIEDMANN, T. S.; DAI, H.; ELMQUIST, W. F. Measurement of Drug Release from Microcarriers by Microdialysis. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 94(7), p. 1456-1466, 2005.

HOFFMEINSTER, C. R. D.; DURLI, T. L.; SCHAFFAZICK, S. R.; RAFFIN, R. P.; BENDER, E. A.; BECK, R. C. R.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Hydrogels containing redispersible spray-dried melatonin-loaded nanocapsules: a formulation for transdermal-controlled delivery. *Nanoscale Research Letters*, v. 7, p. 251-263, 2012.

JÄGER, E.; VENTURINI, C. G.; POLETO, F.; COLOMÉ, L. M.; POHLMANN, J. P. U.; BERNARDI, A.; BATTASTINI, A. M. O.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R. Sustained release from lipid-core nanocapsules by varying the core viscosity and the particle surface area. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, v. 5, p. 130-140, 2009.

JAQUES, J. A. S.; REZER, J. F. P.; RUCHEL, J. B.; SOUZA, V. C. G.; PINHEIRO, K. V.; SCHLEMMER, K. B.; SCHLEMMER, J. B.; BERTOLDO, T. M. D.; MARTINS, N. M. B.; BERTONCHELI, C. M.; FONTANA, M. C.; BECK, R. C. R.; LEAL, D. B. R. An experimental model of contact dermatitis evaluation of the oxidative profile of Wistar rats treated with free and nanoencapsulated clobetasol. *Redox Report*, v. 17, p. 206-2013, 2012.

JIMÉNEZ, M. M.; PELLETIER, J.; BOBIN, M. F.; MARTINI, M. C.; FESSI, H. Poly-epsilon-caprolactone nanocapsules containing octyl methoxycinnamate: preparation and characterization. *Pharmaceutical Development and Technology*, v. 9(3), p. 329-339, 2004.

JORNADA, D. S.; FIEL, L. A.; BUENO, K.; GERENT, J. F.; PETZHOLD, C. L.; BECK, R. C. R.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R. Lipid-core nanocapsules: mechanism of self-assembly, control of size and loading capacity. *Soft Matter*, v. 8, p. 6646-6655, 2012.

KAUR, I. P.; BHANDARI, R.; BHANDARI, S.; KAKKAR, V. Potential of solid lipid nanoparticles in brain targeting. *Journal of Controlled Release*, v. 127, p. 97-109, 2008.

KSHIRSAGAR, S. J.; BHALEKAR, M. R.; PATEL, J. N.; MOHAPATRA, S. K.; SHEWALE, N. S. Preparation and characterization of nanocapsules for colon-targeted drug delivery system. *Pharmaceutical Development and Technology*, v. 17(5), p. 607-613, 2012.

KÜLKAMP-GUERREIRO, I. C.; BERLITZ, S. J.; CONTRI, R. V.; ALVES, L. R.; HENRIQUE, E. G.; BARREIROS, V. R. M.; GUTERRES, S. S. Influence of nanoencapsulation on the sensory properties of cosmetic formulations containing lipoic acid. *International Journal of Cosmetic Science*, v. 35, p. 105-111, 2013.

MANGEMATIN, V.; WALSH, S. The future of nanotechnologies. *Technovation*, v. 32, p. 157-60, 2012.

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

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

MORENO-BAUTISTA, G.; TAM, K. C. Evaluation of dialysis membrane process for quantifying the in vitro drug-release from colloidal drug carriers. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 389, p. 299-303, 2011.

OURIQUE, A. F.; MELERO, A.; SILVA, C. B.; SCHAEFER, U. F.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S.; LEHR, C.; KOSTKA, K.; BECK, R. C. R. Improved photostability and reduced skin permeation of tretinoin: Development of a semisolid nanomedicine. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 79, p. 95-101, 2011.

OURIQUE, A. F.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S.; BECK, R. C. R. Tretinoin-loaded nanocapsules: Preparation, physicochemical characterization, and photostability study. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 352, p. 1-4, 2008.

PAESE, K.; JÄGER, A.; POLETTO, F. S.; PINTO, E. F.; ROSSI-BERGMANN, B.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Semisolid Formulation Containing a Nanoencapsulated Sunscreen: Effectiveness, *In Vitro* Photostability and Immune response. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, v. 5, p. 1-7, 2009.

POHLMANN, A. R.; FONSECA, F. N.; PAESE, K.; DETONI, C. B.; CORADINI, K.; BECK, R. C. R.; GUTERRES, S. S. Poly(ϵ -caprolactone) microcapsules and nanocapsules in drug delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery*, v. 10, p. 623-638, 2013.

RANG, H. P.; DALE, M. M. *Rang & Dale Farmacologia* (7^a ed.), Elsevier: Rio de Janeiro, Brasil, 2007.

SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S.; FREITAS, L. L.; POHLMANN, A. R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para a administração de fármacos. *Química Nova*, v. 26(5), p. 726-737, 2003.

SIEVENS-FIGUEROA, L.; PANDYA, N.; BHAKAY, A.; KEYVAN, G.; MICHNIAK-KOHN, B.; BILGILI, E.; DAVÉ, R. N. Using USP I and USP IV for Discriminating Dissolution Rates of Nano- and Microparticle-Loaded Pharmaceutical Strip-Films. *AAPS PharmSciTech*, v. 13(4), p. 1473-1482, 2012.

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

SINKO, P. J. *Físico-Farmácia e Ciências Farmacêuticas* (5ª ed.), Artmed: Porto Alegre, Brasil, 2008.

STAGGERS, N.; MCCASKY, T.; BRAZELTON, N.; KENNEDY, R. Nanotechnology: The coming revolution and its implications for consumers, clinicians, and informatics. *Nursing Outlook*, v. 56(5), p. 268-274, 2008.

TAMESIS, M. E. B.; MORELLI, J. G. Vitiligo Treatment in Childhood: A State of the Art Review. *Pediatric Dermatology*, v. 27(5), p. 437-445, 2010.

TEMPARK, T.; PHATARAKIJNURUND, V.; CHATPROEDPRAI, S.; WATCHARASIND, S.; SUPORNSILCHAI, V.; WANANUKUL, S. Exogenous Cushing's syndrome due to topical corticosteroid application: case report and review literature. *Endocrine*, v. 38, p. 328-334, 2010.

TERROSO, T.; KÜLKAMP, I. C.; JORNADA, D. S.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Development of semi-solid cosmetic formulations containing coenzyme Q10-loaded nanocapsules. *Latin American Journal of Pharmacy*, v. 28(6), p.819-826, 2009.

US FDA, Guidance for Industry, Nonsterile semisolid dosage forms. *Scale-up and Post Approval Changes: Chemistry, manufacturing and controls; in vitro release*

testing and in vivo bioequivalence documentation, Center for Drug Evaluation and Research, Fishers Lane, Rockville, MD May, p. 1–37, 1997.

VAUTHIER, C.; BOUCHEMAL, K. Methods for the preparation and manufacture of polymeric nanoparticles. *Pharmaceutical Research*, v. 26(5), p. 1025-1058, 2009.

VENTURINI, C. G.; JÄGER, E.; OLIVEIRA, C. P.; BERNARDI, A.; BATTASTINI, A. M. O.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R. Formulation of lipid-core nanocapsules. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 375, p. 200-208, 2011.

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

XU, X.; KHAN, M. A.; BURGESS, D. J. A two-stage reverse dialysis in vitro dissolution testing method for passive targeted liposomes. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 426, p. 211-218, 2012.

ZANOTTO-FILHO, A.; CORADINI, K.; BRAGANHOL, E.; SCROEDER, R.; OLIVEIRA, C. M.; SIMÕES-PIRES, A.; BATTASTINI, A. M. O.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S.; FORCELINI, C. M.; BECK, R. C. R.; MOREIRA, J. C. F. Curcumin-loaded lipid-core nanocapsules as a strategy to improve pharmacological efficacy of curcumin in glioma treatment. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 83(2), p. 156-167, 2013.