

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

Incorporação de nanocápsulas contendo capsaicinóides em hidrogel de quitosana destinado ao uso tópico: caracterização das formulações e estudo de liberação *in vitro*.

RENATA VIDOR CONTRI

PORTO ALEGRE, 2010

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

Incorporação de nanocápsulas contendo capsaicinóides em hidrogel de quitosana destinado ao uso tópico: caracterização das formulações e estudo de liberação *in vitro*.

Dissertação apresentada por
Renata Vidor Contri para obtenção
de GRAU DE MESTRE em Ciências
Farmacêuticas

Orientador: Dr^a. Silvia Stanisçuaski Guterres

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas em nível de Mestrado – Produção e Controle de Qualidade de Produtos Farmacêuticos – da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 20.11.2009 pela Comissão Examinadora constituída por:

Prof^a. Dr^a. Ângela Machado de Campos
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Hélder Ferreira Teixeira
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof^a. Dr^a. Teresa Dalla Costa
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

C764i Contri, Renata Vidor
Incorporação de nanocápsulas contendo capsaicinóides em hidrogel de quitosana destinado ao uso tópico: caracterização das formulações e estudo de liberação in vitro / Renata Vidor Contri. – Porto Alegre: UFRGS, 2010. – xx, 97 p. : il.

Dissertação (mestrado). UFRGS. Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Capsaicinóides. 2. Nanocápsulas. 3. Quitosana. 4. Reologia. 5. Liberação controlada de fármacos. I. Guterres, Sílvia Stanisçuaski. II. Título.

CDU: 615.4

Bibliotecárias responsáveis:
Margarida Maria Cordeiro Fonseca Ferreira – CRB 10/480
Heloísa do Canto Canabarro – CRB 10/1036

Este trabalho foi realizado no Laboratório 405 da Faculdade de Farmácia e no Laboratório K204 do Instituto de Química, ambos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, com financiamento da CAPES.

“A perseverança é a mãe da boa sorte”
(Miguel de Cervantes)

AGRADECIMENTOS

À professora Silvia Stanisçuaski Guterres não somente pela orientação, mas também pelo carinho e pela atenção.

À professora Adriana Raffin Pohlmann pelas importantes contribuições prestadas.

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

Aos professores e funcionários desta Universidade pela colaboração direta ou indireta.

A CAPES, órgão financiador da bolsa de pesquisa, e a Rede de Nanocosméticos (CNPq) pelo apoio financeiro para realização deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório 405 da Faculdade de Farmácia e do Laboratório k 204 do Instituto de Química pela ajuda, companhia e amizade.

À Luana Almeida Fiel pela duradoura amizade e também pelo auxílio e incentivo.

A Moacir Kaiser pela grande ajuda, constante presença e amor.

À minha irmã, Flávia, por se fazer presente, mesmo quando distante.

A meus pais, Clóvis e Salete, pelo amor e por sempre apoiarem os estudos.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO

Figura 1. Estrutura química da capsaicina e da dihidrocapsaicina.....	11
Figura 2. Estrutura química da quitina e da quitosana.....	17

CAPÍTULO I

Figure 1. Chemical structure of capsaicin and dihydrocapsaicin.....	29
Figure 2. TEM images of capsaicinoids-loaded nanocapsules and unloaded nanocapsules.....	37
Figure 3. Multiple light scattering profiles of capsaicinoids-loaded nanocapsules and unloaded nanocapsules.....	38
Figure 4. Release profile of capsaicin and dihydrocapsaicin from hydroalcoholic solution, micellar solution, nanoemulsion and nanocapsules.....	41

CAPÍTULO II

Figure 1. Shear stress vs. shear rate graphs of chitosan hydrogels.....	61
Figure 2. Shear stress vs. shear rate graph of chitosan hydrogels with and without nanocapsules.....	65
Figure 3. Transmission electron microscopy of chitosan hydrogels with and without nanocapsules.....	66
Figure 4. Light backscattering analyses of chitosan hydrogel containing nanocapsules.....	67
Figure 5. Capsaicin and dihydrocapsaicin release profiles from hydrogels containing hydroalcoholic solution, micellar solution and nanocapsules.....	68

ANEXO I

Figura 1. Cromatograma referente aos capsaicinóides.....	85
Figura 2. Curva de calibração média da linearidade para capsaicina e dihidrocapsaicina.....	86
Figura 3. Especificidade do método.....	90

ANEXO II

Figura 4. Caracterização das suspensões de nanocápsulas (diâmetro médio, polidispersão, potencial zeta e pH).....	94
Figura 5. Análise por espalhamento múltiplo de luz das suspensões de nanocápsulas.....	95

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Table 1. Z-average sizes, PDI indices, zeta potential and pH values over storage of nanocapsules.....	38
Table 2. Parameters obtained from mathematical modeling for capsaicin.....	42
Tabel 3. Parameters obtained from mathematical modeling for dihydrocapsaicin.	43

CAPÍTULO II

Table 1. Components of the chitosan hydrogels	57
Table 2. pH values, consistence and flow indices of chitosan hydrogels.....	62
Table 3. Determination coefficients for various flow models.....	63
Table 4. pH values, consistence and flow indices of chitosan hydrogels with and without nanocapsules.....	64

ANEXO I

Tabela 1. ANOVA da linearidade para quantificação de capsaicina.....	87
Tabela 2. ANOVA da linearidade para quantificação de dihidrocapsaicina.....	87
Tabela 3. Precisão do método para quantificação de capsaicina.....	88
Tabela 4. Precisão do método para quantificação de dihidrocapsaicina.....	88
Tabela 5. Exatidão do método para quantificação de capsaicina.....	89
Tabela 6. Exatidão do método para quantificação de dihidrocapsaicina.....	89
Tabela 7. Estudo de fotoestabilidade dos capsaicinóides.....	91

ANEXO II

Tabela 8. Componentes das diferentes formulações de nanocápsulas.....	92
Tabela 9. Quantidades utilizadas para obtenção das nanocápsulas.....	93
Tabela 10. Teor de capsaicina e dihidrocapsaicina nas suspensões de nanocápsulas.....	96
Tabela 11. Taxa de associação dos capsaicinóides às nanocápsulas.....	96

RESUMO

Objetivos: Desenvolver e caracterizar hidrogéis de quitosana contendo capsaicinóides nanoencapsulados, bem como analisar o efeito das nanocápsulas e do veículo nos perfis de liberação dos capsaicinóides. **Metodologia:** As nanocápsulas foram obtidas (método de deposição interfacial do polímero pré-formado) utilizando Eudragit[®] RS100 e triglicerídeos do ácido cáprico/caprílico como parede polimérica e núcleo oleoso, respectivamente, e foram caracterizadas. Para determinação do teor e da taxa de associação da capsaicina e dihidrocapsaicina às nanocápsulas utilizou-se metodologia validada por CLAE-UV. As nanocápsulas contendo capsaicinóides foram incorporadas em hidrogel de quitosana. Para tanto, determinaram-se previamente as características reológicas e o hidrogel ideal para uso tópico. Através dos estudos de liberação *in vitro*, utilizando método de saco de diálise, foram obtidos os perfis de liberação dos fármacos a partir das nanocápsulas e destas incorporadas no veículo semissólido. **Resultados e Discussão:** As nanocápsulas apresentaram diâmetro médio de partícula de 153 ± 7 nm (PDI < 0,2), potencial zeta de $+ 9,62 \pm 1,48$ mV, pH de $5,7 \pm 0,1$ e uma leve tendência à sedimentação, típica de suspensões. A nanoencapsulação dos capsaicinóides não provocou alterações nas características da formulação. O teor e a taxa de associação foram próximos a 100% para ambos capsaicinóides, considerando concentração de 0,5mg/mL de capsaicinóides na formulação. Foi possível obter um hidrogel de quitosana contendo nanocápsulas adequado para uso tópico. Previamente, observou-se uma grande influência da concentração de quitosana na consistência dos hidrogéis e um comportamento reológico pseudoplástico que não foi alterado pela adição das nanocápsulas. Observou-se uma liberação controlada devido à nanoencapsulação, de modo que dihidrocapsaicina foi liberada mais lentamente do que a capsaicina. Pode-se observar um retardo na liberação da capsaicina, quando as nanocápsulas foram incorporadas no hidrogel. **Conclusões:** Nanocápsulas estáveis e capazes de controlar a liberação dos capsaicinóides foram obtidas, sendo que tanto o núcleo oleoso quanto o polímero são responsáveis pelo controle da liberação. A formulação semissólida contendo nanocápsulas, obtida a partir do polímero quitosana, manteve a liberação controlada observada e apresentou adequadas características para aplicação tópica.

Palavras chave: Capsaicinóides, nanocápsulas, quitosana, reologia, liberação *in vitro*.

ABSTRACT

Incorporation of nanocapsules containing capsaicinoids in chitosan hydrogels intended for topical delivery: characterization and *in vitro* release study.

Purpose: To develop and characterize chitosan hydrogels containing nanoencapsulated capsaicin and dihydrocapsaicin, as well as to analyze the effect of the nanocapsulation and the vehicle on the *in vitro* release of the capsaicinoids.

Methodology: Nanocapsules were obtained (interfacial deposition of the pre-formed polymer method) using Eudragit® RS100 and capric/caprylic triglycerids as the polymeric shell and oily core, respectively, and they were characterized. An HPLC-UV validated method was used to determine the drug content and drug encapsulation efficiency. The nanocapsules containing capsaicinoids were incorporated in a chitosan hydrogel. Previously, the rheological properties and the most suitable hydrogel aiming the topical delivery were determined. By means of *in vitro* release experiments (dialyses bags), the release profiles of the capsaicinoids from the nanocapsules and the gel containing nanocapsules were obtained. **Results**

and Discussion: The nanocapsule formulation presented an average diameter of $153 \pm 7\text{nm}$ ($\text{PDI} < 0.2$), the zeta potential was $+9.62 \pm 1.48\text{ mV}$, and the pH 5.7 ± 0.1 . A slight tendency to sedimentation was observed, typical of suspensions. The drug encapsulation did not alter the formulation properties. The drug content and encapsulation efficiency were nearly 100% for both capsaicinoids, considering a drug amount of 0.5mg/mL of capsaicinoids in the formulation. A chitosan hydrogel containing nanocapsules were successfully obtained. The chitosan concentration significantly influenced the consistence of the formulations, and the pseudoplastic behavior did not change after the nanocapsule incorporation. A controlled release was observed due to nanoencapsulation, in a way that capsaicin released faster than dihydrocapsaicin. The release of capsaicin from the hydrogel containing nanocapsules presented a delay in comparison with the release from the nanocapsule suspension. **Conclusions:** Stable nanocapsules capable of controlling the capsaicinoids release were obtained. Both the oily core and the polymeric shell are responsible for the controlled release. The semi-solid formulation containing nanocapsules obtained with the polymer chitosan maintained the controlled release and presented suitable properties for cutaneous applications.

Keywords: Capsaicinoids, nanocapsules, chitosan, rheology, *in vitro* release.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	5
3. REVISÃO	9
3.1. Capsaicinóides.....	11
3.2. Nanocápsulas e aplicação cutânea.....	12
3.3 Estudos de liberação a partir de nanopartículas.....	14
3.4. Hidrogéis de quitosana.....	16
3.5. Referências.....	20
4. <i>CAPÍTULO I. Controlled release of capsaicinoids co-encapsulated within polymeric nanocapsules</i>	25
Abstract.....	28
4.1. Introduction.....	29
4.2. Materials and Methods.....	31
4.2.1. Materials.....	31
4.2.2. Validation of the analytical method.....	31
4.2.3. Saturation concentration of capsaicinoids in capric/caprylic triglycerides...	31
4.2.4. Preparation of the nanocapsule formulation.....	32
4.2.5. Nanocapsule characterization.....	32
4.2.6. Drug content and entrapment in the nanocapsules.....	33
4.2.7. <i>In vitro</i> release study.....	33
4.2.8. Mathematical modeling	34
4.2.8.1. <i>Model independent method</i>	34
4.2.8.2. <i>Semi-empirical models</i>	34
4.2.8.3. <i>Fick's first law</i>	35
4.2.8.4. <i>Drug release mechanism from the nanocapsules</i>	35
4.2.9. Statistical analyses	35
4.3. Results and Discussion.....	36
4.3.1. Co-encapsulation of capsaicinoids within nanocapsules.....	36

4.3.2. Drug release profiles and mathematical modeling.....	39
4.4. Conclusions.....	45
4.5. References.....	46
5. <i>CAPÍTULO II. Chitosan hydrogel containing capsaicinoids-loaded nanocapsules: an innovative formulation for topical delivery</i>	49
Abstract.....	52
5.1. Introduction.....	53
5.2. Materials and Methods.....	55
5.2.1. Materials.....	55
5.2.2. Preparation of chitosan hydrogels.....	55
5.2.3. Characterization of chitosan hydrogels.....	55
5.2.4. Determination of the most suitable gel for topical application.....	57
5.2.5. Preparation of nanocapsule suspension and incorporation in the chitosan gel.....	57
5.2.6. Characterization of the chitosan hydrogel containing nanocapsules.....	58
5.2.7. Effect of the hydrogel in the Eudragit® RS100 stability.....	58
5.2.8. <i>In vitro</i> release study.....	59
5.2.9. Statistical analyses.....	59
5.3. Results and Discussion.....	60
5.3.1. Characterization of chitosan hydrogels.....	60
5.3.2. Determination of the most suitable gel for topical application.....	63
5.3.3. Effect of the hydrogel in the Eudragit® RS100 stability.....	63
5.3.4. Properties of the chitosan hydrogel containing nanocapsules.....	64
5.3.5. <i>In vitro</i> release study.....	67
5.4. Conclusions.....	69
5.5. References.....	69
6. <i>DISCUSSÃO</i>	73
7. <i>CONCLUSÕES</i>	79
8. <i>ANEXOS</i>	83

8.1. Validação de método analítico para quantificação dos capsaicinóides a partir de suspensão de nanocápsulas e de hidrogel de quitosana contendo suspensão de nanocápsulas.....	85
8.1.1. Linearidade.....	86
8.1.2. Limites de detecção e de quantificação.....	87
8.1.3. Precisão intradia e interdía.....	87
8.1.4. Exatidão.....	88
8.1.5. Especificidade.....	89
8.1.6. Estudo de fotoestabilidade dos capsaicinóides.....	91
8.2. Preparação de suspensões de nanocápsulas contendo capsaicinóides: Determinação da melhor formulação para os estudos.....	92
8.3. Referências.....	97

1. INTRODUÇÃO

A quitina é o segundo biopolímero mais abundante no planeta, sendo que o exoesqueleto dos crustáceos marinhos é a sua principal fonte industrial (VÅRUM e SMIDSRØD, 2005). Quando o grau de desacetilação alcalina da quitina alcança 50% ou mais, ela se torna solúvel em meio aquoso ácido e é chamada de quitosana. A quitosana é o único polímero pseudonatural catiônico e apresenta importantes propriedades como biocompatibilidade, biodegradabilidade e bioadesividade. Há um crescente interesse por este biopolímero em diversas áreas de pesquisa, principalmente a de tecnologia farmacêutica (RAVI KUMAR, 2000; RINAUDO, 2006). A interligação entre as cadeias da quitosana permite a obtenção de hidrogéis. Estas formulações semissólidas apresentam diversas aplicações na área farmacêutica, para diferentes vias de administração, como liberação controlada de fármacos através da via oral, nasal e intramuscular. Devido a suas interessantes propriedades como formação de filme, potencial bacteriostático, promotor de regeneração da pele e promotor da permeação cutânea, tais hidrogéis apresentam grande potencialidade para aplicação sobre a pele e as mucosas (BERGER *et al.*, 2004^a, BERGER *et al.*; 2004^b).

As nanopartículas, partículas com tamanho menor que 1µm, apresentam uma enorme potencialidade que justificam sua aplicação tanto no uso de ativos de aplicação cutânea quanto para outras vias de administração de fármacos. Considerando a via tópica, podem ser citadas vantagens como a diminuição da irritação e alergenicidade cutânea, da fotoinstabilidade e da oxidação do fármaco, bem como a possível diminuição de odores desagradáveis. A liberação controlada pode diminuir a necessidade de repetidas aplicações, bem como aumentar a quantidade de fármaco disponível no local de ação desejado (GUTERRES *et al.*, 2007).

A incorporação de sistemas de liberação controlada nanoparticulados em hidrogéis de quitosana visando à aplicação tópica é de grande potencialidade, pois representa uma associação inovadora e promissora, conjugando as vantagens dos dois sistemas. O hidrogel de quitosana, devido a sua capacidade de formação de filme e sua bioadesividade, garante uma liberação homogênea e sem perdas do fármaco. As nanocápsulas, por sua vez, garantem uma liberação controlada e prolongada, além de promover proteção a fármacos lábeis (SHAFFAZICK *et al.*,

2003; VALENTA e AUNER, 2004). Este trabalho visa à incorporação de nanocápsulas contendo fármaco analgésico local utilizado topicamente para tratamento de dores crônicas, a capsaicina (trans-8-metil-N-vanilil-6-nonenamida) em um hidrogel de quitosana, bem como a caracterização do sistema obtido.

Após aplicações repetidas da capsaicina na pele, o local apresenta diminuição da sensibilidade e bloqueio a estímulos dolorosos, resultando em dessensibilização ou lesão irreversível da fibra, dependendo das doses e da duração da exposição (KNOTKOVA *et al.*, 2008). A substância em questão se encontra comercialmente disponível na forma de uma mistura de capsaicinóides, sendo que 90% do total é composto de capsaicina e dihidrocapsaicina. Ambos possuem ação analgésica tópica. A incorporação destes fármacos em nanocápsulas se apresenta potencialmente viável devido ao fato de serem substâncias lipofílicas empregadas em doses baixas. Além disso, uma liberação controlada destes fármacos no local de ação é desejada, visto que os mesmos podem provocar irritação e sensação de queimação na pele e são necessárias aplicações numerosas para o efeito desejado (BARCELOUX, 2008; HAYMAN e KAM, 2008). Nanocápsulas de capsaicina em suspensões aquosas foram previamente obtidas por métodos de coacervação simples e complexa, sendo que a gelatina foi usada como material polimérico (WANG *et al.*, 2008; XING *et al.*, 2004).

Desta forma, o presente trabalho tem por objetivo a inédita co-nanoencapsulação de capsaicinóides pelo método de deposição interfacial de polímero pré-formado e o estudo de liberação *in vitro* das substâncias ativas antes e após a incorporação no veículo semissólido constituído por hidrogel de quitosana. Após a descrição dos objetivos deste trabalho, encontra-se a revisão do tema e na seqüência os métodos e resultados experimentais, que foram organizados em capítulos, correspondendo aos manuscritos prontos para submissão.

2. OBJETIVOS

GERAL

Desenvolvimento e caracterização físico-química de hidrogéis de quitosana contendo capsaicinóides nanoencapsulados.

ESPECÍFICOS

- Desenvolvimento e caracterização de suspensões de nanocápsulas contendo capsaicinóides (capsaicina e dihidrocapsaicina), quanto ao potencial zeta, diâmetro médio, índice de polidispersão, pH, morfologia e tendência à instabilidade física;
- Determinação do teor de capsaicinóides na formulação, da taxa de encapsulação dos mesmos às nanocápsulas e da presença de cristais de fármaco, através de CLAE-UV.
- Preparação, caracterização e estudo reológico de hidrogéis de quitosana destinados à aplicação tópica bem como a incorporação da suspensão de nanocápsulas contendo capsaicinóides no referido hidrogel;
- Estudos de liberação *in vitro* dos capsaicinóides a partir das nanocápsulas antes e após a incorporação no veículo semissólido proposto.

3. REVISÃO

3.1. Capsaicinóides

Os capsaicinóides são as substâncias responsáveis pelo sabor picante das pimentas do gênero *Capsicum*. Os principais capsaicinóides, que juntos representam em torno de 90% do total, são a capsaicina e a dihidrocapsaicina (Fig. 1). São substâncias muito irritantes para pele e mucosas. Estes capsaicinóides se diferem apenas por uma ligação dupla presente na cadeia alifática da capsaicina que é um pouco menos lipofílica ($\log P = 3.5$) que a dihidrocapsaicina ($\log P = 3.8$) (HAYMAN e KAM, 2008), P representando o coeficiente de partição octanol/água.

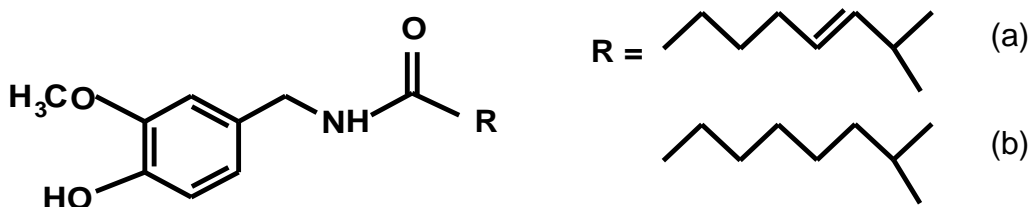


Figura 1. Estrutura química da capsaicina (a) e dihidrocapsaicina (b).

A capsaicina é um fármaco analgésico usado topicamente no tratamento de dores de origem neuropática como osteoartrite, artrite reumatóide, neuropatia diabética e neuralgia pós-herpética, bem como no tratamento sintomático da psoríase (ZI *et al.*, 2008). Tal substância se liga a um receptor específico dos nervos periféricos, TRPV1, levando a um influxo de cálcio e liberação de neuropeptídeos inflamatórios, o que está associado com as propriedades irritantes da capsaicina. Além disso, a liberação aguda da substância P leva a uma hiperalgesia inicial, que com a continuidade do tratamento é seguida por depleção de tal substância. Após aplicações repetidas por período variável, o local apresenta diminuição da sensibilidade e bloqueio a estímulos dolorosos, resultando em dessensibilização (reversível com a suspensão de uso) ou lesão irreversível da fibra, dependendo das doses e da duração da exposição (ERIN *et al.*, 2008; HAYMAN e KAM, 2008).

A formulação comercial de capsaicina se encontra na forma de pomada contendo 0,025 ou 0,075% de ativo. Recentemente foi aprovado pelo FDA um adesivo dérmico de capsaicina contendo altas concentrações de ativo, para casos

de neuralgia pós-herpética. Em um estudo de caso III que antecedeu a aprovação, os principais efeitos adversos relatados foram eritema, dor e prurido durante ou logo após o uso do adesivo (<http://www.medcenter.com/Medline>, acesso em 13 nov. 2009).

A incorporação deste fármaco em nanocápsulas, juntamente com a dihidrocapsaicina que também apresenta ação analgésica tópica, representa, em hipótese, uma alternativa interessante para liberação controlada dos fármacos no local de ação, diminuindo o número repetido de aplicações necessárias e a irritabilidade provocada pelos capsaicinóides na pele, que frequentemente contribuem para o abandono do tratamento (BARCELOUX, 2008; KNOTKOVA *et al.*, 2008). Tal incorporação em nanocápsulas se apresenta viável uma vez que são substâncias lipofílicas que possuem efeito em baixas concentrações.

Suspensões de nanocápsulas contendo capsaicina foram previamente obtidas por métodos de coacervação simples e complexa sendo que a gelatina foi usada como material polimérico (WANG *et al.*, 2008; XING *et al.*, 2004). Entretanto, os trabalhos trazem poucos dados sobre a liberação da substância ativa a partir das nanocápsulas obtidas, e o uso de gelatina para a produção de nanocápsulas é geralmente seguido do uso de um reticulante tóxico e, portanto, um novo passo de purificação se faz necessário.

3.2. Nanocápsulas e aplicação cutânea

O controle da liberação de fármacos em sítios de ação específicos, através da utilização de vetores, capazes de permitir a otimização da velocidade de cedência e do regime de dosagem das substâncias tem sido uma área de intensa pesquisa nos últimos anos. Tais sistemas carreadores de fármacos podem ser micropartículas ou sistemas coloidais como lipossomas, nanopartículas poliméricas ou nanopartículas lipídicas sólidas. Nanopartículas poliméricas incluem nanocápsulas e nanoesferas. As primeiras se caracterizam pela presença de um núcleo oleoso, envolto por uma parede de polímero. As nanocápsulas poliméricas podem servir de reservatório para fármacos lipofílicos, prolongando o efeito por retardar a liberação (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

As nanocápsulas, juntamente com outras nanopartículas, apresentam grande aplicabilidade para a via tópica. As nanocápsulas para aplicação cutânea são preparadas a partir de um polímero e de um óleo biocompatíveis, e apresentam diâmetro entre 200 e 300 nm. São geralmente preparadas por técnicas de deposição interfacial do polímero pré-formado ou emulsificação-difusão. Exemplos de polímeros utilizados incluem a poli(ϵ -caprolactona) e a quitosana, enquanto o núcleo oleoso é frequentemente composto de triglicerídeos do ácido cáprico/caprílico ou o flitro solar, metoxicinamato de octila (GUTERRES *et al.*, 2007). Novos óleos que apresentam boas propriedades para aplicação cutânea estão sendo propostos para compor o núcleo oleoso de nanocápsulas (ALMEIDA *et al.*, 2009). Almeida e colaboradores (2009) prepararam e caracterizaram nanocápsulas contendo óleo de semente de uva e óleo de amêndoas.

Diversas são as vantagens da aplicação cutânea de substâncias ativas quando nanoencapsuladas. Entre elas, pode-se citar a diminuição da irritação e alergenicidade cutânea, da fotoinstabilidade e da oxidação do fármaco, bem como a possível diminuição de odores desagradáveis. A liberação controlada pode diminuir a necessidade de aplicações repetidas, bem como aumentar a quantidade de fármaco disponível no local de ação desejado (GUTERRES *et al.*, 2007).

A aplicação de produtos tópicos está ligada a viscosidade do produto final. Produtos de baixa viscosidade são difíceis de aplicar e há perda do produto. Trabalhos recentes têm se dedicado a incorporação de nanocápsulas em veículos semissólidos e a sua caracterização reológica (ALVES *et al.*, 2007; PAESE, *et al.*, 2009). A reologia é a parte da físico-química que trata da deformação dos sistemas líquidos, sólidos e semissólidos. A caracterização reológica dos fluídos semissólidos permite conclusões a respeito da espalhabilidade do produto na pele, da fluidez, e do sensorial, entre outras características importantes no desenvolvimento tecnológico (ORTEGA e NETZ, 2002). No que se refere ao comportamento reológico de semissólidos contendo sistemas nanoestruturados como lipossomas, nanocápsulas, nanoesferas e ciclodextrinas, estes geralmente apresentam um comportamento não newtoniano pseudoplástico ou plástico. Tais comportamentos são caracterizados por uma diminuição da viscosidade com o aumento da taxa de cisalhamento aplicada. Porém, o que os diferencia é a necessidade que os fluidos

plásticos apresentam de uma força prévia para começar a fluir. O comportamento pseudoplástico é o mais comumente atribuído para géis e emulsões de uso farmacêutico e cosmético (ALVES, 2006).

3.3. Estudos de liberação a partir de nanopartículas

A liberação de fármacos a partir de nanopartículas é geralmente governada por diferentes processos e geralmente envolve mais de um deles. A substância pode se difundir através da matriz (para o caso de sistemas matriciais) ou através do núcleo oleoso e da parede polimérica (para o caso de nanocápsulas) com ou sem solubilização prévia devido à penetração de solvente na partícula. Também o nanocarreador pode ser degradado ou dissolvido pelo meio (WASHINGTON, 1990). Muitos métodos podem ser usados para se estudar a liberação de substâncias a partir de sistemas coloidais incluindo o uso de células de difusão, de sacos de diálise ou de técnica de ultrafiltração- centrifugação. Porém, há algumas dificuldades técnicas no estudo *in vitro* da liberação a partir de nanopartículas, entre elas a necessidade de separação destas e do meio de liberação. O método de saco de diálise é um método simples que evita necessidade de tal separação (SOPPIMATH *et al.*, 2001). É um método bastante útil na comparação de diferentes sistemas, mas apresenta algumas limitações como a membrana de diálise, que pode retardar ainda mais a liberação para o meio externo.

Ferranti e colaboradores (1999) estudaram o perfil de liberação *in vitro* da primidona a partir de nanocápsulas preparadas com poli(ϵ -caprolactona). As nanocápsulas foram colocadas em dissolutores contendo meio ácido e básico. O método utilizado foi de ultrafiltração-centrifugação seguido por CLAE-UV. Como controle, foi utilizado uma solução padrão de primidona em álcool benzílico. Foi observado um maior controle da liberação a partir das nanocápsulas quando em comparação ao controle.

A influência de diversos parâmetros da obtenção de nanoesferas contendo fármaco antitumoral foi estudada por Chouan e colaboradores (2009). Foi observado que com o aumento da quantidade de fármaco associado às nanopartículas acelerar-se a liberação do fármaco, o mesmo ocorrendo aumentando-se a quantidade de

reticulador no sistema até uma concentração máxima de 1,06mM, ocorrendo após esse valor inversão do efeito. A concentração do monômero influencia, de maneira não proporcional, a liberação do fármaco. Maior liberação foi observada para um valor de pH de 7.4 e uma temperatura de 25 °C em comparação a valores de pH de 1,8 e 8,4 e temperaturas de 37 e 12 °C. O teste foi realizado colocando-se nanopartículas secas em um tubo teste contendo tampão fosfato pH 7,4 como meio de liberação. Em tempos pre-determinados foi retirada uma alíquota do sobrenadante e esta analisada espectrofotometricamente.

Nanopartículas poliméricas, preparadas a partir de polietilenoglicol e poloxamer 407 através da técnica de fotopolimerização emulsificação inversa, foram estudadas quanto ao perfil de liberação do fármaco doxorubicina pela técnica de sacos de diálise (MISSIRLIS *et al.*, 2006). O fármaco livre ou encapsulado foi colocado na membrana e imerso em 50 mL de tampão fosfato. O dialisado foi retirado em tempos pré-determinados e analisado por CLAE-fluorescência. O controle utilizado foi uma solução do fármaco em clorofórmio contendo trietanolamina, que é a mesma solução utilizada para a encapsulação às nanopartículas brancas previamente obtidas. Como resultados obtiveram, por meio da nanoencapsulação, uma liberação *in vitro* sustentada por até uma semana.

Ajun e colaboradores (2009) estudaram a obtenção e caracterização de nanopartículas de quitosana contendo simultaneamente aspirina e probucol. Foram utilizados tubos contendo as nanopartículas e tampão fosfato como meio de liberação. Em tempos pré-determinados, alíquotas foram retiradas e o sobrenadante separado por centrifugação. A quantidade de ambos os fármacos foi analisada por espectrofotometria. Observou-se um efeito da quantidade do reticulante no aumento da liberação a partir das nanopartículas devido ao aumento do tamanho e a maior facilidade para penetração do meio de liberação. O perfil de liberação dos fármacos não foi significativamente alterado variando-se a quantidade inicial de fármaco associada às nanopartículas. Os fármacos se apresentaram diferentemente associados às nanocápsulas. A aspirina está ligada eletrostaticamente aos grupamentos amina e carboxila, e o probucol está fisicamente aprisionado na rede polimérica. O aumento do peso molecular da quitosana apresentou influência somente na liberação da aspirina, dificultando sua liberação.

Uma grande dificuldade observada nos estudos de liberação de substâncias lipofílicas a partir de sistemas nanoestruturados é a determinação do controle utilizado para verificar a influência da associação às nanopartículas no perfil de liberação do fármaco. O ideal é manter o mesmo meio no qual as nanopartículas se encontram, para não haver influência do solvente no estudo. Devido a tal dificuldade, diversos estudos que apresentam perfil de liberação *in vitro* não fazem menção ao efeito das nanopartículas na liberação, mas sim ao efeito de outros parâmetros que podem ser variados durante a obtenção dos nanocarreadores.

3.4. Hidrogéis de quitosana

Hidrogéis são redes poliméricas tridimensionais que absorvem grandes quantidades de água enquanto permanecem insolúveis devido a interligações entre as cadeias individuais do polímero (LIN e METTERS, 2006). Os mais importantes e conhecidos polímeros formadores de hidrogéis são derivados do ácido poliacrílico, como carbômeros, e diferentes derivados da celulose, como a hidroxietilcelulose (VALENTA e AUNER, 2004). Hidrogéis podem ser preparados a partir de polímeros naturais ou sintéticos ou ainda podem ser uma combinação de ambos (HIN, 2004). Entre os polímeros naturais mais usados na preparação de hidrogéis pode-se citar o alginato de cálcio e sódio, o colágeno, a gelatina, o ácido hialurônico, a goma xantana e a quitosana (LIN e METTERS, 2006).

A quitina (Fig. 2a), polissacarídeo de β -D-glicose contendo grupamentos amino na sua estrutura, é um componente estrutural chave de helmintos, artrópodes e fungos. É o segundo polímero biológico mais abundante no planeta e o exoesqueleto dos crustáceos marinhos é a sua principal fonte industrial (VÅRUM e SMIDSRØD, 2005). Quando o grau de desacetilação alcalina da quitina alcança 50% (dependendo da origem do polímero), se torna solúvel em meio aquoso ácido e é chamado de quitosana (Fig. 2b). A quitosana é o único polímero pseudonatural catiônico e apresenta propriedades como biocompatibilidade, biodegradabilidade, mucoadesividade, atividade bacteriostática e capacidade de formação de filme e de regeneração de tecidos lesados. Este biopolímero apresenta aplicações nas áreas

biomédicas, de cosméticos, de tecnologia alimentícia e de tecnologia farmacêutica (RAVI KUMAR, 2000; RINAUDO, 2006).

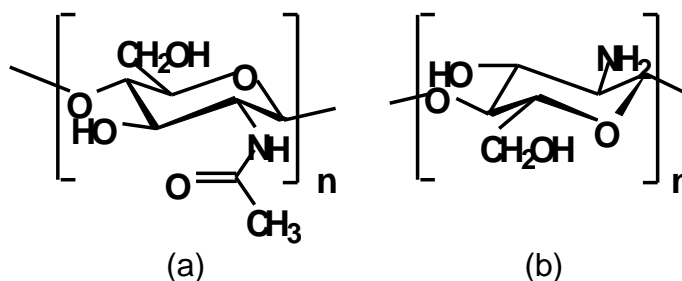


Figura 2. Representação da estrutura química (a) da quitina [poli(N-acetil- β -D-glucosamina)] e (b) de seu derivado quitosana [poli(D-glucosamina)].

A partir de interligações entre as cadeias da quitosana é possível a obtenção de hidrogéis. Nos hidrogéis de quitosana obtidos através da solubilização do biopolímero em meio aquoso ácido, e posterior agitação, interações secundárias são estabelecidas entre as cadeias do polímero. Este método, que é a maneira mais simples de se obter um hidrogel de quitosana, determina a formação de géis caracterizados por falta de força mecânica, tendência à dissolução e ausência de sensibilidade a variações da temperatura, características que permitiriam uma liberação eficientemente controlada do fármaco (BERGER *et al.*, 2004^a). Em decorrência destas limitações, hidrogéis de quitosana formados a partir de complexos com outros polímeros, do uso de reticulantes entre as cadeias ou de quitosana quimicamente modificada, possuindo, portanto, características diferenciadas, vêm sendo pesquisados.

Complexos de polieletrólitos e hidrogéis de quitosana enxertados são exemplos de hidrogéis de quitosana que não requerem um reticulante entre as cadeias poliméricas. No primeiro tipo, ocorre interação eletrostática entre as cadeias da quitosana e de um polímero aniônico. A regeneração da pele lesada é uma das aplicações de tais complexos (MARTINEZ-RUVALCABA *et al.*, 2007). No segundo, os grupamentos amino livres nas unidades desacetiladas e os grupamentos hidroxila nas unidades acetiladas e desacetiladas são ligados covalentemente a moléculas funcionais com posterior ocorrência de interações levando à formação de uma rede

por agregação. Tais hidrogéis enxertados podem apresentar características diferenciadas, como maior atividade bacteriostática ou maior sensibilidade a variações de temperatura, dependendo das moléculas funcionais ligadas à cadeia polimérica (VALENTA *et al.*, 2002, BERGER *et al.*, 2004^b).

É possível também, como previamente mencionado, a obtenção de hidrogéis através de ligação física ou química entre as cadeias poliméricas da quitosana. Nos géis covalentemente interligados, ocorre uma interação irreversível que leva a formação de uma rede porosa e permanente. Entretanto, efeitos tóxicos como mutagenicidade e neurotoxicidade, devido aos dialdeídos livres restantes após processo de purificação, podem ser induzidos com a utilização de reticulantes como glutaraldeído e glioxal. Sistemas transdérmicos e microesferas de gel são aplicações de tais hidrogéis covalentemente reticulados (MI *et al.*, 2000, BERGER *et al.*, 2004^a). Por outro lado, os hidrogéis formados por ligações iônicas reversíveis levam a obtenção de redes porosas e possivelmente sensíveis a variações de pH e temperatura, sendo, desta forma, a liberação controlada de fármacos, dependente do pH ou temperatura, a maior aplicação deste tipo de hidrogel. Os reticulantes iônicos mais usados são os ânions metálicos, β -glicerol-fosfato e tripolifosfato (BERGER *et al.*, 2004^a; CHENITE *et al.*, 2001; KEMPE *et al.*, 2007).

Diversas são as aplicações farmacêuticas dos hidrogéis de quitosana. Entre elas, os sistemas que sofrem transição entre os estados sol e gel devido a variações de temperatura ou pH têm despertado o interesse por parte dos pesquisadores (RUEL-GARIÉPY e LEROUX, 2004). Kempe e colaboradores (2007) estudaram a micro- e macroestrutura de soluções de quitosana que gelificam à temperatura corporal formando implantes para liberação controlada de proteínas. Um sistema injetável para liberação local de fármacos antitumorais foi desenvolvido por Han e colaboradores (2007). Chen e colaboradores (2004) desenvolveram um hidrogel sensível ao pH para administração oral de proteínas. Um hidrogel termosensível de quitosana quaternizada para administração nasal capaz de diminuir a taxa de depuração ciliar nasal e aumentar a absorção da insulina de maneira controlada foi desenvolvido por Wu e colaboradores (2007). Neste trabalho foi demonstrada a capacidade da quitosana de abrir as junções entre as células epiteliais, chamadas *tight junctions*. Uma vez que tais junções também se encontram na pele, é possível

que a quitosana aumente a penetração percutânea de substâncias pelo mesmo mecanismo (VALENTA e AUNER, 2004).

A incorporação de sistemas de liberação controlada nanoparticulados em hidrogéis de quitosana é de grande potencialidade, pois representa a associação inovadora de dois sistemas distintos. O hidrogel de quitosana, devido à capacidade de formação de filme e bioadesividade deste biopolímero, garante uma liberação homogênea e sem perdas do fármaco, além da interessante capacidade da quitosana de abertura das junções entre as células epiteliais (WU *et al.*, 2007), o que pode permitir maior penetração do fármaco através da pele (VALENTA e AUNER, 2004). Por sua vez, as nanocápsulas garantem uma liberação controlada e prolongada da substância, bem como uma possível diminuição da irritabilidade da pele às substâncias aplicadas (SHAFFAZICK *et al.*, 2003).

Nanopartículas lipídicas sólidas (SOUTO *et al.*, 2004), lipossomas (RUÉL-GARIÉPY *et al.*, 2002) e niossomas (LAKSHMI *et al.*, 2007) já foram incorporados em hidrogéis de quitosana. Souto e colaboradores (2004) prepararam e caracterizaram fisicamente nanopartículas lipídicas sólidas quanto ao tamanho de partícula e potencial zeta. Após, as nanoestruturas foram incorporadas em diversos hidrogéis. Observou-se que o potencial zeta das nanoestruturas foi invertido após a incorporação no gel de quitosana, devido ao caráter catiônico do biopolímero. Esta inversão de potencial pode acarretar em instabilidade no momento de carga zero, e facilitar a agregação das partículas, como observado após análise do tamanho das partículas.

Ruel-Gariépy e colaboradores (2002) incorporaram lipossomas em um hidrogel de quitosana termosensível para reparação tecidual e liberação local de fármacos antitumorais. A taxa de gelificação e a força do gel foram intensamente aumentadas pela presença dos lipossomas. Estudos de liberação *in vitro* do fármaco a partir dos lipossomas contidos no gel demonstraram liberação controlada por pelo menos duas semanas. Lakshmi e colaboradores (2007) incorporaram metotrexato em niossomas com intuito de impedir a toxicidade sistêmica provocada pelo fármaco. Estes foram incorporados em hidrogel de quitosana. O resultado comprovou a maior eficácia do gel testado em relação ao gel comercial. O resultado está relacionado ao sistema carreador do fármaco e à quitosana que promove

absorção, provavelmente por melhora da adesão entre os tecidos e a formulação, mas também devido a sua ação no processo de transporte paracelular.

3.5. Referências

AJUN, W.; YAN, S.; LI, G.; HUILLI, L. Preparation of aspirin and probucol in combination loaded chitosan nanoparticles and *in vitro* release study. *Carbohydrate Polymers*, v.75, p.566-574, 2009.

ALMEIDA, J. S.; JEZUR, L.; FONTANA, M. C.; PAESE, K.; SILVA, C. B.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S.; BECK, R. C. R. Oil-Based Nanoparticles Containing Alternative Vegetable Oils (Grape Seed Oil and Almond Kernel Oil): Preparation and Characterization. *Latin American Journal of Pharmacy*, v.28, p.165-72, 2009.

ALVES, M. P. *Formas farmacêuticas contendo nanocápsulas, nanoesferas e nanoemulsões de nimesulida: desenvolvimento, caracterização e avaliação da permeação cutânea in vitro*. Porto Alegre, 2006. 166p. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS.

ALVES, M. P.; SCARRONE, A.L.; SANTOS, M.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S. Human skin penetration and distribution of nimesulide from hydrophilic gels containing nanocarriers. *Pharmaceutical Nanotechnology*, v.341, p.215-220, 2007.

BARCELOUX D. G. *Medical Toxicology of Natural Substances: Foods, Fungi, Medicinal Herbs, Toxic Plants, and Venomous Animals*. Hoboken: John Wiley & Sons, 2008. 1157p.

^aBERGER, J.; REIST, M.; MAYER, J.M.; FELT, O.; PEPPAS, N.A.; Gurny, R. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v.57, p.19-34, 2004.

^bBERGER, J.; REIST, M.; MAYER, J.M.; FELT, O.; GURNY, R. Structure and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v.57, p.35-52, 2004.

CHEN, S-C.; WUA, Y-C.; MIB, F-L.; LINA, Y-H.; YUA, L-C.; SUNG, H-W. A novel pH-sensitive hydrogel composed of N,O-carboxymethyl chitosan and alginate cross-linked by genipin for protein drug delivery. *Journal of Controlled Release*, v.96, p.285– 300, 2004.

CHENITE, A.; BUSCHMANN, M.; WANG, D.; CHAPUT, C.; KANDANI, N. Rheological characterization of thermogelling chitosan/glycerolphosphate solutions. *Carbohydrate Polymers*, v.46, p.39-47, 2001.

- CHOUAN, R.; BAJPAI, A.K. An in vitro release study of 5-fluoro-uracil (5-FU) from swellable from poly-(2 hydroxymethyl metachrylate) (PHEMA) nanoparticles. *Journal of Materials Science*, v.20, p.1103-1114, 2009.
- ERIN, N.; ZIK, B.; SARIGÜL, M.; TÜTÜNCÜ. S. The effects of chronic low-dose capsaicin treatment on substance P levels. *Regulatory Peptides*, v.153, p.83-87, 2008.
- FERRANTI, V.; MARCHAIS, H.; CHABENAT, C.; ORECCHIONI, A.M.; LAFONT, A. Primidone-loaded poli(ϵ -caprolactone) nanocapsules: incorporation efficiency and *in vitro* release profiles. *International Journal of Pharmaceutics*, v.193, p.107-111, 1999.
- 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.
- HAN, H.D.; SONG, X.K.; PARK, Y.S.; NOH, K.H.; KIM, J.H.; HWANG, T.; KIM, T.W.; CHIN, B.C. A chitosan hydrogel based cancer drug delivery system exhibits synergistic antitumor by combining with a vaccinia viral vaccine. *International Journal of Pharmaceutics*, v.350, p.27-34, 2007.
- HIN, T.S. Engineering Materials for Biomedical Applications. Singapore: World Scientific Publishing Company, 2004. 352p.
- HAYMAN, M.; KAM, P.C.A. Capsaicin: A review of it pharmacology and clinical applications. *Current Anaesthesia & Critical Care*, v.19, p.338-343, 2008.
- KEMPE, S.; METZ, H.; BASTROP, M.; HVILSOM, A.; CONTRI, R.V.; MÄDER, K. Characterization of thermosensitive chitosan-based hydrogels by rheology and electron paramagnetic resonance spectroscopy. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 68, p.26-33, 2008.
- KNOTKOVA, H.; PAPPAGALLO, M.; SZALLASI, A. Capsaicin (TRPV1 agonist) therapy for pain relief- Farewell or revival? *Clinical Journal of Pain*, v.24, p.142-154, 2008.
- LAKSHIMI, P.K.; DEVI, G.S.; BHASKARAN, S.; SACCHIDANAND, S. Niosomal mathotrexate gel in the treatment of localized psoriasis: phase I and phase II studies. *Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology*, v.3, p.157-161, 2007.
- LIN, C-C. ; METTERS, A.T. Hydrogels in controlled release formulations: network design and mathematical modeling. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.58, p.1379-1408, 2006.
- MARTINEZ-RUVALCABA, A.; CHORNET, E.; RODRIGUE, D. Viscoelastic properties of dispersed chitosan/xanthan hydrogels. *Carbohydrate Polymers*, v.64, p.586-595, 2007.
- MI, F-L.; KUAN, C-Y.; SHIU, S-S.; LEE, S-T.; CHANG, S-F. The study of gelation kinetics and chain-relaxation properties of chitosan glutaraldehyde-cross-linked chitosan gel and their effects on microspheres preparation and drug release. *Carbohydrate Polymers*, v.41, p.389-396, 2000.

- MISSIRLIS D.; KAWAMURA R.; TIRELLI, N.; HUBBELL, J.A. Doxorubicin encapsulation and difusional release from stable, polymeric, hydrogel nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.29, p.120-129, 2006.
- ORTEGA, G.G.; NETZ, P.A. Fundamentos de Físico-Química, Uma abordagem conceitual para as ciencias farmacêuticas. Porto Alegre: Editora Artmed, 2002. 299p.
- 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.
- RAVI KUMAR, M.N.V. A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and Functional Polymers*, v. 46, p.1-27, 2000.
- RUEL-GARIÉPY, E.; LECLAIRB, G.; HILDGENB, P.; GUPTAC, A.; LEROUX, J-C.; Thermosensitive chitosan-based hydrogel containing liposomes for the delivery of hydrophilic molecules. *Journal of Controlled Release*, v.82, p.373-383, 2002.
- RUEL-GARIÉPY, E.; LEROUX, J-C. In situ forming hydrogels - review of temperature-sensitive systems. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v.58, p.409-426, 2004.
- RINAUDO, M. Chitin and chitosan: properties and applications. *Progress in Polymer Science*, v.31, p.603-632, 2006.
- SCHAFFAZICK, S.R.; GUTERRES, S.S.; FREITAS, L.L.; POHLMANN, A.R. Caracaterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Química Nova*, v.26, p.726-737, 2003.
- SOPPIMATH, K.S.; AMINABHAVI, T.M.; KULKANI, A R.; RUDZINSKI, W.E. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *Journal of Controlled Release*, v.70, p.1-20, 2001.
- SOUTO, E.B.; WISSING, S.A.; BARBOSA, C.M.; MÜLLER, R.H. Evaluation of the physical stability of SLN and NLC before and after incorporation in hydrogel formulations. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v.58, p.83-90, 2004.
- VALENTA, C.; CHRISTEN, B.; BERNKOP-SCHNÜRCH, A. Chitosan-EDTA: a novel polymer for topical gels. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v.54, p.1453-1459, 2002.
- VALENTA, C.; AUNER, B. The use of polymers for dermal and transdermal delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v.58, p.279-289, 2004.
- VÅRUM, K.M.; SMIDSRØD, O. Structure-Property Relationship in Chitosans. In: DUMITRIU, S., Polysaccharides: structural diversity and functional versatility, 2. ed., New York: Dekker, 2005. p. 625-642.

WANG, J.C.; CHEN, S.H.; XU, Z.C. Synthesis and properties research on the nanoencapsulated capsaicin by simple coacervation method. *Journal of Dispersion Science and Technology*, v.29, p.687-695, 2008.

WAKNINE, Y. Adesivo com elevada concentração de capsaicina recebeu designação de droga órfã para neuralgia pós-herpética. Disponível em <www.medcenter.com/Medscape>, acesso em 13 nov. 2009.

WASHINGTON, C. Drug release from microdisperse systems: a critical review. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 58, p.1-12, 1990.

WU, J. ; WEI, W. ; WANG, L-Y.; SU, G-S.; MA, G-H. A thermosensitive hydrogel based on quaternized chitosan and poly(ethylene glycol) for nasal drug delivery system. *Biomaterials*, v.28, p.2220-2232, 2007.

XING, F.; CHENG, G.; YI, K.; MA, L. Nanoencapsulation of capsaicin by complex coacervation of gelatin, acacia and tannins. *Journal of Applied Polymer Science*, v.96, p. 2225-2229, 2005.

ZI, P.; YANG, X.; KUANG H.; YANG, Y.; YU, L. Effect of HP β CD on solubility and transdermal delivery of capsaicin through rat skin. *International Journal of Pharmaceutics*, v.358, p.151-158, 2008.

4. CAPÍTULO I

***Controlled release of capsaicinoids co-encapsulated within polymeric
nanocapsules***

Controlled release of capsaicinoids co-encapsulated within polymeric nanocapsules

Renata V. Contri¹, Moacir Kaiser¹, Fernanda S. Poletto², Adriana R. Pohlmann^{2,3},
Silvia S. Guterres^{1,3}

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre - RS, 90610-000 Brazil

² Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre - RS, 91501-970 Brazil

³ Centro de Nanociência e Nanotecnologia, CNANO-UFRGS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, CP 15003, 91501-970 Porto Alegre - RS, Brazil

Manuscrito pronto para submissão

Abstract

Polymeric nanocapsules containing capsaicinoids (capsaicin and dihydrocapsaicin) were developed and characterized. For comparison, unloaded nanocapsules were also prepared. Drug-loaded nanoparticles presented Z-average diameter of 153 ± 7 (PDI lower than 0.2), zeta potential of $+9.62 \pm 1.48$ mV and pH value of 5.72 ± 0.10 . The capsaicinoids content was 0.5mg/mL and the encapsulation efficiencies were close to 100% for both capsaicinoids. The formulation was physically stable over 90 days. The co-nanoencapsulation of capsaicinoids did not influence the nanoparticle physicochemical characteristics. The capsaicinoids *in vitro* release profiles were determined. The dissolution efficiencies of the samples demonstrated that the presence of oil delayed the release of dihydrocapsaicin comparing to that of capsaicin. The best model to describe the release profiles of capsaicin and dihydrocapsaicin was the monoexponential. Comparing the half-life values between nanoemulsion (31 ± 1 h (capsaicin) and 60 ± 1 h (dihydrocapsaicin)) and nanocapsules (63 ± 3 h (capsaicin) and 174 ± 3 h (dihydrocapsaicin)), we observed that the polymeric wall significantly affected the release rates for both capsaicinoids. Capsaicin presented higher flux value ($5.6 \pm 0.1 (\times 10^{-4})$ mg cm⁻² h⁻¹) than that of dihydrocapsaicin ($2.1 \pm 0.2 (\times 10^{-4})$ mg cm⁻² h⁻¹) considering the nanocapsules, which was related to its higher gradient concentration. The release mechanism of both capsaicinoids from the nanocapsules was the anomalous transport.

Keywords: capsaicin, dihydrocapsaicin, nanocapsules, *in vitro* release, mathematical modelling, diffusion.

5. CAPÍTULO II

Chitosan hydrogel containing capsaicinoids-loaded nanocapsules: an innovative formulation for topical delivery

Chitosan hydrogel containing capsaicinoids-loaded nanocapsules: an innovative formulation for topical delivery

Renata V. Contri¹, Tatiele Katzer¹; Adriana R. Pohlmann²³, Silvia S. Guterres¹³

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre - RS, 90610-000 Brazil

² Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre - RS, 91501-970 Brazil

³ Centro de Nanociência e Nanotecnologia, CNANO-UFRGS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, CP 15003, 91501-970 Porto Alegre - RS, Brazil

Manuscrito pronto para submissão.

Abstract

The aim of this work was to develop and characterize a chitosan hydrogel containing capsaicinoids-loaded nanocapsules intended for topical delivery. Such system is promising once it brings together the skin bioadherence and film forming capability due to chitosan and the control of drug release due to the nanocapsules. The hydrogels showed low pH values because of the presence of lactic acid in the formulations, but still suitable for topical administration. The role of the chitosan concentration in the hydrogel consistence enhancement was shown. The consistence values /flow indexes (n) were $19.64 \pm 2.61 \text{ Pa}\cdot\text{s}^n / 0.76 \pm 0.03$ and $13.12 \pm 0.93 \text{ Pa}\cdot\text{s}^n / 0.82 \pm 0.01$ for the gels containing the nanocapsule suspension or exclusively water, respectively, demonstrating the effect of the nanocapsules in the slight enhancement of the gel consistence. The nanocapsules may also interfere in the the interaction between chitosan chains and in the polymer network. The hydrogels pseudoplastic behavior did not change after the incorporation of nanocapsules. The release study showed a controlled release of the capsaicinoids from the hydrogel containing nanocapsules comparing with the hydrogel containing the free drug.

6. DISCUSSÃO

Pelo método de nanoprecipitação do polímero pré-formado, utilizando Eudragit® RS100 como parede polimérica, triglicerídeos do ácido cáprico/caprílico como núcleo oleoso, e polissorbato 80 como tensoativo, capsaicina e dihidrocapsaicina foram simultaneamente nanoencapsuladas. Estas substâncias, chamadas de capsaicinóides, são as principais responsáveis pela sensação de ardência e queimação provocada por algumas pimentas, e atualmente são muito utilizadas topicamente para o tratamento de dor crônica. O fato da capsaicina e da dihidrocapsaicina serem lipofílicas e ativas em baixas concentrações viabiliza a nanoencapsulação. Neste trabalho a nanoencapsulação foi proposta como uma tecnologia para diminuir a irritação das substâncias na pele e o necessário número repetido de aplicações, devido à liberação controlada a partir das nanoestruturas.

Os valores obtidos de diâmetro médio (espalhamento de luz dinâmico), potencial zeta (mobilidade eletroforética) e pH (potenciometria) foram de 153 ± 7 nm (PDI < 0,2), $+ 9,62 \pm 1,48$ mV, e $5,7 \pm 0,1$, respectivamente. Os valores estão de acordo com a técnica utilizada. O potencial zeta se mostrou positivo devido ao caráter catiônico do polímero e pode contribuir para uma melhora da adesão das partículas na pele. Após comparação com as nanocápsulas brancas, concluiu-se que a incorporação dos capsaicinóides não provocou alterações nas características da formulação. O teor e a taxa de associação dos capsaicinóides às nanocápsulas (CLAE-UV) foram próximos de 100% para ambos capsaicinóides, considerando um total de capsaicinóides na formulação de 0,5 mg/mL, e comprovou-se a ausência de cristais de fármaco na formulação, o que levaria a uma interpretação errônea da taxa de associação das substâncias ativas.

As formulações apresentaram-se estáveis química e fisicamente por um período de 90 dias, a temperatura ambiente. O único parâmetro que apresentou alteração com o armazenamento foi o pH que sofreu uma diminuição em torno de uma unidade. Esta diminuição deve estar relacionada com hidrólise da cadeia lateral do polímero, porém não se observou nenhum outro fenômeno de desestabilização química ou física que comprometesse a formulação de nanocápsulas obtida. Através da técnica de espalhamento múltiplo de luz, observou-se, para ambas as formulações de nanocápsulas (com e sem fármaco), uma leve tendência à

sedimentação das partículas, que é considerada normal para partículas em suspensão.

Através do estudo de liberação *in vitro* da capsaicina e da dihidrocapsaicina a partir da suspensão de nanocápsulas, utilizando o método de sacos de diálise, pode-se observar a influência das nanocápsulas, no controle da liberação dos ativos. Ambos capsaicinóides foram liberados mais lentamente a partir das nanocápsulas, em relação aos três controles (solução hidroalcoólica, solução micelar e nanoemulsão), mostrando a influência tanto da parede polimérica quanto do núcleo oleoso no controle da liberação. Os dados de liberação foram adequadamente modelados a partir de equação de primeira ordem monoexponencial, e, a partir dos parâmetros obtidos, os valores de $t_{1/2}$ foram calculados. Observou-se a influência do óleo em diferenciar os perfis de liberação da capsaicina em relação à dihidrocapsaicina. Esta diferença não foi visualizada para a solução hidroalcoólica e a solução micelar. Atribui-se esta diferença de liberação à maior concentração inicial de capsaicina nas nanocápsulas, que, segundo a lei de Fick, facilitou a difusão desta no sistema.

Visando uma formulação inovadora para facilitar a aplicação das nanocápsulas na pele, uma vez que as suspensões apresentam muito baixa viscosidade, foi proposta neste trabalho a obtenção de um hidrogel partir do polímero quitosana, para a incorporação da suspensão de nanocápsulas contendo capsaicinóides. O hidrogel de quitosana é um veículo que está sendo recentemente proposto para via tópica, devido a suas interessantes propriedades como bioaderência, formação de filme, potencial bacteriostático e acelerador da cicatrização. Não se observou, pelo teste de inchamento de polímero, alteração significativa no filme de Eudragit[®] RS100, formador da parede polimérica das nanocápsulas, quando em contato com o gel por até um mês. Este resultado mostra uma provável estabilidade das nanopartículas, quando incorporadas no veículo semissólido em questão.

Previamente à incorporação das nanocápsulas, estudou-se a influência da concentração do ácido láctico e da quitosana no pH e consistência de hidrogéis de quitosana propostos para a via cutânea. Os hidrogéis de quitosana preparados apresentaram valores de pH baixos, estes dependentes da concentração de ácido

lático, porém, para alguns, observou-se valores aceitáveis para aplicação cutânea. A consistência de tais géis aumentou muito com a adição de maior quantidade de quitosana durante obtenção do gel. Após 30 dias de armazenamento pode-se observar um leve incremento na consistência e uma diminuição dos valores de pH dos hidrogéis, devido a um provável aumento da interação entre as cadeias da quitosana com o tempo de armazenamento.

O hidrogel de quitosana considerado ideal para aplicação cutânea foi preparado a partir de 3,5% de quitosana e 1,5% de ácido lático. Para a obtenção da formulação, obteve-se, inicialmente, uma dispersão do polímero em água, seguido da adição de ácido lático e homogeneização, para evitar grumos. A suspensão de nanocápsulas contendo capsaicinóides foi incorporada neste hidrogel e este foi analisado quanto ao pH, às características reológicas e morfológicas, ao teor de capsaicinóides e ao perfil de liberação *in vitro*. A adição de nanocápsulas ocasionou um leve aumento da consistência dos hidrogéis (de $13,12 \pm 0,93 \text{ Pa.s}^n$ para $19,64 \pm 2,61 \text{ Pa.s}^n$) porém não alterou significativamente o pH e não modificou o comportamento reológico pseudoplástico destes. O aumento da consistência observado para os hidrogéis brancos após 30 dias não foi observado para os hidrogéis contendo nanocápsulas, o que pode indicar uma dificuldade imposta pelas nanocápsulas na interação entre as cadeias poliméricas que formam a rede tridimensional. Foi possível, por microscopia eletrônica de transmissão, visualizar as nanocápsulas presentes no hidrogel e este apresentou teor de capsaicinóides próximo a 0,23 mg/g (90% da quantidade utilizada no preparo) determinado por CLAE-UV, após etapa de extração. A tendência à sedimentação das partículas quando em suspensão aquosa, observada por espalhamento múltiplo de luz, foi atenuada quando da incorporação das nanocápsulas no hidrogel, devido à maior viscosidade do sistema que diminui o movimento das partículas.

O estudo de liberação *in vitro* da capsaicina e da dihidrocapsaicina a partir do hidrogel de quitosana 3,5% contendo nanocápsulas mostrou um melhor controle da liberação em comparação aos géis contendo fármaco livre (gel contendo solução hidroalcoólica e gel contendo solução micelar dos capsaicinóides). As substâncias precisam ser liberadas das nanocápsulas para, então, poderem se difundir pelo hidrogel e pelo saco de diálise. Comparando-se com a suspensão aquosa de

nanocápsulas, o hidrogel contendo nanocápsulas retardou ainda mais a velocidade de liberação da capsaicina, provavelmente devido à alta consistência do hidrogel. Deste modo, a viscosidade do sistema pode ser ajustada de acordo com a aplicação desejada.

7. CONCLUSÕES

Nanocápsulas estáveis contendo simultaneamente capsaicina e dihidrocapsaicina foram obtidas e caracterizadas, e a incorporação dos capsaicinóides não influenciou as propriedades da formulação. Os experimentos *in vitro* de liberação dos ativos a partir das nanocápsulas mostraram o efeito tanto da parede como do núcleo oleoso retardando a liberação de ambos capsaicinóides. A capsaicina liberou mais rapidamente em comparação a dihidrocapsaicina, devido à maior concentração desta nas nanocápsulas. O hidrogel preparado a partir de quitosana apresentou-se como alternativa inovadora para a aplicação tópica dos capsaicinóides nanoencapsulados, mantendo a liberação controlada observada para as nanocápsulas, em relação aos controles. Observou-se uma grande influência da concentração do biopolímero na consistência do veículo semissólido proposto, o que reflete na velocidade de liberação dos ativos. Um leve incremento na consistência foi observado quando da adição das nanocápsulas ao hidrogel, porém o comportamento pseudoplástico dos hidrogéis não foi alterado.

8.1. Validação de método analítico para quantificação dos capsaicinóides a partir de suspensão de nanocápsulas e de hidrogel de quitosana contendo suspensão de nanocápsulas

O método utilizado para quantificação dos capsaicinóides a partir da suspensão de nanocápsulas e do hidrogel de quitosana foi desenvolvido e validado por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção no ultravioleta (CLAE-UV). O método foi adaptado de Yao e colaboradores (1994) e validado segundo normas do ICH (1996). O método foi também utilizado para quantificação do fármaco presente no meio de liberação, durante o experimento de liberação *in vitro*. Utilizou-se o equipamento Perkin Elmer, Coluna C18 Merck, com pré-coluna do mesmo fabricante. A fase móvel utilizada foi uma mistura de acetonitrila grau CLAE e água Milli[®] Q (70:30), com pH ajustado para valor de 4,5 com solução de ácido acético a 2%. Os parâmetros de análise foram: fluxo de 0,75 mL/min, $\lambda = 280$ nm e injeção de 20 μ L. A capsaicina e a dihidrocapsaicina foram analisadas simultaneamente uma vez que apresentam diferentes tempos de retenção no cromatograma (Fig. 1). A proporção das substâncias apresentou-se no cromatograma como descrita no laudo técnico da matéria-prima ([CP] / [DH] = 1,93).

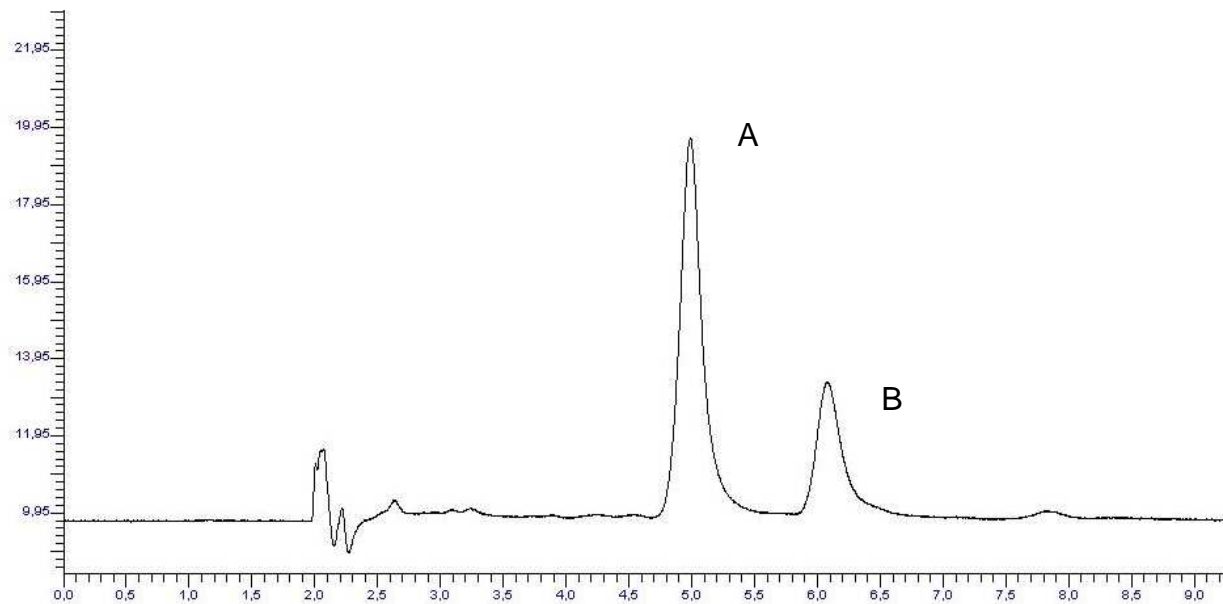


Figura 1. Cromatograma referente aos capsaicinóides quantificados a partir da suspensão de nanocápsulas. A= capsaicina e B=dihidrocapsaicina .

8.1.1. Linearidade

A validação iniciou-se com a obtenção de 5 curvas-padrão em 3 dias consecutivos a partir de uma solução-estoque das substâncias ativas em acetonitrila. Os pontos utilizados foram 0,30; 0,50; 2,00; 5,00; 10,00; 20,00 e 30,00 $\mu\text{g/mL}$ para a capsaicina e 0,14; 0,23; 0,45; 2,27; 4,55; 9,10 e 13,65 $\mu\text{g/mL}$ para a dihidrocapsaicina. Obtiveram-se curvas médias (Fig. 2) para os dois capsaicinóides mostrando valores de coeficiente de determinação (R^2) adequados (ICH, 1996).

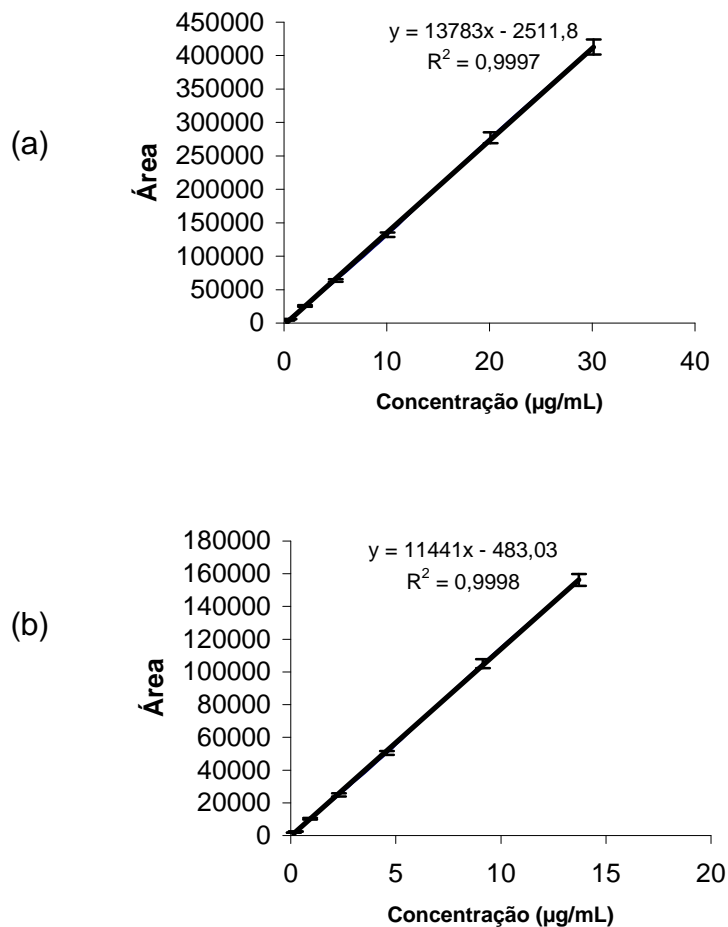


Figura 2. Curvas-padrão médias para (a) capsaicina e (b) dihidrocapsaicina.

Através da análise de variância (ANOVA), verificou-se regressão linear significativa, bem como desvio da linearidade não significativo ($p < 0,05$), comparando-se os valores de $F_{\text{calculado}}$ com F_{tabelado} (Tabela 1 e 2).

Tabela 1. ANOVA da linearidade do método para capsaicina.

Fontes de Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Variância	F calculado	F tabelado
Entre	6	$7,41 \cdot 10^{11}$	$1,24 \cdot 10^{11}$	$4,19 \cdot 10^3$	2,45
Regressão Linear	1	$7,41 \cdot 10^{11}$	$7,41 \cdot 10^{11}$	$2,52 \cdot 10^4$	4,20
Desvio da Linearidade	5	$2,48 \cdot 10^8$	$4,97 \cdot 10^7$	1,69	2,56
Dentro	28	$8,24 \cdot 10^8$	$2,94 \cdot 10^7$		
Total	34				

Tabela 2. ANOVA da linearidade do método para dihidrocapsaicina ($p < 0,05$).

Fontes de Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Variância	F calculado	F tabelado
Entre	6	$1,06 \cdot 10^{11}$	$1,76 \cdot 10^{10}$	$5,29 \cdot 10^3$	2,45
Regressão Linear	1	$1,06 \cdot 10^{11}$	$1,06 \cdot 10^{11}$	$3,17 \cdot 10^4$	4,20
Desvio da Linearidade	5	$2,62 \cdot 10^7$	$5,23 \cdot 10^6$	1,57	2,56
Dentro	28	$9,33 \cdot 10^7$	$3,33 \cdot 10^6$		
Total	34				

8.1.2. Limites de detecção e de quantificação

A partir dos dados de linearidade, o método apresentou limite de detecção teórico de 0,14 e 0,09 $\mu\text{g/mL}$ e limite de quantificação teórico de 0,41 e 0,27 $\mu\text{g/mL}$ para capsaicina e dihidrocapsaicina, respectivamente.

8.1.3. Precisão intradia e interdia

Para análise da precisão intradia do método (ou repetibilidade), que representa a concordância em curto espaço de tempo entre as análises, preparou-se 9 amostras, no mesmo dia, a partir da suspensão de nanocápsulas (Suspensão_{NC}) e do hidrogel contendo suspensão de nanocápsulas (Hidrogel_{NC}), de modo a obter a

concentração baixa, média e alta da curva (0,50; 5,00 e 20,00 µg/mL de capsaicina e 0,23; 2,27 e 9,10 µg/mL de dihidrocapsaicina). Para análise da precisão interdia, (ou intermediária), que representa a concordância entre os resultados em dias diferentes de análise, preparou-se, em 3 dias consecutivos, 7 amostras a partir de Suspensão_{NC} e de Hidrogel_{NC}, de modo a obter a concentração média da curva (5,00 e 2,27 µg/mL) em todas as amostras. As amostras foram analisadas por CLAE-UV e determinaram-se os desvios padrões e os coeficientes de variação entre as concentrações obtidas (Tabelas 3 e 4). As amostras foram preparadas com acetonitrila como solvente. Previamente ao preparo, o hidrogel foi mantido em agitação e aquecimento por 2 horas com acetonitrila para extração dos capsaicinóides.

Tabela 3. CV (%) inter e intradia para análise da precisão do método para capsaicina.

Amostra	Precisão interdia (%)	Precisão intradia ponto baixo (%)	Precisão intradia ponto médio (%)	Precisão intradia ponto alto (%)
Suspensão _{NC}	1,89	0,34	0,54	2,28
Hidrogel _{NC}	4,34	2,42	4,24	1,98

Tabela 4. CV (%) inter e intradia para análise da precisão do método para dihidrocapsaicina.

Amostra	Precisão interdia (%)	Precisão intradia ponto baixo (%)	Precisão intradia ponto médio (%)	Precisão intradia ponto alto (%)
Suspensão _{NC}	2,40	1,76	1,67	2,69
Hidrogel _{NC}	3,13	3,70	4,54	3,71

8.1.4. Exatidão

Para o estudo da exatidão do método, que representa a proximidade dos resultados obtidos experimentalmente com o valor verdadeiro, foi adicionada uma

quantidade conhecida de capsaicinóides a partir de uma solução-estoque a soluções diluídas das substâncias ativas em acetonitrila, obtidas através de Suspensão_{NC} ou Hidrogel_{NC}. No mesmo dia foram obtidas 9 amostras de modo a obter 3 amostras das concentração baixa, média e alta da curva (0,50; 5,00 e 20,00 µg/mL de capsaicina e 0,23; 2,27 e 9,10 µg/mL de dihidrocapsaicina). As amostras foram analisadas por CLAE-UV e a partir das concentrações experimentais e das concentrações teóricas determinou-se a exatidão (Tabelas 5 e 6).

Tabela 5. Análise da exatidão do método para capsaicina.

Amostra	Exatidão	Exatidão	Exatidão
	ponto baixo (%)*	ponto médio (%)*	ponto alto (%)*
Suspensão _{NC}	98,01	95,78	99,48
Hidrogel _{NC}	93,08	93,88	94,73

*n = 03 determinações (as concentrações experimentais apresentaram DPR<5%)

Tabela 6. Análise da exatidão do método para dihidrocapsaicina.

Amostra	Exatidão	Exatidão	Exatidão
	ponto baixo (%)*	ponto médio (%)*	ponto alto (%)*
Suspensão _{NC}	96,48	99,62	95,09
Hidrogel _{NC}	92,87	94,16	93,30

*n = 03 determinações (as concentrações experimentais apresentaram DPR<5%)

8.1.5. Especificidade

A especificidade do método de quantificação dos capsaicinóides a partir de suspensão de nanocápsulas e do hidrogel contendo suspensão de nanocápsulas foi confirmada através da preparação e análise em CLAE-UV de amostra obtida a partir de suspensão de nanocápsulas brancas (sem adição de capsaicinóides) e de hidrogel contendo tais nanocápsulas. Observou-se que não há interferentes das formulações que possam interferir na quantificação da capsaicina e dihidrocapsaicina pelo método proposto (Figura 3).

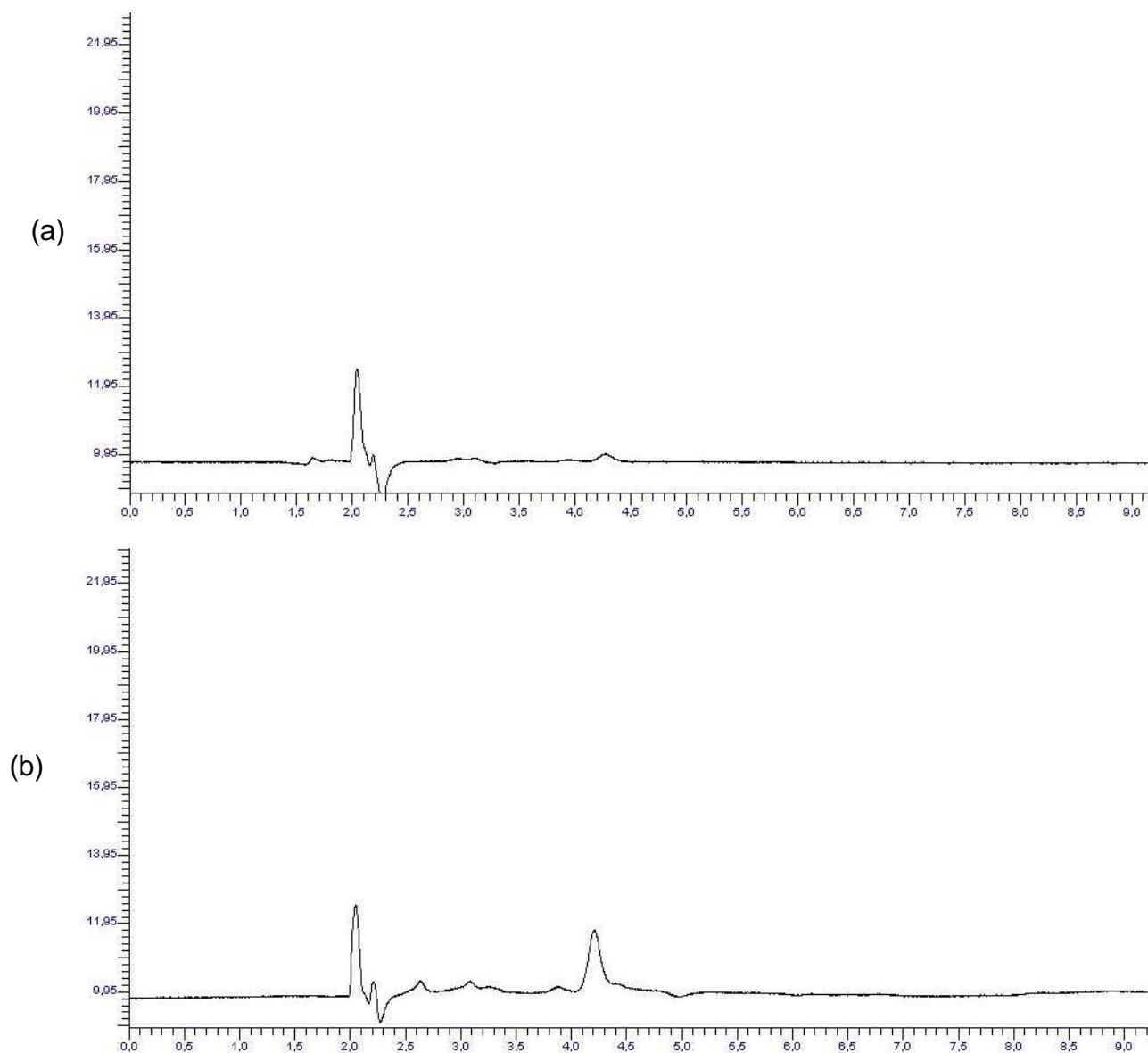


Figura 3. Cromatograma referente às amostras de (a) suspensão de nanocápsulas brancas e (b) hidrogel contendo nanocápsulas brancas.

O método de quantificação do capsaicinóides a partir de suspensão de nanocápsulas e de hidrogel de quitosana contendo suspensão de nanocápsulas foi considerado, portanto, validado.

8.1.6. Estudo de fotoestabilidade dos capsaicinóides

Uma vez que há indícios da fotoinstabilidade dos capsaicinóides frente à luz (KOPEC *et al.*, 2002; MARTINDALE, 1999), foi realizado um estudo preliminar de fotoestabilidade dos capsaicinóides nanoencapsulados (NC) e não nanoencapsulados (solução micelar (SM)), esta última obtida da mesma forma que as nanocápsulas porém omitindo-se o polímero e o óleo na formulação. Para tanto, as formulações foram colocadas em cubetas e mantidas em caixas contendo lâmpadas UVA e UVC, como descrito na tabela abaixo. Foi demonstrado neste trabalho a fotoestabilidade dos capsaicinóides tanto livre quanto nanoencapsulados (Tabela 7). Este resultado foi importante para determinar as condições de armazenamento das formulações bem como as condições dos experimentos seguintes.

Tabela 7. Fotoestabilidade de capsaicinóides livres e nanoencapsulados.

Tempo de exposição da formulação à luz	Teor de capsaicina NC (%)	Teor de capsaicina SM (%)	Teor de dihidrocapsaicina NC (%)	Teor de dihidrocapsaicina SM (%)
30 min - UVA	99,85	99,02	104,62	98,91
1 h - UVA	97,60	105,89	99,48	105,30
3 h - UVA	96,50	98,02	97,85	99,58
30 min - UVC	97,27	99,35	99,59	101,91
1 h - UVC	98,61	99,90	103,62	101,97
3 h - UVC	99,74	105,18	98,64	90,70

8.2. Preparação de suspensões de nanocápsulas contendo capsaicinóides: Determinação da melhor formulação para os estudos

Inicialmente foram preparadas 3 suspensões de nanocápsulas cujos componentes variaram conforme descrito na Tabela 8. As formulações foram preparadas pelo método de nanoprecipitação do polímero pré-formado. Para tanto, uma fase oleosa é vertida de forma controlada (funil de precipitação) em uma fase aquosa e, após, são mantidas em agitação por 10 minutos antes da retirada dos solventes (primeiramente a acetona e após a água) através de um rotaevaporador de pressão reduzida até o volume final desejado. As formulações foram armazenadas em frascos adequados a 25 °C.

Tabela 8- Componentes das diferentes formulações de nanocápsulas.

Componentes	<i>ncc-eudragit</i>	<i>ncc-pclspan</i>	<i>ncc-pcllipoid</i>
Polímero	Eudragit [®] RS100	Poli-ε-caprolactona (PCL)	Poli-ε-caprolactona (PCL)
Óleo	Triglicerídeos do ácido cáprico/caprílico	Triglicerídeos do ácido cáprico/caprílico	Triglicerídeos do ácido cáprico/caprílico
Tensoativo lipofílico	-----	Monoestearato de Sorbitano 60 (Span [®] 60)	Fosfatidilcolina (Lipoid [®] 100)
Solventes	Água e Acetona	Água e Acetona	Água e Acetona
Tensoativo hidrofílico	Polissorbato 80 (Tween [®] 80)	Polissorbato 80 (Tween [®] 80)	Polissorbato 80 (Tween [®] 80)
Fármaco	Capsaicinóides	Capsaicinóides	Capsaicinóides

As quantidades utilizadas estão abaixo descritas (para formulação de 10mL, Tabela 9)

Tabela 9. Quantidades dos componentes para obtenção das formulações.

Componentes	Fase Orgânica	Fase aquosa
Polímero	100 mg	x
Óleo	330 µL	x
Tensoativo lipofílico	76,6 mg	x
Solvente Orgânico	27 mL	x
Fármaco	5 mg	x
Tensoativo hidrofílico	X	76 mg
Água Milli [®] Q	X	53 mL

As formulações obtidas foram caracterizadas quanto ao diâmetro e PDI (espalhamento de luz dinâmico), potencial zeta (mobilidade eletroforética), pH (potenciometria), teor de capsaicinóides e taxa de associação as nanocápsulas (CLAE-UV), e tendência a fenômenos de instabilidade física como cremagem e sedimentação (espalhamento múltiplo de luz).

Os resultados de diâmetro e polidispersão, assim como de potencial zeta e de pH se encontram nos gráficos abaixo (Fig. 4). Inicialmente todas as formulações apresentaram valores adequados para os parâmetros analisados, valores estes que estão de acordo com as condições de preparo. Enquanto que as formulações *ncc-eudragit* e *ncc-pclspan* mantiveram o diâmetro médio de partícula, a polidispersão e o potencial zeta por um período de 90 dias pode-se observar, para a *ncc-pcllipoid*, um grande aumento no diâmetro juntamente com um aumento de polidispersão após 30 dias de preparo. O potencial zeta por sua vez, apresentou valores que variaram, caracterizando um comportamento errático, provavelmente devido à desestabilização do sistema. Esta desestabilização foi visualmente verificada, em um período de 15 a 30 dias após o preparo, quando pode-se observar separação de fases na formulação. Tal desestabilização pode ser devido a uma incompatibilidade

da capsaicina com a fosfatidilcolina ou devido à utilização de fosfatidilcolina 100% como tensoativo, devido ao fato de esta não conter outros lipídeos que, conferindo carga ao sistema, aumentam a estabilidade da formulação.

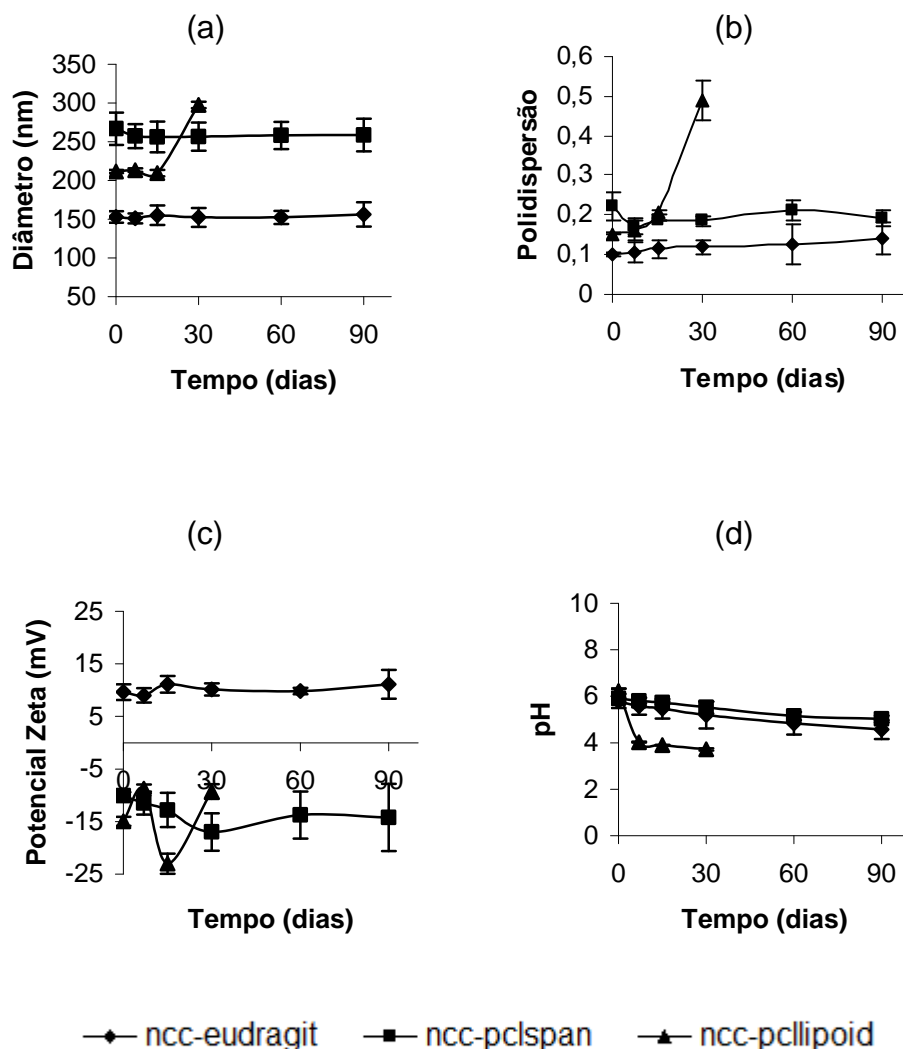


Fig. 4. Caracterização das suspensões de nanocápsulas: (a) diâmetro médio, (b) polidispersão, (c) potencial zeta e (d) pH.

Em relação às análises no TurbiscanLAB[®] (Fig. 5), que informam sobre a tendência de cada formulação em sofrer fenômenos de instabilidade física, podemos observar uma leve tendência à sedimentação, observada pelo aumento do retroespalhamento no fundo da cubeta, para as formulações *ncc-eudragit* e *ncc-pclspan*. Este fenômeno é confirmado pela clarificação observada no topo da cubeta para estas formulações. Para a formulação *ncc-pcllipoid* observa-se, por outro lado,

uma tendência, um pouco mais acentuada, a um processo de cremagem das partículas, confirmada pela clarificação observada no fundo da cubeta. A sedimentação é um processo normal esperado para partículas em suspensão. A cremagem, por sua vez, pode ser um indício de uma instabilidade maior no sistema.

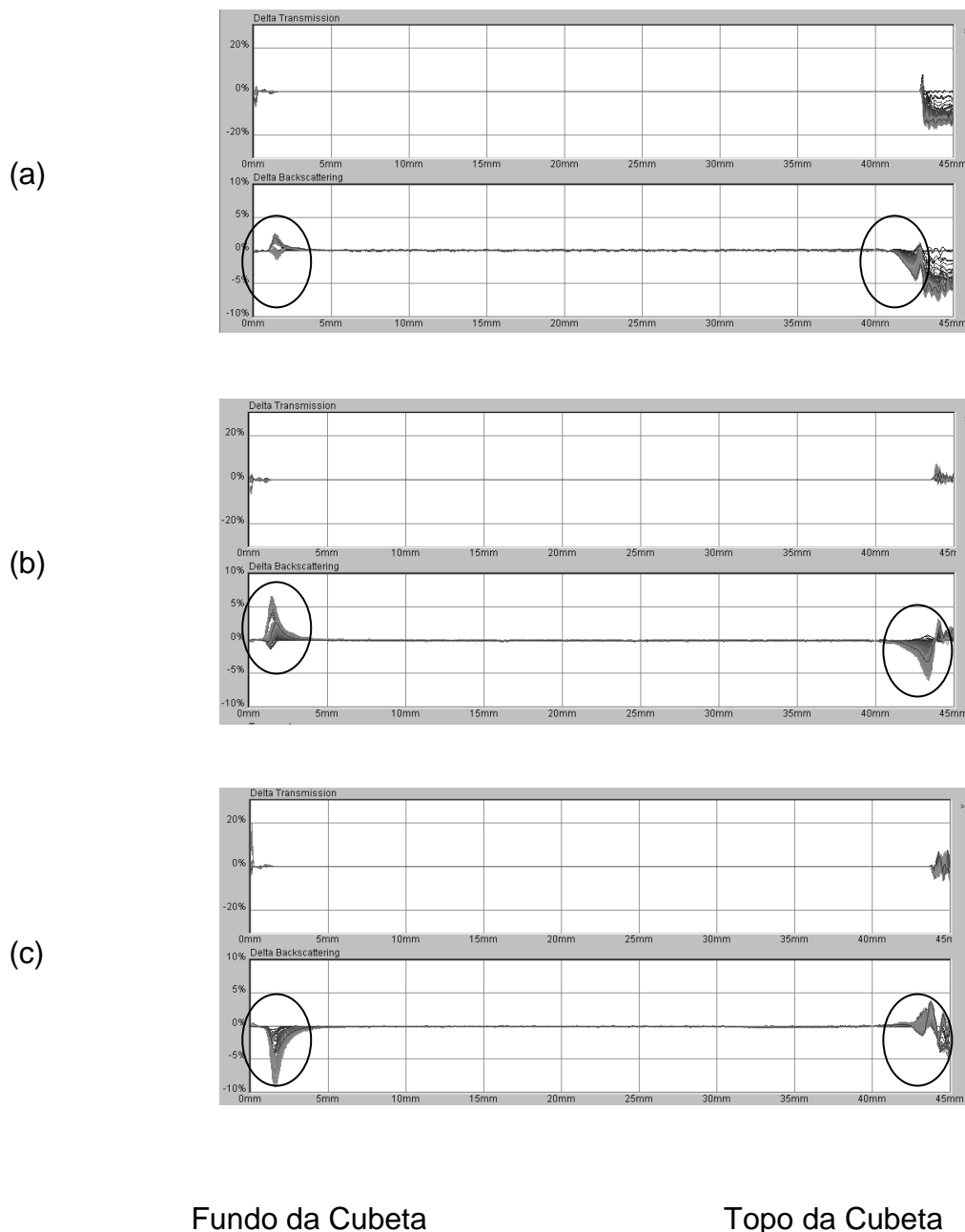


Fig. 5. Gráficos de variação de retroespalhamento de luz: (a) *ncc-eudagit* (b) *ncc-pclspan* e (c) *ncc-pcllipoid*.

Os teores de capsaicinóides e as taxas de associação dos fármacos às nanocápsulas apresentaram valores próximos a 100% para as 3 formulações obtidas, como pode ser observado nas Tabelas 10 e 11. Os teores de capsaicinóides permaneceram próximos a 100% após 30 e 90 dias de preparo.

Tabela 10. Teor de capsaicinóides nas formulações. 100% representa o total utilizado para obtenção das formulações (3,22 mg de capsaicina (CP) e 1,67mg de dihidrocapsaicina (DH)).

Dia	<i>ncc-eudragit</i> (%)	<i>ncc-pclspan</i> (%)	<i>ncc-pcllipoid</i> (%)
zero (CP)	97,65 ± 2,27	100,38 ± 1,15	106,39
zero (DH)	102,95 ± 5,58	104,85 ± 2,07	105,9
30 (CP)	99,45 ± 3,34	101,18 ± 0,92	-----
30 (DH)	104,71 ± 2,27	101,64 ± 6,19	-----
90 (CP)	100,01 ± 2,04	96,43 ± 0,36	-----
90 (DH)	104,32 ± 3,72	96,65 ± 9,25	-----

Tabela 11. Taxa de associação dos capsaicinóides às nanocápsulas.

Fármaco	<i>ncc-eudragit</i> (%)	<i>ncc-pclspan</i> (%)	<i>ncc-pcllipoid</i> (%)
CP	99,78 ± 0,05	99,84 ± 0,02	99,14
DH	99,92 ± 0,01	99,94 ± 0,02	99,74

Portanto, as formulações *ncc-pclspan* e *ncc-eudragit* apresentaram características adequadas e foram consideradas estáveis por 90 dias de armazenamento. A escolha da formulação para dar sequência aos estudos foi baseada no valor de polidispersão, que se apresentou mais baixo para a formulação *ncc-eudragit*, e do gráfico de retroespalhamento de luz, que mostrou uma menor tendência a sedimentação para esta formulação. Além disso, esta formulação não possui tensoativo lipofílico, que pode ser irritante para pele, e é obtida a partir de um polímero catiônico, o que determina a obtenção de partículas com potencial zeta positivo. Partículas de carga positiva possuem um maior potencial para aderir sobre a pele, devido às cargas negativas presentes.

8.3 Referências

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

ICH Harmonized tripartite Guideline. Validation of analytical procedures: Methodology. United States of America, 1996.

KOPEC, S. E.; DEBELLIS, R.J.; IRWIN, R.S.; Chemical analyses of freshly prepared and stored capsaicin solutions: implications for tussigenic challenges. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, v.15, p.529-534, 2002.

MARTINDALE, the complete drug reference. 32 ed. Pharmaceutical Press, 1999.

YAO, J.; NAIR, M.G.; CHANDRA, A. Supercritical carbon dioxide extraction of Scotch Bonnet (*Capsicum annum*) and quantification of capsaicin and dihydrocapsaicin. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v. 45, p.1303-1305, 1994.