UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS Instituto de Química Departamento de Físico-Química

Dissertação de Mestrado

# NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS: ENCAPSULAÇÃO DE TRETINOÍNA PARA APLICAÇÃO TÓPICA

Daniela Missiani Ridolfi

Orientador: Prof. Dr. Nelson E. Durán Caballero

Campinas - SP Fevereiro de 2011

## FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP

R439n	Ridolfi, Daniela Missiani. Nanopartículas lipídicas sólidas: encapsulação de tretinoína para aplicação tópica / Daniela Missiani Ridolfi. Campinas, SP: [s.n], 2011.
	Orientador: Prof. Dr. Nelson Eduardo Durán Caballero.
	Mestrado - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.
	<ol> <li>Nanopartículas lipídicas sólidas.</li> <li>Tretinoína.</li> <li>Quitosana.</li> <li>Durán Caballero, Nelson Eduardo.</li> <li>Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química.</li> <li>Título.</li> </ol>

**Título em inglês:** Solid lipid nanoparticles: encapsulation of tretinoin to topical application

Palavras-chaves em inglês: Solid lipid nanoparticles, Tretinoin, Chitosan

Área de concentração: Físico-Química

Titulação: Mestre em Química na área de Físico-Química

**Banca examinadora:** Prof. Dr. Nelson Eduardo Durán Caballero (orientador), Profa. Dra. Lucimara Gaziola de la Torre (FEQ-UNICAMP), Prof. Dr. Renato Atilio Jorge (IQ-UNICAMP)

Data de defesa: 18/02/2011

## Agradecimentos

- Primeiramente a Deus pela saúde e paciência para seguir adiante.
- Aos meus pais, irmãos e ao meu namorado, Rafael, pelo apoio e compreensão.
- Ao Prof. Nelson Duran e à Priscyla D. Marcato pela orientação, amizade e apoio.
- Ao grupo do professor Fábio Augusto por permitir a utilização do cromatógrafo gasoso.
- Ao grupo da professora Maria Helena Andrade Santana, da FEQ-Unicamp, pela doação da quitosana.
- A Croda (Brasil) pela doação dos lipídios.
- Ao grupo da Prof. Lucimara G. de la Torre da FEQ-Unicamp pela doação do acetato de uranila.
- A Fabiana pelas análises térmicas.
- Ao Rodrigo A. Silva, Daisy Machado e Giselle Z. Justo pela realização dos testes de citotoxicidade e fototoxicidade.
- A Lívia Cordi e Bruna Lima pela colaboração nos testes de atividade antibacteriana.
- Ao Carlos Leite pela obtenção das micrografias eletrônicas.
- Aos funcionários do Instituto de Química que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.
- Aos professores do Instituto de Química e de outros institutos da Unicamp não só pelos ensinamentos, mas pela motivação.
- Ao CNPq e a FAPESP pelo apoio financeiro.
- A todos os amigos do laboratório pelo apoio e amizade.
- Aos professores membros da banca, prof. Lucimara e prof. Renato e as professoras suplentes, Patrícia Melo e Ljubica Tasic.
- A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

## CURRICULUM VITAE

Nome: Daniela Missiani Ridolfi

Email: daniela\_ridolfi@hotmail.com/ daniela.ridolfi@gmail.com

## FORMAÇÃO

• Mestrado em Química (03/2009-02/2011) - UNICAMP

**Título do projeto:** Nanopartículas Lipídicas Sólidas: encapsulação de tretinoína para aplicação tópica; **Área:** Físico-Química.

- Licenciatura em Química (03/2008-12/2008) UNICAMP
- Bacharel em Química (03/2004-12/2007) UNICAMP

## PRODUÇÃO CIENTÍFICA

• Iniciação científica (12/2006-12/2007)

Título do projeto: Isolamento e transformação química do ácido (-)-trans ózico

em derivado com potencial atividade biológica; Àrea: Química Orgânica;

Orientador: Paulo Mitsuo Imamura (IQ-UNICAMP).

## • Resumos de trabalhos científicos apresentados em congressos

Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS) para encapsulação de tretinoína em aplicações dérmicas. RIDOLFI, D.M.; MARCATO, P.D.; MACHADO, D.; DURAN, N. 1º Simpósio em Nanociências e Materiais Avançados, Universidade Federal do ABC, Santo André-SP, Brasil, apresentação de pôster, 22-23 de Novembro de 2010.

*In vitro* cytotoxicity assays of Solid Lipid Nanoparticles in epithelial and dermal cells. RIDOLFI, D.M.; MARCATO, P.D.; MACHADO, D.; SILVA, R.A.; JUSTO, G.Z.; DURAN, N. Nanosafe 2010, Grenoble, França, apresentação oral, 16-18 de Novembro de 2010.

Solid Lipid Nanoparticles (SLN) for dermal application of tretinoin: *in vitro* cytotoxicity and phototoxicity. RIDOLFI, D.M.; MARCATO, P.D.; MACHADO, D.; SILVA, R.A.; JUSTO, G.Z.; DURAN, N. XXXIX Annual Meeting of Brazilian Biochemistry and Molecular Biology Society (SBBq), Foz do Iguaçu-PR, Brasil, apresentação de pôster, 18-21 de Maio de 2010.

Nanocytoxicological platform for different nanocarriers. DURAN, N.; RIDOLFI, D.M.; MARCATO, P.D.; JUSTO, G.Z.; DURAN, M.; MELO, P.S.; ROSSI, B.B.; CONTI, R. XXXIX Annual Meeting of Brazilian Biochemistry and Molecular Biology Society (SBBq), Foz do Iguaçu-PR, Brasil, apresentação de poster, 18-21 de Maio de 2010.

Chitosan to improve properties of Solid Lipid Nanoparticles (SLN) in treatment of skin diseases. RIDOLFI, D. M.; MARCATO, P.D.; MACHADO, D.; SILVA, R.A.; JUSTO, G.Z.; DURAN, N. International Symposium on Natural Polymers and Composites, Gramado-RS, Brasil, apresentação de pôster, 7-10 de Setembro de 2010.

**Preparation of Solid Lipid Nanoparticles coated with chitosan for topical delivery of tretinoin.** RIDOLFI, D.M.; MARCATO, P.D.; DURAN, N. 7th International Congress of Pharmaceutical Sciences (CIFARP 2009), Ribeirão Preto-SP, Brasil, apresentação de pôster, 6-9 de Setembro de 2009.

**Solid Lipid Nanoparticles (SLN) for topical delivery of tretinoin.** RIDOLFI, D.M.; MARCATO, P.D.; DURAN, N. International Workshop on Nanomaterials and Functional Materials, Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, Brasil, apresentação de pôster, 9-11 de Agosto de 2009.

#### • Publicação

D M Ridolfi, P D Marcato, D Machado, R A Silva, G Z Justo and N Durán. *In vitro* cytotoxicity assays of Solid Lipid Nanoparticles in epithelial and dermal cells. *Journal of Physics: Conference Series*. No prelo (2011).

## ATIVIDADES ACADÊMICAS

- Monitorias
- Participação no "Programa de Estágio Docente" (PED): 1° Semestre/2010 -QF 431 (Físico-Química I), IQ-UNICAMP.
- Participação no "Programa de Apóio Didático" (PAD): 2° Semestre/2007 -QG 100 (Química Geral), IQ-UNICAMP.

## OUTRAS ATIVIDADES

- Estágio na área de surfactantes: Clariant Laboratório de Desenvolvimento e Aplicação Técnica. Período: 01/2008-11/2008
- Professora de Química (voluntária): Curso Pré-Vestibulinho "Alpha", Barão Geraldo, Campinas-SP. Período: 08/2008-12/2008

## RESUMO

# NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS: ENCAPSULAÇÃO DE TRETINOÍNA PARA APLICAÇÃO TÓPICA

Tretinoína (ácido todo-trans-retinóico) é empregada no tratamento tópico de várias doenças de pele, no entanto sua utilização é fortemente limitada pelos efeitos colaterais que apresenta e pela sua alta instabilidade química. Neste trabalho tretinoína foi encapsulada em nanopartículas lipídicas sólidas (NLS-TRE) e em NLS recobertas com guitosana (NLS-Quitosana-TRE). Ambas as partículas apresentaram alta eficiência de encapsulação, alta estabilidade física e morfologia esférica. As NLS-Quitosana-TRE apresentaram menor cristalinidade em relação às NLS sem guitosana. A capacidade de transporte das nanopartículas foi limitada pela baixa taxa de solubilização da tretinoína no lipídio fundido, nas condições de preparação. A adição de etanol na preparação das nanopartículas aumentou a capacidade de transporte, no entanto a estabilidade das dispersões foi alterada (as NLS sem quitosana permaneceram estáveis por apenas um mês e as NLS com quitosana se desestabilizaram logo após a preparação). Ambas as partículas não apresentaram potencial citotóxico em células de fibroblastos e queratinócitos. A encapsulação de tretinoína em NLS reduziu de forma significativa sua fototoxicidade, o que evidencia o efeito protetor da matriz lipídica. As NLS-Quitosana-TRE apresentaram alta atividade antibacteriana contra as principais bactérias envolvidas na acne (S. epidermidis e P. acnes) e contra a S. aureus, também envolvida em infecções de pele. Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir que as NLS, com e sem recobrimento com guitosana, possuem um grande potencial para encapsulação de tretinoína em aplicações dérmicas. O recobrimento com quitosana pode melhorar ainda mais as propriedades das NLS como sistema carreador de tretinoína, uma vez que as NLS-Quitosana-TRE apresentaram atividade antibacteriana contra bactérias envolvidas em infecções de pele e desta forma podem aumentar a eficácia terapêutica no tratamento tópico da acne e de outras doenças de pele.

## ABSTRACT

# SOLID LIPID NANOPARTICLES: ENCAPSULATION OF TRETINOIN FOR TOPICAL APPLICATION

Tretinoin (all-trans retinoic acid) is employed in the topical treatment of various skin diseases, however, its uses is strongly limited by their side effects and high chemical instability. In this work tretinoin was encapsulated in solid lipid nanoparticles (SLN-TRE) and SLN coated with chitosan (SLN-Chitosan-TRE). Both particles exhibited high entrapment efficiency, high physical stability and spherical morphology. The SLN-chitosan-TRE presented lower crystallinity compared to SLN without chitosan. The loading capacity of nanoparticles was limited by the low solubilization rate of tretinoin in the melted lipid at the preparation's conditions. The addition of ethanol in the nanoparticles preparation increased the loading capacity, however the dispersion stability was altered (the SLN without chitosan remained stable by only one month and the SLN with chitosan destabilized after preparation). Both particles were not cytotoxic to either fibroblasts or keratinocytes cells. The tretinoin encapsulation in SLN decreased significantly its phototoxicity, which shows a protector effect by the lipid matrix. The SLN-Chitosan-TRE exhibited high antibacterial activity against the main bacteria involved in the acne (S. epidermidis and P. acnes) and against the S. aureus which is involved in skin infections. The results obtained in this work allows us to conclude that the SLN, with and without coating with chitosan, have a great potential for encapsulation of tretinoin in dermal application. The coating with chitosan can improve the SLN properties as carrier for tretinoin because the SLN-Chitosan-TRE exhibited antibacterial activity against bacteria involved in skin infections and therefore can improve the therapeutic efficacy in the topical treatment of acne and other skin diseases.

# ÍNDICE

RESUMO viiii
ABSTRACT viiii
LISTA DE TABELAS xii
LISTA DE FIGURAS xiiii
1. INTRODUÇÃO       1         1.1. Retinoídes       1         1.2. Tretinoína       1         1.3. Sistemas nanoestruturados e encapsulação de Tretinoína para       0
1.4. Nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) para encapsulação de tretinoína
1.4.1. Preparação de NLS.41.4.2. NLS em aplicações dérmicas51.5. Recobrimento de NLS com Quitosana61.5.1. Quitosana61.5.2. Propriedades e aplicações da Quitosana71.6. Citotoxicidade de nanopartículas8
2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS
3. METODOLOGIA       11         3.1. Materiais       11         3.1.1. Lipídios       11         3.1.2. Quitosana       11         3.1.3. Estabilizante       11         3.1.4. Estabilizante       11         3.2. Preparação das nanopartículas       12         3.2.1. Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS-TRE)       12         3.2.2. NLS com Quitosana (NLS-Quitosana-TRE)       13         3.2.3. NLS preparadas com adição de etanol       13         3.3.1. Diâmetro médio e potencial zeta       13         3.3.2. Eficiência de encapsulação       14         3.3.3. Quantificação do etanol nas dispersões de NLS       15         3.3.4. Ensaios de liberação in vitro de tretinoína       15         3.2.4. Ensaios de liberação in vitro de tretinoína       15

<ul> <li>3.4. Ensaios de citotoxicidade <i>in vitro</i></li></ul>	17 18 19 20
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	. 21
4.1. Caracterização das nanopartículas	. 21
4.1.1. Diâmetro médio, potencial zeta e eficiência de encapsulação	. 21
4.1.2. Capacidade de transporte	. 22
4.1.3. Morfologia	. 26
4.1.4. Estabilidade física	. 30
4.1.5. Comportamento térmico e cristalinidade	. 34
4.2. Citotoxicidade	. 37
4.2.1. Efeito da matriz lipídica	. 37
4.2.2. Citotoxicidade da tretinoína livre	. 39
4.2.3. Citotoxicidade das nanopartículas	. 39
4.3. Fototoxicidade	. 41
4.4. Atividade Antibacteriana	. 43
5. CONCLUSÕES	. 46
6. REFERENCIAS	. 47
7 ANEXOS	52
	. 53

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Fórmula química e faixa de ponto de fusão dos lipídios sólidos utilizadosna preparação de NLS11

**Tabela 2.** Diâmetro médio (Z-Average), PI, potencial zeta e EE das dispersões deNLS sem e com quitosana22

**Tabela 3**. Diâmetro médio (Z-Average), PI e potencial zeta das dispersões de NLSsem quitosana preparadas com etanol armazenadas sob refrigeração (4°C) eprotegidas da luz24

Tabela	6.	Diâmetro	médio	(Z-Average),	PI (	e potencial	zeta	das	dispersões	das
NLS va	azia	s								37

Tabela 7. Concentração inibitória mínima (CIM) das NLS-Quitosana-TRE ..........45

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura do isopreno1
Figura 2. Estrutura da tretinoína2
<b>Figura 3.</b> Estrutura da Quitosana. A proporção entre as unidades <i>D</i> -glicosamina (x) e <i>N</i> -acetil- <i>D</i> -glicosamina (y) variam
<b>Figura 4.</b> Estrutura química do Pluronic F68, onde n=75 unidades poli (oxido de etileno) (PEO) e m=30 unidades de poli (oxido de propileno) (PPO) (Croy e Kwon, 2004).
Figura 5. Reação de redução do corante 3-brometo de (4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5- difenil-tetrazólio (MTT) à formazan. Esta reação ocorre somente em células viáveis e portanto é um indicativo de viabilidade celular (Fotakis and Timbrell et al., 2006). 
Figura 6. Estrutura do miristato de miristila 21
Figura 7. Liberação da tretinoína das NLS feitas com e sem etanol (contendo 1.7% m/m de tretinoína)25
Figura 8. Micrografia de AFM das NLS recobertas com quitosana: A) Imagem topográfica, B) Representação 3D da topografia27
Figura 9. Micrografia de AFM das NLS recobertas com quitosana: A) Imagem topográfica, B) Representação 3D da topografia
Figura 10. Micrografia de TEM das NLS sem quitosana tratadas com acetato de uranila
<b>Figura 11.</b> Valores de diâmetro médio (Z-Average) das dispersões de NLS vazias (sem tretinoína), com e sem quitosana, em função do tempo decorrido após a preparação. Dados mostrados como média ± desvio padrão, n=3
<b>Figura 12.</b> Valores de potencial zeta das dispersões de NLS vazias (sem tretinoína), com e sem quitosana, em função do tempo decorrido após a preparação. Dados mostrados como média ± desvio padrão, n=3
<b>Figura 13.</b> Valores de diâmetro médio (Z-Average) das dispersões de NLS com tretinoína, com e sem quitosana, em função do tempo decorrido após a preparação. Dados mostrados como média ± desvio padrão, n=3 <b>32</b>

 Figura 16.
 Termogramas das NLS sem quitosana (NLS-TRE) e com Quitosana (NLS-Quitosana-TRE)

 35

**Figura 18.** Citotoxicidade da tretinoína em células BALB/c 3T3 e HaCaT. Dados mostrados como média ± desvio padrão, n=5......**39** 

**Figura 19.** Citotoxicidade das NLS-TRE em células BALB/c 3T3 e HaCaT. Dados mostrados como média ± desvio padrão, n=5......**40** 

**Figura 23.** Placas correspondentes ao tratamento da bactéria *S. aureus* com (A) NLS sem quitosana e (B) NLS recobertas com quitosana......**44** 

## 1. INTRODUÇÃO

#### 1.1. Retinóides

O termo "retinóide" é largamente utilizado para se referir as moléculas de ocorrência natural e compostos sintéticos com ações característica da vitamina A (retinol). De acordo com a IUPAC (União Internacional de Química Pura e Aplicada) os retinóides são definidos como compostos contendo quatro unidades de isopreno (Figura 1) unidas de uma maneira cabeça-cauda (Darlenski et al., 2010).

CH₂

Figura 1. Estrutura do isopreno

## 1.2. Tretinoína

A tretinoína (Figura 2), ou ácido *todo-trans*-retinóico, é o principal metabólito endógeno da vitamina A (o mais ativo metabolicamente) que encontra aplicações em terapia e prevenção de câncer e no tratamento de doenças dermatológicas (Njar et al., 2006). A tretinoína desempenha um papel importante na regulação da expressão gênica, em diferenciação celular, proliferação de células epiteliais (Njar et al., 2006), produção de sebo e síntese de colágeno (Shah et al., 2007). O mecanismo pelo qual a tretinoína produz essa variedade de efeitos fisiológicos ocorre pela interação com receptores nucleares específicos (Abu et al., 2005).

Devido a esses múltiplos efeitos fisiológicos atualmente a tretinoína está sendo testada em ensaios clínicos para o tratamento de linfoma, leucemia, melanoma, câncer de pulmão, colo do útero e outros (Bushue and Wan, 2010) e é empregada no tratamento tópico de várias doenças inflamatórias e proliferativas da pele tais como psoríase, acne, fotoenvelhecimento e câncer de pele epitelial (Shah et al., 2007).

Apesar de ser largamente utilizada no tratamento tópico de doenças de pele, a tretinoína é altamente instável na presença de oxigênio, luz e calor excessivo e apresenta efeitos indesejados como irritação cutânea, escamação e eritema (Rigopoulos et al., 2004). A encapsulação em sistemas nanoestruturados tem diminuído os efeitos adversos e protegido contra a degradação (Darlenski et al., 2010).



Figura 2. Estrutura da tretinoína

# 1.3. Sistemas nanoestruturados e encapsulação de Tretinoína para aplicação tópica

Os sistemas nanoestruturados incluem estruturas como os lipossomas, niossomas, ciclodextrinas, dendrímeros e nanopartículas poliméricas que são utilizados no transporte e liberação de fármacos de forma sustentada ou controlada. Quando o veículo empregado promove apenas uma liberação em tempo prolongado este é denominado sistema de liberação sustentada. Estes sistemas constituem uma importante estratégia dentro da tecnologia farmacêutica pois apresentam vantagens em relação às formas de dosagens convencionais como, por exemplo, maior eficácia terapêutica, diminuição do número de doses e diminuição de efeitos colaterais com a possibilidade de direcionar o fármaco a alvos específicos, além de proteção contra processos de instabilidade e decomposição (Durán et al., 2009).

Para a tretinoína, a incorporação em lipossomas mostrou aumento da sua estabilidade química diminuindo a sua foto-degradação. Além disso, a atividade comedolítica da tretinoína, isto é a capacidade de penetrar no folículo pilossebáceo auxiliando a dissolver o sebo dos microcomedões e comedões

2

(folículos pilosos aumentados e cheios de sebo), em lipossomas foi de 5 a 10 vezes maior em relação às preparações convencionais (géis alcoólicos) e também aumentou a tolerabilidade local (Brisaert et al., 2001). Resultados de testes de permeação *in vitro* realizados em pele de porco mostraram que formulações de tretinoína incorporada em niossomas são capazes de promover uma maior retenção cutânea da tretinoína em relação à formulação comercial e lipossomal (Marconi et al., 2006). Nanopartículas poliméricas também têm sido estudadas como veículo para tretinoína. Um aumento na fotoestabilidade da tretinoína foi observado quando esta foi encapsulada em nanocápsulas de poli (ε-caprolactona) (Ourique et al., 2008).

# 1.4. Nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) para encapsulação de tretinoína

As nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) são partículas feitas de lipídios sólidos à temperatura ambiente e corporal (Wissing et al., 2004). Estas partículas foram desenvolvidas no começo da década de 90 como um sistema lipidíco coloidal alternativo para liberação sustentada e, atualmente, vêm sendo estudadas para várias rotas de administração (Mehnert et al., 2001). As principais vantagens em relação aos outros sistemas coloidais são: adequada tolerabilidade fisiológica, facilidade de produção em larga escala por uma técnica já bem estabelecida na indústria (homogeneização à alta pressão) e sem o uso de solventes orgânicos e alta estabilidade física durante o tempo de estocagem (Mehnert et al., 2001; Müller et al., 2000, 2007). As limitações que as NLS apresentam são baixa capacidade de transporte (NLS preparadas com lipídios sólidos puros tendem a formar matrizes altamente cristalinas, limitando o espaço para acomodar o fármaco) e expulsão do fármaco devido a transições polimórficas durante o tempo de estocagem (Müller et al., 2002; Wissing et al., 2004). Essas limitações podem ser superadas criando imperfeições na matriz, formando os chamados "carreadores lipídicos nanoestruturados" (CLN). Os CLN surgiram no final da década de 90 com o objetivo de aumentar a capacidade de incorporação e prevenir a expulsão do

fármaco. Os CLN podem ser obtidos por mistura de lipídios diferentes (com cadeias de diferentes tamanhos) que distorce a formação de um cristal perfeito, gerando, desta forma, mais espaço para acomodar uma maior quantidade de fármaco. Outra possibilidade é a mistura de lipídios sólidos com lipídios líquidos (óleo), como, por exemplo, Migliol (triglicerídeo cáprico/caprílico) que reduz a cristalinidade das nanopartículas. Isto evita a expulsão do fármaco das partículas durante a estocagem, já que o processo de cristalização do lipídio para forma polimórfica mais estável (forma  $\beta$ ) não ocorre nessas condições (Muller et al., 2005, 2007; Üner, 2006; Wissing et al., 2004).

As NLS têm sido utilizadas na encapsulação de diversas moléculas entre elas a tretinoína. Um trabalho realizado com tretinoína encapsulada em NLS mostrou um aumento significativo de sua fotoestabilidade em comparação a sua forma livre. Neste mesmo trabalho, testes de irritação dérmica foram realizados em coelhos e a formulação de tretinoína encapsulada em NLS mostrou-se significativamente menos irritante que a formulação de tretinoína comercial (Shah et al., 2007). Resultados similares foram obtidos por Mandawgade et al. (2008). Neste trabalho também foram feitos testes *in vitro* de oclusividade e de permeação. As formulações em gel contendo tretinoína encapsulada em NLS mostraram uma diminuição da perda de água transepidermal significativamente maior do que as formulações comerciais além de apresentarem uma liberação lenta da tretinoína. Os resultados obtidos nestes trabalhos sugerem um grande potencial das NLS para a encapsulação de tretinoína.

## 1.4.1. Preparação de NLS

NLS podem ser preparadas por diversas técnicas, no entanto uma delas se destaca por ser uma técnica de fácil escalonamento, que não utiliza solventes orgânicos e muito utilizada desde os anos 50 em indústrias farmacêuticas e cosméticas. Esta técnica é a chamada homogeneização à alta pressão e tem sido utilizada há anos para a produção de nanoemulsões para nutrição parenteral. Existem dois tipos de homogeneização: a quente e a frio. Em ambas as técnicas o

lipídio é fundido (a uma temperatura de aproximadamente 5-10°C acima do ponto de fusão do lipídio) e, em seguida, o fármaco é adicionado. Na homogeneização a quente o lipídio fundido contendo o fármaco dissolvido é disperso sob agitação em uma solução aquosa quente de surfactante na mesma temperatura do lipídio formando uma pré-emulsão óleo em água. Esta pré-emulsão é homogeneizada a alta pressão por um ou mais ciclos. Após a homogeneização, a dispersão é resfriada a uma temperatura abaixo da temperatura ambiente formando as NLS. Na homogeneização a frio, o lipídio fundido contendo o fármaco dissolvido é solidificado em gelo seco ou nitrogênio líquido e, em seguida, triturado formando micropartículas lipídicas sólidas. Após a moagem das partículas, estas são adicionadas a uma solução aguosa de surfactante sob agitação e, em seguida, homogeneizada à alta pressão (Mehnert et al., 2001; Müller et al., 2000). A homogeneização a frio é adequada para fármacos muito sensíveis à alta temperatura e/ou hidrofílicos. Neste ultimo caso, o processo de homogeneização a frio evita, ou minimiza, a migração do fármaco para a fase aguosa aumentando a sua eficiência de encapsulação. A homogeneização a quente também é adeguada para fármacos que apresentam alguma sensibilidade a temperatura pois a exposição a uma temperatura alta é relativamente curta (Müller, et al. 2000). A distribuição de tamanho das partículas formadas em ambos os processos (homogeneização à quente ou à frio) é influenciada pelo tipo de homogeneizador. a pressão aplicada, o número de ciclos de homogeneização e a temperatura durante o processo de homogeneização (Mehnert et al., 2001; Wissing et al., 2004). Em geral, a homogeneização a frio produz partículas maiores e com uma distribuição larga de tamanhos (Mehnert et al., 2001).

## 1.4.2. NLS em aplicações dérmicas

Desde a segunda metade da década de 90 vem crescendo o interesse em investigar o uso de NLS em aplicações dérmicas devido aos benefícios trazidos por estes sistemas como, por exemplo, o aumento da estabilidade química do composto encapsulado, aumento da hidratação da pele devido ao efeito oclusivo

5

destas partículas sobre a pele, aumento da biodisponibilidade de fármacos na pele e estabilidade física em formulações tópicas (Muller et al., 2002; Muller et al., 2007). Diversas moléculas de interesse farmacêutico e cosmético vêm sendo incorporadas em NLS para aplicação tópica e já há produtos lançados no mercado com esta tecnologia desde 2005 (Pardeike et al., 2009).

## 1.5. Recobrimento de NLS com Quitosana

## 1.5.1. Quitosana

A quitosana é um copolímero constituído por unidades *N*-acetil-*D*glicosamina e *D*-glicosamina em proporções variáveis (Figura 3) tipicamente obtida pela desacetilação da quitina apresentando, predominantemente, unidades *D*-glicosamina. A quitina é o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza depois da celulose, considerando a quantidade produzida anualmente no mundo, encontrada em diversos seres vivos, como por exemplo, em exoesqueletos de artrópodes e paredes celulares de fungos e leveduras. Atualmente as principais fontes de quitina exploradas comercialmente são as carapaças de camarão e caranguejo (Rinaudo, 2006).



**Figura 3.** Estrutura da Quitosana. A proporção entre as unidades *D*-glicosamina (x) e *N*-acetil-*D*-glicosamina (y) variam.

#### 1.5.2. Propriedades e aplicações da Quitosana

Quitosana e quitina, bem como derivados da quitosana, são empregados em diversas áreas, como na agricultura, na indústria de alimentos, no desenvolvimento de biomateriais e de sistemas de transporte de fármacos (Khoushab et al., 2010).

Além de ser um polímero biocompatível, biodegradável e atóxico, a quitosana possui propriedades biológicas interessantes como atividade antimicrobiana (Khoushab et al., 2010), potente ação analgésica tópica (Okamoto et al., 2002) e propriedades de aceleração do processo de cicatrização (Khoushab et al., 2010). Outra propriedade muito importante para a área farmacêutica e cosmética da quitosana é a bioadesão. Devido às cargas positivas em pH fisiológico (grupos amino protonados) a quitosana tem a capacidade de aderir a superfícies carregadas negativamente como pele e mucosas, aumentando a retenção do princípio ativo no local de aplicação, melhorando desta forma a biodisponibilidade do fármaco (Berger et al., 2004). Além disso, a quitosana tem a capacidade de induzir uma abertura temporária das junções epiteliais e portanto pode aumentar a permeabilidade especialmente para fármacos polares, incluindo peptídeos e proteínas (Nagpal et. al, 2010).

As propriedades físico-químicas e, conseqüentemente, as propriedades biológicas da quitosana dependem do seu grau de desacetilação, da distribuição média dos grupos acetil ao longo da cadeia principal e de sua massa molar (Azevedo et al., 2007).

O mecanismo de ação antimicrobiana da quitosana ainda não foi completamente elucidado, no entanto algumas hipóteses foram propostas como forte interação eletrostática com a membrana celular das bactérias, causando sua ruptura e liberando os conteúdos celulares, efeito quelante sobre íons metálicos e outros nutrientes essenciais para a sobrevivência da bactéria e inibição de síntese protéica (Kong et. al, 2010).

Na área farmacêutica as nano e micropartículas de quitosana são utilizadas em diversas aplicações como na terapia de câncer, na terapia gênica, na liberação

7

de fármacos em mucosas e pele e em aplicações oculares (Agnihotri et. al, 2004, Nagpal et. al, 2010).

Na área de sistemas de transporte de fármacos, a guitosana também é utilizada como material de recobrimento (Agnihotri et. al, 2004). NLS têm sido recobertas com quitosana para associar as vantagens das NLS e as propriedades biológicas da guitosana. Por exemplo, no trabalho de Fuentes et al. (2005) NLS recobertas com guitosana foram desenvolvidas para administração oral de peptídeos devido à habilidade das NLS em proteger peptídeos da degradação e à propriedade da guitosana em aumentar o transporte através da mucosa devido à maior interação com o epitélio. Outro exemplo de associação entre NLS e quitosana envolveu a encapsulação do 7-dehidrocolesterol (7-DHC) que possui restrição ao uso devido a sua baixa solubilidade e estabilidade química. Inicialmente o 7-DHC foi incorporado em NLS utilizando lecitina hidrogenada e polisorbato 60 como estabilizante e, em seguida, foi adicionado quitosana na dispersão de NLS, obtendo-se partículas carregadas positivamente. Comparadas com nanoemulsões e NLS sem guitosana, as NLS-Quitosana foram mais efetivas para estabilizar o 7-DHC (Lee et al., 2005). Um trabalho mais recente desenvolveu NLS associada com quitosana contendo ciclosporina A (CsA) para aplicação ocular. As propriedades de penetração e permeação das NLS foram avaliadas através de testes in vitro (cultura de células) e ex vivo (córnea de porco). A captação das NLS pelas células foi estudada por meio de microscopia confocal. As NLS associadas com quitosana foram biocompatíveis e aumentaram a permeação/penetração de CsA juntamente com um possível mecanismo de internalização/captação das nanopartículas in vitro e ex vivo (Sandri et al., 2010).

## 1.6. Citotoxicidade de nanopartículas

Nanopartículas podem causar citotoxicidade por aderência da partícula à membrana celular, degradação e subseqüente liberação de produtos de degradação tóxicos. Outro mecanismo é a internalização de nanopartículas pelas células, degradação intracelular e subseqüente efeitos tóxicos dentro da célula

8

(Pardeike et al., 2009). A citotoxicidade das NLS é considerada baixa quando comparada com nanopartículas poliméricas (Müller et al., 1997a), no entanto podem apresentar alta citotoxicidade dependendo do lipídio e surfactante utilizados e também da concentração de nanopartículas (Müller et al., 1997b; Schöler et al., 2002; Weyenberg et al., 2007). Portanto, a escolha da matriz lipídica e do surfactante é essencial para preparar uma formulação segura.

Para avaliar a segurança de uma nova formulação a primeira etapa freqüentemente envolve testes de citotoxicidade *in vitro* (Lewinski et al., 2008). Estes testes podem ser realizados com diferentes tipos de células que são escolhidas dependendo do tipo de aplicação das mesmas. Por exemplo, para uma aplicação tópica em geral são utilizadas células de fibroblastos e queratinócitos que são as células predominantes na derme e epiderme, respectivamente.

## 2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Além dos benefícios proporcionados pela matriz sólida das NLS (proteção contra degradação da tretinoína e liberação sustentada), as NLS recobertas com quitosana têm o potencial de aumentar a eficácia terapêutica da tretinoína no tratamento tópico de doenças de pele devido à propriedade de bioadesão da quitosana. Além disso, a atividade antimicrobiana da quitosana é particularmente importante para o tratamento da acne, pois uma das etapas envolvidas no desenvolvimento desta doença é a colonização bacteriana (Castro et al., 2007). Portanto, considerando o grande potencial dessas partículas como sistemas de transporte de tretinoína, as vantagens das NLS em relação aos outros sistemas coloidais, do ponto de vista tecnológico e terapêutico, e que até o momento não foram encontradas na literatura NLS recobertas com quitosana para encapsulação de tretinoína, o objetivo geral deste trabalho foi avaliar o potencial de NLS, com e sem recobrimento de quitosana, para a encapsulação de tretinoína em aplicações tópicas.

## 2.1. Objetivos Específicos

- Prepararação de NLS, com e sem recobrimento de quitosana, contendo tretinoína pelo método de homogeneização à alta pressão;
- Caracterização das nanopartículas quanto ao diâmetro médio, potencial zeta, eficiência de encapsulação e capacidade de transporte de tretinoína;
- Avaliação da estabilidade física das dispersões de nanopartículas;
- Avaliação da morfologia, comportamento térmico e cristalinidade;
- Avaliação do potencial citototóxico e fototóxico das nanopartículas;
- Avaliação e quantificação da atividade antimicrobiana das nanopartículas recobertas com quitosana.

## 3. METODOLOGIA

## 3.1. Materiais

## 3.1.1. Lipídios

Os lipídios sólidos utilizados (Tabela 1) foram doados pela Croda (Brasil).

**Tabela 1**. Fórmula química e faixa de ponto de fusão dos lipídios sólidos utilizados na preparação de NLS.

Nome comercial	Descrição	Fórmula Química	Ponto de fusão <sup>*</sup>
Crodamol MM	Miristato de miristila	$C_{28}H_{56}O_2$	37-39°C
Crodamol CP	Palmitato de cetila	$C_{32}H_{64}O_2$	50-54°C
Crodamol SS	Mistura de ésteres cetílicos	C <sub>32</sub> H <sub>64</sub> O <sub>2,</sub> C <sub>34</sub> H <sub>68</sub> O <sub>2 e</sub> C <sub>30</sub> H <sub>60</sub> O <sub>2</sub>	43-47°C

\* Fonte: FISPQ do fabricante

## 3.1.2. Quitosana

Foi utilizada quitosana com massa molar média de 296,6 kDa e grau de desacetilção 82,83 ± 3,63% (Severino, 2008), doada pelo grupo da Prof. Dr. Maria Helena Andrade Santana, da Faculdade de Engenharia Química da Unicamp.

## 3.1.3. Estabilizante

Como estabilizante foi utilizado o Pluronic F68 que é aprovado pelo FDA (Food and Drug Administration) para aplicações médicas e farmacêuticas. Este surfactante é um copolímero tribloco constituído por um bloco central composto de poli (oxido de propileno) (PPO) ligado em ambos os lados por um grupo de poli (oxido de etileno) (PEO) (Figura 4).



**Figura 4.** Estrutura química do Pluronic F68, onde n=75 unidades poli (oxido de etileno) (PEO) e m=30 unidades de poli (oxido de propileno) (PPO) (Croy e Kwon, 2004).

## 3.2. Preparação das nanopartículas

As nanopartículas foram preparadas pela técnica de homogeneização à alta pressão a quente.

#### 3.2.1. Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS-TRE)

O lipídio (miristato de miristila) foi aquecido a 65 °C e, em seguida, a tretinoína foi adicionada. Esta mistura foi mantida a 65 °C sob agitação magnética por 5 minutos para a solubilização da tretinoína no lipídio fundido e, então, foi adicionada a uma solução aquosa de Pluronic F68 (0,5%) na mesma temperatura do lipídio sob agitação de 6000 rpm em Ultra-Turrax (Ultra-turrax® T18) formando uma pré-emulsão óleo em água. Em seguida, esta pré-emulsão foi adicionada ainda quente ao homogeneizador de alta pressão (Panda 2k da Niro Soavi, Itália). A homogeneização foi feita com pressão no primeiro estágio de 600-1000 bar e pressão no segundo estágio de 10% da pressão do primeiro estágio por três ciclos. Após os ciclos a dispersão foi resfriada a 25°C, formando as NLS (Üner, 2006).

## 3.2.2. NLS com Quitosana (NLS-Quitosana-TRE)

Inicialmente foi preparada uma fase aquosa contendo 0,5% de Pluronic F68 e 1% de quitosana. O pH desta solução foi ajustado para 4,3 com adição de ácido clorídrico concentrado. O lipídio (miristato de miristila) fundido (65°C) contendo tretinoína foi adicionado à fase aquosa na mesma temperatura do lipídio sob agitação de 6000 rpm em UltraTurrax formando uma pré-emulsão óleo em água. Esta pré-emulsão foi homogeneizada à alta pressão sob pressão (600/60 bar -1°/2°estagio). Em seguida, a dispersão foi resfriada a 25 °C, formando as nanopartículas (Marcato et al., 2010).

#### 3.2.3. NLS preparadas com adição de etanol

Primeiramente o etanol (4 mL) foi aquecido e quando atingida a temperatura de 65°C a tretinoína foi adicionada. Após 2 minutos, tempo necessário para a solubilização dos cristais de tretinoína, o lipídio foi adicionado e a mistura foi mantida a 65°C por 5 minutos para a evaporação de parte do etanol. Essa mistura foi adicionada à fase aquosa na mesma temperatura e o restante do procedimento foi o mesmo descrito nos itens 3.2.1 e 3.2.2, para as NLS e NLS-Quitosana, respectivamente.

## 3.3. Caracterização das nanopartículas

#### 3.3.1. Diâmetro médio e potencial zeta

A dispersão de nanopartículas foi diluída em água deionizada (1:100) e o diâmetro médio (Z-average) e o potencial zeta foram medidos no equipamento Nano ZS Zetasizer Malvern® a 25°C. Neste equipamento, as medidas de diâmetro médio são obtidas pela técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS), onde se obtém o coeficiente de difusão das partículas que, pela equação de Stokes-Einstein (Equação 1), está relacionado com o diâmetro hidrodinâmico das mesmas (Levine, 2002). O potencial zeta é obtido através de medidas de mobilidade

eletroforética de acordo com a Equação 2 (Shaw, 1992). Todas as medidas foram feitas em triplicata e os dados foram expressos como a média ± desvio padrão.

d <sub>H</sub> = <u>kT</u> 3πηD	$\label{eq:hamiltonia} \begin{split} d_{H} &= di \hat{a} metro hidrodin \hat{a} mico \\ D &= coeficiente de difusão \\ k &= constante de Boltzmann \qquad \textit{(Equação)} \\ \eta &= viscosidade \\ T &= temperatura \end{split}$		
U <sub>E</sub> = <u>2 ε z f(κa)</u> 3η	U <sub>E</sub> = mobilidade eletroforética ε = constante dielétrica z = potencial zeta f(κa) = função de Henry η = viscosidade	(Equação 2)	

#### 3.3.2. Eficiência de encapsulação

A eficiência de encapsulação (EE) foi obtida medindo-se a concentração de tretinoína livre no meio de dispersão. Para isso, uma alíquota de 50 μL da dispersão de NLS foi diluída em 950 μL de solução 0,5% de Tween (para solubilização de possíveis cristais de tretinoína na dispersão) e 500 μL desta mistura foi transferido para tubos de centrifugação acoplados a filtros Microcon, para a retenção das partículas, contendo uma membrana de ultrafiltração (MWCO 10.000, Millipore®). Os tubos foram centrifugados a 4000 rcf em uma centrifuga 5424 Eppendorf® por 10 minutos. A quantificação da tretinoína no filtrado foi feita por cromatografia liquida de alta eficiência utilizando um cromatógrafo Shimadzu-10A® conectado a um detector de absorbância UV/Vis da Shimadzu (modelo SPD 10A®). Foram realizadas injeções de 20 μL da amostra, e a separação foi feita utilizando-se uma fase móvel de metanol/acetato de amônio (0,1 mol /L, pH 6.0) (85:15), coluna C18 (4.6 mm × 250 mm i.d., Varian) e fluxo de 1 mL/min. A absorbância foi lida no comprimento de onda de 348 nm (Qin, 1996). A curva

analítica utilizada para a quantificação foi obtida por padronização externa, a partir de soluções de tretinoína em metanol na faixa de concentração de 0,03 a 0,60 µg/mL.

O cálculo da EE foi feito através da Equação 3, na qual "C<sub>T</sub>" corresponde à concentração total de tretinoína, considerando a massa inicial adicionada e o volume da fase aquosa, e "C" corresponde à concentração encontrada no filtrado. As medidas de EE foram feitas em triplicata e os dados foram expressos como a média ± desvio padrão.

$$EE(\%) = [(C_T - C)/C_T] \times 10$$
 (Equação 3)

## 3.3.3. Quantificação do etanol nas dispersões de NLS

O resíduo de etanol nas formulações foi quantificado por cromatografia gasosa (CG) com amostragem em Headspace. O modelo do instrumento utilizado foi HP 6890 Series, com detector por ionização em chama, utilizando gás hélio como gás de arraste (1,0 mL/min), temperatura do injetor e detector 250°C, coluna HP-5, com programação do forno 40-250°C (20°C/min). A fibra utilizada para a extração do etanol foi PDMS 100 (polidimetilsiloxano-100 µm) da Supelco. A curva analítica utilizada para a quantificação foi obtida por padronização externa, a partir de misturas contendo de 0 a 1% de etanol. Estas misturas foram preparadas adicionando-se etanol a dispersões de NLS preparadas sem etanol.

## 3.3.4. Ensaios de liberação in vitro de tretinoína

Uma alíquota de 70  $\mu$ L das dispersões de NLS foi diluída em 50 mL de uma mistura de tampão fosfato 50 mmol.L<sup>-1</sup> (pH 7,4), contendo 5% de Tween 80, e etanol a 30 %. Um volume de 1,7 mL desta mistura foi adicionado em frascos pequenos que foram mantidos em uma incubadora orbital a 32,0 ± 0,1°C sob

agitação de 110 rpm. Em determinados intervalos de tempo, os tubos foram recolhidos para a quantificação da tretinoína conforme descrito no item 3.3.2.

## 3.3.5. Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)

As análises foram feitas utilizando o microscópio eletrônico de transmissão Zeiss-LIBRA 120. Uma gota da dispersão de nanopartículas diluída foi adicionada sobre a grade de ouro. Após 5 min o excesso foi retirado com papel de filtro. Uma gota de acetato de uranila (1% (m/m) em água deionizada) foi adicionada sobre a grade para melhorar o contraste das imagens. Após 1 min o excesso foi retirado com papel de filtro e as amostras foram deixadas secar à temperatura ambiente.

## 3.3.6. Microscopia de Força Atômica (AFM)

Para a análise de AFM a dispersão de nanopartículas foi diluída 20 vezes em água deionizada e uma gota dessa dispersão foi adicionada sobre mica fixada em um porta-amostra de latão e secas por 24 h à temperatura ambiente. As imagens foram obtidas em um microscópio de AFM (SPM-9600, Shimadzu) utilizando o modo dinâmico (modo intermitente). Foi utilizado cantilever comercial de silício e a freqüência de ressonância da ponta foi de 210–230 khz.

## 3.3.7. Estabilidade física

A estabilidade física das NLS foi avaliada por medidas do diâmetro médio e potencial zeta das dispersões, como descrito no item 3.3.1., armazenadas sob refrigeração (4°C) e protegidas da luz.

## 3.3.8. Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

Os termogramas das NLS liofilizadas assim como o de cada componente utilizado para a preparação das partículas foram obtidos por DSC (DSC Q100 V9.9 Build 303, TA instruments) utilizando porta-amostras de alumínio do tipo selado. As análises foram feitas sob fluxo gasoso de argônio (50.0 mL/min) e taxa de aquecimento de 5°C/min.

#### 3.4. Ensaios de citotoxicidade in vitro

Neste trabalho, os testes de citotoxicidade foram feitos em células de fibroblastos de camundongo (3T3) e de gueratinócios humanos (HaCaT). Fibroblastos e gueratinócitos são as células predominantes na derme e epiderme, respectivamente. Os ensaios de citotoxicidade foram realizados pelo método de redução do corante 3-brometo de (4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-tetrazólio (MTT), onde a viabilidade celular é avaliada através da medida da capacidade das células de reduzir este corante à formazan (Figura 5). A redução do MTT é catalisada principalmente pelas desidrogenases mitocondriais e também do citoplasma. Portanto, a alteração da função mitocondrial pode ser detectada através da variação da capacidade de redução do MTT. Foram utilizadas as linhagens celulares de fibroblastos de embrião de camundongo BALB/c 3T3, adquirida do NIH (National Institute of Health-Baltimore, USA) e de queratinócitos humanos HaCaT, gentilmente cedida pela Dra. Liudmila Kodach (Academic Medical Center, Amsterdam University). As células BALB/c 3T3 e HaCaT foram cultivadas em meio DMEM e suplementadas com 15% e 10% de soro fetal bovino, respectivamente, e 1% de antibiótico. As células foram plaqueadas em placas de 96 poços, na densidade de 1 x 10<sup>4</sup> células/mL para células BALB/c 3T3 e 0.7 x 10<sup>4</sup> células/mL para HaCaT e incubadas a 37°C sob atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub>. O meio foi substituído por diferentes concentrações de tretinoina e de nanopartículas (vazias e com tretinoína) diluídas em meio suplementado (para a solubilização da tretinoína foi utilizado dimetilsulfóxido). Após 24 horas de incubação, o meio de tratamento foi removido, os pocos foram lavados com tampão fosfato salino (PBS) e foi adicionado meio sem soro contendo o corante MTT (0,5 mg/mL). Após incubação por 4 horas a 37°C, o meio foi retirado cuidadosamente e adicionado 100 µL de etanol para solubilização do formazan. As placas foram agitadas por 10 minutos e a absorbância correspondente a cada poco foi lida no espectrofotômetro

(ELx 800 BIO-TEK) em  $\lambda$  = 570 nm. Os valores foram expressos em porcentagens de redução de MTT em relação ao controle, onde as células não foram expostas aos agentes testes (Mosmann, 1983). Os resultados representam as médias e desvio padrão do experimento.



**Figura 5.** Reação de redução do corante 3-brometo de (4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5difenil-tetrazólio (MTT) à formazan. Esta reação ocorre somente em células viáveis e portanto é um indicativo de viabilidade celular (Fotakis and Timbrell et al., 2006).

#### 3.5. Ensaios de fototoxicidade in vitro

Os ensaios de fototoxicidade foram realizados pelo método de captação de vermelho neutro (VN: hidrocloreto de amino-*m*-dimetilamino-2-metil-fenazina) onde a viabilidade celular é avaliada através da medida da capacidade das células de captar este corante. A captação do VN é realizada pelos lisossomos e então, este teste reflete a integridade da membrana lisossomal e conseqüentemente, é um indicativo da viabilidade celular. As células BALB/c 3T3 e HaCaT foram plaqueadas numa densidade de 1x10<sup>5</sup> células/mL e 7x10<sup>4</sup> células/mL, respectivamente, em duas placas de 96 poços, incubadas a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> por 24 horas (Borenfreund e Puerner, 1984). Após esse período, o meio foi removido e os poços foram lavados duas vezes com o PBS. O tratamento foi feito em várias concentrações de tretinoína e nanopartículas, sendo utilizado como controle positivo de fototoxicidade a hematoporfirina IX (HP) e negativo, a tiourea. O tempo de tratamento foi uma hora. Posteriormente uma placa contendo as amostras foi

exposta à radiação UVA, dose de 5 J/cm<sup>2</sup> (determinada com utilização de radiômetro - Cole Parmer, UVA - 365 nm), por 50 min utilizando-se uma lâmpada de UVA (Bellarium S 100 W - Wolff System). Outra placa contendo as amostras não foi exposta à radiação UVA. Após exposição à radiação o meio foi removido, os poços foram lavados duas vezes com PBS, adicionado meio de cultura com soro e realizada incubação por 22 horas (período de recuperação). Após esse período, o meio de cultura foi removido e em seguida foram adicionados 100 μL do VN, e incubado a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> por 3 horas. Após a incubação, a solução de VN foi removida e as células foram lavadas com PBS, fixadas com solução de formol/cálcio (formol 4% acrescido de CaCl<sub>2</sub> 1%) por 2 minutos e o corante captado pelos lisossomos foi extraído com solução de ácido acético 1%/etanol 50% (Borenfreund e Puerner, 1984). A viabilidade celular foi expressa em porcentagem em relação ao controle, a densidade óptica foi quantificada em espectrofotômetro (ELx 800 BIO-TEK) em 540 nm. Os resultados representam as médias e desvio padrão do experimento.

# 3.6. Determinação da atividade antibacteriana das NLS-Quitosana-TRE

A atividade antibacteriana das NLS-Quitosana foi quantificada através da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) que é a concentração mínima do composto capaz de inibir o crescimento de um dado microrganismo. O valor do CIM foi determinado para as bactérias *Propionibacterium acnes* (ATCC 6919) e *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), que estão envolvidas no processo de desenvolvimento da acne e, *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) que geralmente está envolvida em infecções de pele. Foi utilizado o método das diluições sucessivas, em placas de 96 poços, e plaqueamento. As bactérias foram adicionadas aos poços (10<sup>5</sup> UFC/mL, de acordo com a escala MacFarland) contendo o meio de cultura (Mueller Hinton) e as nanopartículas em concentrações decrescente. Cada concentração foi testada em triplicata. Um controle positivo, contendo meio de cultura e bactérias, e um negativo, contendo

as nanopartículas em meio de cultura sem bactérias, foram incluídos nos testes para cada bactéria testada. Após 24 horas de incubação à 37ºC em estufa bacteriológica, foi feito o plaqueamento em meio de cultura sólido (Mueller Hinton) e as placas foram incubadas novamente à 37ºC por 24 horas para avaliar o crescimento ou não das cepas. O CIM foi definido como a menor concentração de NLS capaz de inibir o crescimento visível após 24 horas de incubação (Fontana et al., 1998).

## 3.7. Análise Estatística

A análise estatística dos dados foi feita pelo teste ANOVA e teste de Tukey, com nível de significância de 5% ( $\alpha = 0,05$ ).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

## 4.1. Caracterização das nanopartículas

## 4.1.1. Diâmetro médio, potencial zeta e eficiência de encapsulação

O lipídio utilizado para a preparação das NLS foi o miristato de miristila (Figura 6), o qual foi escolhido devido ao seu baixo ponto de fusão (Tabela 1) que permite a preparação das partículas a temperaturas mais baixas, o que é importante no caso de compostos termosensíveis como a tretinoína. Os valores de diâmetro médio (Z-Average), índice de polidispersidade (PI), potencial zeta e eficiência de encapsulação (EE) obtidos após a preparação das NLS sem e com quitosana (NLS-TRE e NLS-Quitosana-TRE) estão apresentados na Tabela 2. A equação da reta correspondente à curva de calibração utilizada na quantificação da tretinoína para o cálculo da EE está apresentada no anexo 1. Nos anexos 2 e 3 estão apresentadas curvas representativas de distribuição de tamanhos, obtidas por número, intensidade e volume, de cada tipo de partícula.



Figura 6. Estrutura do miristato de miristila.

As NLS preparadas sem quitosana apresentaram uma distribuição estreita de tamanhos (baixo PI) e potencial zeta negativo. A adição de quitosana na produção de NLS resultou em partículas maiores, com uma distribuição mais polidispersa e potencial zeta positivo. A mudança de potencial zeta negativo para positivo confirma o recobrimento da superfície das partículas com quitosana que possui carga positiva, no pH das dispersões, devido à protonação dos grupos amina. A presença desta carga resultou em um potencial zeta maior, em módulo, em relação às NLS sem quitosana, o que produz uma maior repulsão eletrostática entre as partículas e pode resultar em uma maior estabilidade das dispersões. A EE foi alta tanto para as NLS-TRE quanto para as NLS-Quitosana-TRE, o que

pode ser explicado pela maior afinidade da tretinoína pelo lipídio em relação à fase aquosa.

NLS	Diâmetro médio (nm)	PI	Potencial zeta (mV)	EE (%)
Sem Quitosana	162,7± 1,4	0,133 ± 0,014	-31,9 ± 2,0	96,8 ± 1,2
Com Quitosana	284,8 ± 15,0	0,376 ± 0,033	55,9 ± 3,1	99,6 ± 0,3

**Tabela 2**. Diâmetro médio (Z-Average), PI, potencial zeta e EE das dispersões de NLS sem e com quitosana.

Dados mostrados como média ± desvio padrão, n=3.

#### 4.1.2. Capacidade de transporte

A capacidade de transporte é definida como a quantidade de fármaco que se consegue encapsular em relação à massa de lipídio utilizada e depende de fatores como solubilidade do fármaco no lipídio fundido, estrutura química e estado polimórfico do lipídio (Müller et al., 2000). Uma das desvantagens das NLS é que a capacidade de transporte geralmente é baixa, principalmente quando o fármaco apresenta somente uma lipofilicidade moderada, devido à natureza sólida da matriz lipídica (Korting et al., 2007).

A capacidade de transporte obtida para as NLS com e sem quitosana foi 0,5%, o que representa a quantidade máxima de tretinoína solubilizada no lipídio fundido, em relação à massa lipídica, nas condições de preparação das NLS, ou seja, 65°C e 5 min de agitação magnética. Estas condições foram determinadas de modo a evitar a degradação térmica da tretinoína e devido à baixa taxa de solubilização da tretinoína no lipídio fundido, a capacidade de transporte obtida foi relativamente baixa, no entanto, está de acordo com os resultados obtidos no trabalho de Jenning e Gohla (2001). Neste trabalho foi verificado uma baixa incorporação de retinoídes (retinol, palmitato de retinila e tretinoína) em NLS, preparadas com diferentes matrizes lipídicas. Para a tretinoína foi obtida uma capacidade de transporte menor que 1%, sendo a mais baixa entre os retinoídes.

O autor atribuiu esta baixa capacidade de transporte à maior polaridade da tretinoína em relação aos outros retinoídes. Ainda neste trabalho, para tentar aumentar a taxa de incorporação dos retinoídes, foi adicionado óleo na preparação das NLS, formando os carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN), no entanto para a tretinoína a adição de óleo não aumentou suficientemente a capacidade de transporte. No trabalho de Lim e Kim (2002) foi obtida uma capacidade de transporte de 2,5% no entanto foi utilizada uma alta razão surfactante/lipídio o que favorece a localização interfacial da tretinoína e consegüentemente diminui os benefícios obtidos pela encapsulação na matriz lipídica como a proteção contra a degradação e a liberação prolongada (Castro et al., 2007). A formação de par iônico entre a tretinoína e aminas é outra estratégia encontrada na literatura para aumentar a capacidade de transporte da tretinoína em NLS (Castro et al., 2007; Castro et al., 2009). Também foi verificado, em trabalhos envolvendo tretinoína e NLS, a utilização de solventes orgânicos para auxiliar na solubilização da tretinoína e consegüentemente aumentar a incorporação na matriz lipídica (Hu et al., 2004; Lim and Kim, 2002).

Neste trabalho, foi utilizado etanol para auxiliar a solubilização da tretinoína, o qual foi escolhido por ser normalmente utilizado em formulações cosméticas e, portanto, os resíduos que eventualmente pudessem ficar nas dispersões não causariam problemas em relação à toxicidade. Os valores de diâmetro médio, PI e potencial zeta das dispersões sem quitosana encontram-se na Tabela 3. No anexo 4 estão apresentadas curvas representativas de distribuição de tamanhos, obtidas por número, intensidade e volume, das NLS preparadas com etanol.

A EE foi maior do que 99%, sendo que foi possível solubilizar 100 mg de uma tretinoína. resultando em capacidade de transporte de 1,7%, aproximadamente três vezes maior que a capacidade de transporte obtida sem a adição de etanol. No entanto as dispersões de NLS sem guitosana foram estáveis por apenas 30 dias sendo que depois deste período não foi mais possível medir o diâmetro das partículas devido à separação de fases que ocorreu na formulação (Tabela 3). Nas dispersões com quitosana a separação de fases ocorreu algumas horas após a preparação. O resíduo de etanol nas NLS sem quitosana foi

23

quantificado após a preparação e a concentração média de etanol obtida nas formulações foi de 0,6% (v/v). Apesar de estar em baixa concentração, o etanol residual interferiu na estabilidade das dispersões de NLS.

**Tabela 3**. Diâmetro médio (Z-Average), PI e potencial zeta das dispersões de NLS sem quitosana preparadas com etanol armazenadas sob refrigeração (4°C) e protegidas da luz.

Tompo (diao)	Diâmetro médio	וח	Potencial zeta
Tempo (dias)	(nm)	PI	(mV)
0	173,9 ± 3,3	0,175 ± 0,042	-33,3 ± 1,6
1	194,0 ± 11,0	0,141 ± 0,018	-33,9 ± 1,6
7	188,8 ± 6,0	0,176 ± 0,033	-34,9 ± 1,7
30	182,4 ± 1,8	0,199 ± 0,008	-28,7 ± 2,5
45*	-	-	-

Dados mostrados como média ± desvio padrão, n=3; \*Não foi possível medir devido à desestabilização da formulação (separação de fases).

## 4.1.2.1. Estudos de liberação in vitro da tretinoína

Os estudos de liberação *in vitro* são importantes para se ter informações sobre a distribuição do composto encapsulado nas dispersões. Por exemplo, se uma parte do composto estiver adsorvida na superfície da partícula e/ou no meio de dispersão, será observada uma liberação rápida no início (geralmente chamada de "burst") e depois uma liberação mais lenta correspondente à parte do composto que está no interior da partícula que pode estar distribuído homogeneamente (solução sólida) ou formando uma fase diferente. O "burst" é importante quando se requer uma dose inicial rápida (Müller et al., 2000).

Para comparar as dispersões feitas com e sem etanol em relação à distribuição da tretinoína, foram feitos os estudos de liberação com a dispersão feita com adição de etanol e com outra dispersão contendo a mesma quantidade de tretinoína (1,7% m/m), mas sem adição de etanol. Primeiramente foi testado o método de diálise que não foi adequado para a tretinoína, pois a etapa adicional
de difusão através da membrana torna o processo mais lento e aumenta o erro das medidas devido ao processo de degradação da tretinoína. Portanto, as dispersões foram somente colocadas no meio de liberação e também foi adicionado etanol ao meio à uma concentração de 30% (v/v) para favorecer a liberação da tretinoína e tornar o processo de liberação mais rápido. O gráfico da porcentagem de tretinoína liberada em função do tempo está apresentado na Figura 7.



**Figura 7.** Liberação da tretinoína das NLS feitas com e sem etanol (contendo 1.7% m/m de tretinoína).

O perfil de liberação das NLS feitas sem etanol apresenta um "burst", com liberação de aproximadamente 74% de tretinoína em 30 minutos e posteriormente uma liberação muito lenta. O "burst" pode estar relacionado com a solubilização dos cristais de tretinoína que ficaram fora das partículas (detectados por microscopia de luz polarizada). Este excesso de tretinoína fora das partículas está relacionado à grande quantidade de tretinoína (1,7%) utilizado no processo de produção as NLS acima da sua capacidade de transporte (0,5%). Já as NLS feitas com etanol apresentaram uma liberação mais lenta, sendo que apenas 13% da tretinoína foi liberada nos primeiros 30 minutos, e demorou cerca de cinco horas para que fosse liberado aproximadamente a mesma porcentagem correspondente

ao "burst" das NLS preparadas sem etanol. Estes resultados indicam que a utilização de etanol para a solubilização dos cristais resultou em uma melhor incorporação da tretinoína na fase lipídica e conseqüentemente prolongou a liberação.

É importante ressaltar que neste teste de liberação *in vitro* a tretinoína foi liberada apenas por processo de difusão. *In vivo* também ocorre liberação por degradação enzimática da matriz lipídica e, portanto, o perfil de liberação provavelmente seria diferente. A degradação enzimática das NLS é dependente da composição da matriz lipídica e do surfactante e é realizada principalmente por lipases (Olbrich and Müller, 1999). Mesmo em uma aplicação tópica há uma contribuição da degradação enzimática para a liberação do fármaco devido à flora microbiana da pele (Müller et al., 2005).

Embora a possibilidade de utilização de etanol para aumentar a capacidade de transporte seja bastante promissora optamos por utilizar as NLS preparadas sem etanol (com 0,5% de tretinoína) para a continuidade do projeto devido à maior estabilidade em relação às NLS preparadas com etanol.

## 4.1.3. Morfologia

As Figuras 8 e 9 apresentam as imagens obtidas por microscopia de força atômica (AFM) das NLS recobertas com quitosana. Não foi possível obter imagens das NLS sem quitosana por esta técnica, pois elas se deformaram durante a secagem, o que não ocorreu com as NLS recobertas com quitosana provavelmente devido à presença da quitosana na superfície das partículas que manteve a integridade das mesmas durante o processo de secagem necessário para a preparação das amostras. Todas as imagens mostraram partículas com morfologia esférica, com exceção da imagem da Figura 9 que além de partículas esféricas foi observado também uma estrutura com morfologia tubular que pode ter sido formada por agregação das nanopartículas durante a secagem.

26



Α

2.81 x 2.81 [um] Z 0.00 - 74.79 [nm]

**Figura 8**. Micrografia de AFM das NLS recobertas com quitosana: A) Imagem topográfica, B) Representação 3D da topografia.



2.81 x 2.81 [um] Z 0.00 - 91.28 [nm]

**Figura 9**. Micrografia de AFM das NLS recobertas com quitosana: A) Imagem topográfica, B) Representação 3D da topografia.

A Figura 10 apresenta a imagem das NLS sem guitosana obtidas por microscopia eletrônica de transmissão (TEM). Foi utilizado acetato de uranila para melhorar o contraste das imagens, pois as NLS não são eletronicamente densas o suficiente para serem facilmente visíveis em TEM e, portanto, precisam ser "coradas" com um metal pesado (Bello et al., 2010). Apesar de nesta técnica as amostras também passarem por processo de secagem, o acetato de uranila fica ao redor das partículas e mantêm a forma das mesmas durante a secagem. As imagens de NLS com guitosana obtidas por TEM não foram apresentadas pois não ficaram boas, provavelmente devido à interação com o acetato de uranila que favoreceu a agregação das mesmas. A imagem obtida por TEM das NLS sem quitosana também mostrou partículas com morfologia esférica, no entanto elas parecem estar levemente agregadas em algumas regiões e também aparecem partículas grandes. Essa aparente agregação provavelmente foi decorrente do processo de secagem ou induzida pelo acetato de uranila, já que medidas de distribuição de tamanhos feitas por espalhamento dinâmico de luz (DLS) no mesmo dia da análise não apresentaram alterações no sistema. A preparação da amostra é uma das limitações de TEM já que pode induzir alterações no sistema como, por exemplo, a agregação de partículas (Bello et al., 2010).



Figura 10. Micrografia de TEM das NLS sem quitosana, tratadas com acetato de uranila.

Foram feitas medidas de diâmetro de algumas partículas das imagens obtidas por AFM e por TEM e as médias estão apresentadas na Tabela 4. Os diâmetros obtidos por microscopia são menores que os obtidos por DLS, pois este último mede o diâmetro hidrodinâmico das partículas (Equação 1), que inclui o diâmetro da partícula mais a camada de hidratação que a envolve, enquanto que para as análises de microscopia as amostras são secas. Os diâmetros das NLS com e sem quitosana secas não são tão diferentes entre si como são os diâmetros hidrodinâmicos, o que é explicado pela camada altamente hidratada das NLS recobertas com quitosana.

NLS	Diâmetro médio (nm)
Sem Quitosana	116 ± 38
Com Quitosana	122 ± 9

**Tabela 4**. Diâmetro médio das NLS sem e com recobrimento de quitosana, obtidos por TEM e AFM, respectivamente.

Além das várias informações sobre o sistema que as análises de diferentes tipos de microscopia podem fornecer, a avaliação da morfologia das partículas também é importante já que as medidas de tamanho obtidas por DLS são feitas considerando as partículas como sistemas esféricos. Portanto é necessário verificar a morfologia das partículas por microscopia (Heurtault et al., 2003).

#### 4.1.4. Estabilidade física

Os valores de diâmetro médio e potencial zeta das NLS vazias (sem tretinoína), com e sem quitosana, em função do tempo de armazenamento estão apresentados nas Figuras 11 e 12. Nos anexos 5 e 6 estão apresentadas curvas representativas de distribuição de tamanhos, obtidas por número, intensidade e volume, de cada tipo de partícula.



**Figura 11.** Valores de diâmetro médio (Z-Average) das dispersões de NLS vazias (sem tretinoína), com e sem quitosana, em função do tempo decorrido após a preparação. Dados mostrados como média ± desvio padrão, n=3.



**Figura 12.** Valores de potencial zeta das dispersões de NLS vazias (sem tretinoína), com e sem quitosana, em função do tempo decorrido após a preparação. Dados mostrados como média ± desvio padrão, n=3.

Durante o período acompanhado, não houve variações estatisticamente significativas, conforme verificado pelo teste ANOVA e teste de Tukey, nos valores de diâmetro médio e potencial zeta das NLS sem quitosana, com exceção do valor de potencial zeta no último período acompanhado que foi maior que os outros, o que pode ser explicado pela ocorrência de hidrólise do lipídio. As NLS vazias com quitosana apresentaram um aumento estatisticamente significativo no valor de diâmetro médio e potencial zeta após o primeiro mês, no entanto nos períodos seguintes não houve mudança significativa nestes valores.

Os valores de diâmetro médio e potencial zeta das NLS com tretinoína, com e sem quitosana, em função do tempo de armazenamento estão apresentados nas Figuras 13 e 14.



**Figura 13.** Valores de diâmetro médio (Z-Average) das dispersões de NLS com tretinoína, com e sem quitosana, em função do tempo decorrido após a preparação. Dados mostrados como média ± desvio padrão, n=3.



**Figura 14.** Valores de potencial zeta das dispersões de NLS com tretinoína, com e sem quitosana, em função do tempo decorrido após a preparação. Dados mostrados como média ± desvio padrão, n=3.

As NLS-TRE apresentaram um aumento estatisticamente significativo no valor de diâmetro médio a partir do primeiro mês, no entanto nos períodos seguintes não houve mudança significativa nestes valores. Os valores de potencial zeta não sofreram alterações. Já as NLS-Quitosana-TRE não apresentaram mudanças estatisticamente significativas nos valores de diâmetro médio e o valores de potencial zeta sofreram um aumento em relação ao dia da preparação mas nos períodos seguintes não houve mudança estatisticamente significativa.

A polidispersidade das dispersões de NLS vazias e com tretinoína, com e sem quitosana, também não foi alterada durante os períodos acompanhados sendo que os valores de PI foram mantidos próximos de 0,2 para as NLS sem quitosana e próximos de 0,3 para as NLS com quitosana.

Os resultados apresentados acima indicam uma alta estabilidade física das dispersões de NLS e os fatores que podem contribuir para esta estabilidade são: homogeneidade das dispersões (baixo PI) que evita o envelhecimento de Ostwald (crescimento de partículas grandes à custa de partículas menores), alto potencial

33

zeta que produz repulsão eletrostática entre as partículas e estabilização estérica proporcionada pelo surfactante utilizado, Pluronic F68.

A quitosana também pode contribuir para a estabilização da dispersão de NLS. Por ter natureza anfifílica ela contribui agindo tanto na superfície das partículas quanto no meio de dispersão. Na superfície das partículas a quitosana promove estabilização eletroestérica (combina os mecanismos de repulsão eletrostática e impedimento estérico) por ser um polieletrólito e no meio dispersante aumenta a viscosidade o que também é um mecanismo de estabilização, pois reduz a taxa de colisões entre as partículas e conseqüentemente retarda os processos que levam a perda da estabilidade coloidal, como a coagulação, sedimentação e etc (Rodríguez et al., 2002). Portanto, a adição de quitosana pode prolongar a estabilidade das dispersões de NLS.

## 4.1.5. Comportamento térmico e cristalinidade

Os termogramas dos componentes utilizados na preparação das NLS encontram-se na Figura 15 e o das NLS liofilizadas na Figura 16. Para a obtenção do termograma do lipídio sólido foram feitos dois aquecimentos para simular as condições de preparação das NLS e o termograma da Figura 15 corresponde à curva obtida no segundo aquecimento. Conforme pode ser observado na Figura 15 a tretinoína apresenta dois picos no termograma, um correspondente à fusão, em 186 °C, e o outro à uma transição de estado sólido, em 153°C (Berbenni et al., 2001). Estes picos não apareceram nos termogramas das NLS (Figura 16) o que pode estar relacionado com uma distribuição homogênea da tretinoína na matriz lipídica. Outra possibilidade seria os cristais de tretinoína estarem abaixo do limite de detecção do equipamento de análise térmica.

34



**Figura 15.** Termogramas obtidos por DSC dos componentes utilizados na preparação das NLS: miristato de miristila (MM), Pluronic F68, Quitosana e Tretinoína (TRE).



**Figura 16.** Termogramas das NLS sem quitosana (NLS-TRE) e com Quitosana (NLS-Quitosana-TRE).

A entalpia de fusão ( $\Delta H_{fus}$ ) do lipídio foi calculada para o lipídio puro ("bulk") e para as NLS corrigindo a entalpia de fusão obtida do termograma ( $\Delta H_{fus}$ \*), de acordo com a porcentagem de lipídio (% lipídio) na dispersão (Equação 6). Os valores utilizados para o cálculo e os valores obtidos de  $\Delta H_{fus}$  encontram-se na Tabela 5 e os termogramas com os valores de  $\Delta H_{fus}$ \* estão no Anexo 9.

$$\Delta H_{fus} = (\Delta H_{fus}^* \times 100) / (\% \text{ lip(dio)}$$
 (Equação 6)

**Tabela 5.** Entalpias de fusão calculadas para o lipídio (MM), para as NLS-TRE e NLS-Quitosana-TRE e dados utilizados para o cálculo.

Material	$\Delta H_{fus}^{*}(J/g)$	% lipídio	$\Delta H_{fus} \left( J/g \right)$
MM	185,2	100,0	185,2
NLS-TRE	159,7	78,9	202,3
NLS-Quitosana-TRE	51,1	56,6	90,2

Comparando os valores da última coluna da Tabela 5 nota-se que a cristalinidade da NLS-TRE foi próxima da cristalinidade do lipídio puro, enquanto que as NLS-Quitosana-TRE apresentaram uma cristalinidade bem mais baixa, apresentando um valor de  $\Delta H_{fus}$  correspondente à aproximadamente metade do valor de  $\Delta H_{fus}$  do lipídio puro. Como a única diferença entre as formulações é a presença da quitosana, esta provavelmente dificulta a cristalização do lipídio.

Uma baixa cristalinidade é importante, pois evita ou minimiza a expulsão do fármaco durante a estocagem, que ocorre em virtude das transformações polimórficas do lipídio em matrizes de NLS altamente cristalinas (Pardeike et al., 2009).

## 4.2. Citotoxicidade

#### 4.2.1. Efeito da matriz lipídica

O potencial citotóxico de NLS preparadas com três lipídios sólidos diferentes, palmitato de cetila (PC), miristato de miristila (MM) e uma mistura de ésteres cetílicos (EC), foi avaliado para verificar o efeito da matriz lipídica sobre a viabilidade celular. Os valores de diâmetro médio, PI e potencial zeta das dispersões encontram-se na Tabela 6 e os resultados dos testes de citotoxicidade na Figura 17. Nos anexos 7 e 8 estão apresentadas curvas representativas de distribuição de tamanhos, obtidas por número, intensidade e volume, das NLS preparadas com PC e EC, respectivamente. Os diâmetros e potencial zeta obtidos foram próximos para as três dispersões de NLS. O efeito citotóxico foi dependente da matriz lipídica, conforme foi verificado pelo teste ANOVA e teste de Tukey (p < p0,05). Os três lipídios mostraram-se adequados para a utilização na preparação de NLS para aplicação dérmica pois embora a viabilidade celular tenha sido reduzida em algumas concentrações de NLS a redução foi pequena. Além disso, até a maior concentração testada (500 µg/mL) não foi atingido o IC<sub>50</sub> (concentração que reduz em 50% a viabilidade celular) em ambas as células. Estes resultados indicam que as NLS não possuem potencial citotóxico para as células avaliadas.

**Tabela 6.** Diâmetro médio (Z-Average), PI e potencial zeta das dispersões de NLSvazias.

NLS	Diâmetro médio (nm)	PI	Potencial zeta (mV)
СР	189,0 ± 1,8	0,149 ± 0,037	-34,7 ± 4,1
MM	185,4 ± 6,3	0,188 ± 0,012	-31,9 ± 2,1
EC	197,5± 3,5	0,234 ± 0,023	-30,5 ± 1,5

Dados mostrados como média ± desvio padrão, n=3.



**Figura 17.** Citotoxicidade de NLS vazias preparadas com palmitato de cetila (PC), miristato de miristila (MM) e éster cetílico (EC) em células (A) 3T3 e (B) HaCaT. Dados mostrados como média ± desvio padrão, n=5.

## 4.2.2. Citotoxicidade da tretinoína livre

A tretinoína livre (não encapsulada) não apresentou potencial citotóxico na faixa de concentração testada (2-10 µg/mL), conforme pode ser verificado na Figura 18.



**Figura 18**. Citotoxicidade da tretinoína em células BALB/c 3T3 e HaCaT. Dados mostrados como média ± desvio padrão, n=5.

## 4.2.3. Citotoxicidade das nanopartículas

Os resultados dos testes de citotoxicidade realizados com as NLS sem quitosana e com tretinoína (NLS-TRE) estão apresentados na Figura 19 e os resultados das NLS sem quitosana vazias já foram apresentados na Figura 17. Em todos os testes a redução na viabilidade celular foi menor que 50% (portanto não foi atingido o  $IC_{50}$ ), o que indica que as partículas não apresentam potencial citotóxico na faixa de concentração testada.

Partículas carregadas positivamente interagem mais fortemente com as células e por isso são internalizadas mais facilmente que partículas neutras e carregadas negativamente (Verma and Stellacci, 2010). Portanto, a natureza catiônica das NLS recobertas com quitosana poderia contribuir para a citotoxicidade das mesmas. No entanto, nos testes realizados estas partículas

também não apresentaram efeitos tóxicos para as células avaliadas (Figuras 20 e 21).



**Figura 19.** Citotoxicidade das NLS-TRE em células BALB/c 3T3 e HaCaT. Dados mostrados como média ± desvio padrão, n=5.



**Figura 20.** Citotoxicidade das NLS-Quitosana vazias em células BALB/c 3T3 e HaCaT. Dados mostrados como média ± desvio padrão, n=5.



**Figura 21.** Citotoxicidade das NLS-Quitosana-TRE em células BALB/c 3T3 e HaCaT. Dados mostrados como média ± desvio padrão, n=5.

## 4.3. Fototoxicidade

Efeitos tóxicos também podem ser desencadeados por exposição de uma substância à luz. Quando uma substância tornar-se tóxica às células na presença de luz, diz-se que a substância apresenta *fototoxicidade*. A tretinoína é fotoreativa, portanto quando aplicada topicamente pode apresentar fototoxicidade (Slade et al., 2009). Neste teste o potencial fototóxico da tretinoína livre e encapsulada em NLS foi avaliado. A tretinoína não é citotóxica na faixa de 2-10 µg/mL, conforme foi verificado nos resultados obtidos nos ensaios de citotoxicidade (Figura 18). Os resultados obtidos nos testes de fototoxicidade nesta mesma faixa de concentração (Figuras 22) mostraram que quando a tretinoína é exposta à luz (UVA) ela passa a exercer efeitos tóxicos às células e, portanto, é fototóxica. No entanto, quando encapsulada em NLS, a fototoxicidade praticamente desaparece. Nas células de fibroblastos 3T3 a diferença entre a curva correspondente às NLS com tretinoína expostas à radiação (TRE-NLS+UVA) e às não expostas (TRE-NLS-UVA) foi muito pequena e nas células de queratinócitos HaCaT praticamente não teve diferença entre as duas curvas.



**Figura 22.** Ensaio de fototoxicidade em células BALB/c 3T3 da tretinoína livre (TRE) e encapsulada em NLS (TRE-NLS). O gráfico mostra a viabilidade celular sem exposição à radiação (-UVA) e com exposição (+UVA). Dados mostrados como média ± desvio padrão, n=5.

Os resultados apresentados acima evidenciam o efeito protetor da matriz sólida das NLS, pois a tretinoína que está dentro da matriz fica protegida do efeito da radiação e conseqüentemente não causa fototoxicidade. Estes resultados indicam que a maior parte da tretinoína está dentro da matriz lipídica, ao invés de adsorvida na superfície das partículas ou livre no meio de dispersão, o que concorda com a alta eficiência de encapsulação obtida.

## 4.4. Atividade Antibacteriana

A atividade antimicrobiana da quitosana depende de fatores como tipo de microorganismo, presença ou ausência de cátions metálicos, pKa, peso molecular, grau de desacetilção, estado físico (quitosana solúvel ou no estado sólido), concentração e fatores ambientais incluindo força iônica do meio, pH e temperatura (Kong et. al, 2010). Portanto, é necessário avaliar para cada formulação o efeito da quitosana sobre os microorganismos de interesse.

Antes da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foi feito um para verificar se as NLS-Quitosana apresentavam efeito teste inicial antibacteriano. O teste foi feito duas bactérias gram-positivas, com Staphylococcus aureus, geralmente envolvida em infecções de pele, e Staphylococcus epidermidis que normalmente encontra-se presente em peles e mucosas e também causa infecções. As Figuras 23 e 24 mostram a diferença em relação ao crescimento bacteriano das placas correspondentes ao tratamento das bactérias com NLS sem quitosana (Figura 23-A e 24-A) e com quitosana (Figura 24-3 e 24-B). Visualmente pode-se observar que não há crescimento bacteriano na placas correspondentes às NLS-Quitosana.

Para quantificar a atividade antibacteriana das NLS-Quitosana, foram feitos testes para a determinação da CIM com a *P. acnes e S. epidermidis* que estão entre os principais microorganismos envolvidos na acne, sendo a *P. acnes* a bactéria mais importante (Hassun, 2000), e com a *S. aureus* que é responsável por vários tipos de infecções, sendo as infecções de pele as mais comuns. Os resultados estão apresentados na Tabela 7. Os valores de CIM foram obtidos em

43

concentrações baixas de nanopartículas, o que indica uma alta atividade antimicrobiana contra as bactérias de interesse.



Figura 23. Placas correspondentes ao tratamento da bactéria *S. aureus* com (A) NLS sem quitosana e (B) NLS recobertas com quitosana.



Figura 24. Placas correspondentes ao tratamento da bactéria *S. epidermidis* com (A) NLS sem quitosana e (B) NLS recobertas com quitosana.

**Tabela 7**. Concentração inibitória mínima (CIM) das NLS-Quitosana-TRE (emunidades de concentração de quitosana).

Bactéria	CIM (mg/mL)
Propionibacterium acnes	0,039
Staphylococcus aureus	0,32
Staphylococcus epidermidis	< 0,15*

\*Até a menor concentração testada em um primeiro teste (0.15 mg/mL) não houve crescimento bacteriano; não foi possível repetir os experimentos devido à problemas com a reativação da bactéria.

## **5. CONCLUSÕES**

Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir que as NLS, com e sem recobrimento de guitosana, possuem um grande potencial para aplicações dérmicas de tretinoína por apresentarem alta eficiência de encapsulação e alta estabilidade física e não apresentarem potencial citotóxico em células de fibroblastos e queratinócitos. Além disso, a encapsulação em NLS praticamente eliminou os efeitos fototóxicos da tretinoína, mostrando um efeito de proteção da matriz lipídica e, portanto, uma grande vantagem da encapsulação de tretinoína nestes sistemas. A capacidade de transporte das NLS foi limitada pela baixa taxa de solubilização da tretinoína no lipídio fundido, no entanto o valor obtido está dentro do esperado. Etanol pode ser utilizado para aumentar a capacidade de transporte somente para as NLS sem quitosana, embora a estabilidade física das dispersões seja reduzida para apenas um mês. As NLS-Quitosana apresentaram atividade antibacteriana contra as principais bactérias envolvidas na acne, oferecendo, portanto, uma vantagem em relação às NLS sem recobrimento uma vez que este efeito sobre a proliferação bacteriana seria somado ao efeito comedolítico da tretinoína, podendo resultar em uma maior eficácia no tratamento da doença. As NLS-Quitosana também apresentaram atividade antibacteriana contra a S. aureus, que geralmente está envolvida em infecções de pele, e desta forma podem aumentar a eficácia terapêutica no tratamento tópico de outras doenças de pele que envolvam proliferação bacteriana.

46

# 6. REFERÊNCIAS

Abu, J.; Batuwangala, M.; Herbert, K.; Symonds, P. Retinoic acid and retinoid receptors: potential chemopreventive and therapeutic role in cervical cancer. *Lancet Oncology* 2005; 6: 712–720.

Agnihotri, S.A.; Mallikarjuna, N.N.; Aminabhavi, T.M. Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery. *Journal of Controlled Release* 2004; 100: 5–28.

Azevedo, V.V.C.; Chaves, S.A.; Bezerra, D.C.; Lia, M.V.F.; Costa, A.C.F.M. Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais *Revista Eletrônica de Materiais e Processos* 2007; 2.3: 27-34.

Bello, V.; Mattei, G.; Mazzoldi, P.; Vivenza, N.; Gasco, P.; Idee, J.M.; Robic, C.; Borsella, E. Transmission electron microscopy of lipid vesicles for drug delivery: comparison between positive and negative staining. *Microscopy and Microanalysis* 2010; 16: 456–461.

Berbenni, V.; Marini, A.; Bruni, G.; Cardini, A. Thermoanalytical and spectroscopic characterisation of solid-state retinoic acid. *International Journal of Pharmaceutics* 2001; 221: 123-141.

Berger, 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* 2004; 57: 19-34.

Borenfreund, E.; Puerner, J.A. A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays (HTD/NR-90). *Journal of Tissue Culture Methods* 1984; 9: 7-9.

Brisaert, M.; Gabriëls, M.; Matthijs, V.; Vercammen, J.P. Liposomes with tretinoin: a physical and chemical evaluation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2001; 26: 909-917.

Bushue, N.; Wan, Y.J.Y. Retinoid pathway and cancer therapeutics. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2010; 62: 1285–1298.

Castro, G.A.; Coelho, A.L.L.R.; Oliveira, C.A.; Mahecha, G.A.B.; Oréfice, R.L.; Ferreira, L.A.M. Formation of ion pairing as an alternative to improve encapsulation and stability and to reduce skin irritation of retinoic acid loaded in solid lipid nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics* 2009; 381: 77-83.

Castro, G.A.; Oréfice, R.L.; Vilela, J.M.C.; Andrade, M.S.; Ferreira, L.A.M. Development of a new solid lipid nanoparticle formulation containing retinoic acid for topical treatment of acne. *Journal of Microencapsulation* 2007; 24: 395-407.

Croy, S.R.; Kwon, G.S. The effects of Pluronic block copolymers on the aggregation state of nystatin. *Journal of Controlled Release* 2004; 95: 161-171.

Darlenski, R.; Surber, C.; Fluhr, J. W. Topical retinoids in the management of photodamaged skin: from theory to evidence-based practical approach. *British Association of Dermatologists* 2010; 163: 1157–1165.

Durán, N.; Marcato, P.D.; Teixeira, Z. Nanotecnologia e nanobiotecnologia: conceitos básicos. Disponível em <a href="http://www.cienciaviva.org.br">http://www.cienciaviva.org.br</a>. Acesso em fevereiro de 2009.

Fontana, G.; Pitarresi, G.; Tomarchio, V.; Carlisi, B.; Biagio, P.L.S. Preparation, characterization and *in vitro* antimicrobial activity of ampicillin-loaded polyethylcyanoacrylate nanoparticles. *Biomaterials* 1998; 19: 1009-1017.

Fotakis, G.; Timbrell, J.A. In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicology Letters* 2006; 160:171–177.

Fuentes, M. G.; Torres, D.; Alonso, M. J. New surface-modified lipid nanoparticles as delivery vehicles for salmon calcitonin. *International Journal of Pharmaceutics* 2005; 296: 22–132.

Hassum, K.M. Acne: etiopatogenia. *Anais Brasileiros de Dermatologia.* (Rio de Janeiro) 2000; 75, 7-15.

Heurtault, B.; Saulnier, P.; Pech, B.; Proust, J.E.; Benoit, J.P. Physico-chemical stability of colloidal lipid particles. *Biomaterials* 2003; 24: 4283–4300.

Hu, L.D.; Tang, X.; Cui, F.D. Solid lipid nanoparticles (SLNs) to improve oral bioavailability of poorly soluble drugs. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2004; 56: 1527–1535.

Jenning, V.; Gohla, S.H. Encapsulation of retinoids in solid lipid nanoparticles (SLN). *Journal of Microencapsulation* 2001; 18: 149-158.

Khoushab, F.; Yamabhai, M. Chitin Research Revisited. *Marine Drugs* 2010; 8: 1988-2012.

Kong, M.; Chen, X.G.; Xing, K.; Park, H.J.; Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. *International Journal of Food Microbiology* 2010; 144:51–63.

Korting, M.S.; Mehnert, W.; Korting, H.S. Lipid nanoparticles for improved topical application of drugs for skin diseases. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2007; 59: 427–443.

Lee, G.S., Kim, T.H. Lee, C.II.Pyo, H.B., Choe, T.B. Development of chitosan coated solid lipid nano-particles containing 7-dehydrocholesterol. *Korean Medical Database* 2005; 31: 141-146.

Levine, I. N. Physical chemistry, 5th ed., McGraw-Hill: New York, 2002, p. 504.

Lewinski, N.; Colvin, V.; Drezek, R. Cytotoxicity of nanoparticles. *Small* 2008; 4: 26-49.

Lim, S.J.; Kim, C.K. Formulation parameters determining the physicochemical characteristics of solid lipid nanoparticles loaded with all-trans retinoic acid. *International Journal of Pharmaceutics* 2002; 243: 135-146.

Mandawgade, S.D.; Patravale, V.B. Development of SLNs from natural lipids: Aplication to topical delivery of tretinoin. *International Journal of Pharmaceutics* 2008; 363: 32-138.

Marcato, P.D., Adami, L.F.; Durán, N. Comparative study of peptide encapsulation in polymeric and in solid lipid nanoparticles. *Journal of Biomedical Nanotechnology*. submetido em 2010.

Marconi, M.; Sinico, C.; Valenti, D.; Lai, F.; Fadda, A.M. Niosomes as carriers for tretinoin III. A study into the *in vivo* cutaneous delivery of vesicle-corporated tretinoin. *International Journal of Pharmaceutics* 2006; 311: 11-19.

Mehnert, W.; Mäder, K. Solid lipid nanoparticles. Production, characterization and applications. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2001; 47: 165-196.

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. *Journal of Immunological Methods* 1983; 65: 55-63.

Müller, R.H.; Maassen, S.; Schwarz, C.; Mehnert, W. Solid Lipid nanoparticles (SLN) as potential carrier for human use: interaction with human granulocytes. *Journal of Controlled Release* 1997a; 47: 261-269.

Müller, R.H.; Mäder, K.; Gohla, S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery – a review of the state of the art. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2000; 50: 161-177.

Müller, R.H.; Mehnert, W.; Souto, E.B. Solid Lipid Nanoparticles (SLN) and Nanostructured Lipid Carriers (NLC) for Dermal Delivery. *Percutaneous Absorption* 

*Drugs, Cosmetics, Mechanisms, Methods*, Fourth Edition, Edited by Robert L. Bronaugh and Howard I. Maibach Informa Healthcare 2005; 719-738.

Müller, R.H.; Petersen, R.D.; Hommoss, A.; Perdeike, J. Nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic dermal products. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2007; 59: 522-530.

Müller, R.H.; Radtke, M.; Wissing, S.A. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2002; 54: 131-155.

Müller, R. H.; Rühl, D.; Runge, S.; Forster, K. S.; Mehnert, W. Cytotoxicity of solid lipid nanoparticles as a function of the lipid matrix and the surfactant. *Pharmaceutical Research* 1997b; 14: 458-462.

Nagpal, K.; Singh, S.K.; Mishra, D.N.; Chitosan nanoparticles: A promising system in novel drug delivery. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 2010; 58: 1423-1430.

Njar, V.C.O.; Gediya, L.; Purushottamachar, P.; Chopra, P.; Vasaitis, T.S.; Khandelwal, A.; Mehta, J.; Huynh, C.; Belosay, A.; Patel, J. Retinoic acid metabolism blocking agents (RAMBAs) for treatment of cancer and dermatological diseases. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2006; 14: 4323–4340.

Okamoto, Y.; Kawakami, K.; Miyatake, K.; Morimoto, M.; Shigemasa, Y.; Minami, S. Analgesic effects of chitin and chitosan. *Carbohydrate Polymers* 2002; *49*: 249-252.

Olbrich, C.; Müller, R.H. Enzymatic degradation of SLN-effect of surfactant and surfactant mixtures. *International Journal of Pharmaceutics* 1999; 180: 31-39.

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* 2008; 352: 1-4.

Pardeike, J.; Hommoss, A.; Müller, R.H. Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. *International Journal of Pharmaceutics* 2009; 366: 170-184.

Qin, Z. L. Advances in biopharmaceutical analysis in the People's Republic of China: 1993-1995. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 1996; 14: 1395-1403.

Ribani, M.; Bottoli, C.B.G.; Collins, C.H.; Jardim, I.C.S.F., Melo, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova* 2004; *27*: 771-780.

Rigopoulos, D.; Loannides, D.; Kalogeromitros, D.; Katsambas, A.D. Comparison of topical retinoids in the treatment of acne. *Clinics in Dermatology* 2004; 22: 408-411.

Rinaudo, M. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science* 2006; 31: 603–632.

Rodríguez, M. S.; Albertengo, L. A.; Agulló, E. Emulsification capacity of chitosan, *Carbohydrate Polymers* 2002; 48:271-276.

Sandri, G.; Bonferoni, M.; Gokce, E.H; Ferrari, F.; Rossi, S.; Patrini, M.; Caramella, C. Chitosan-associated SLN: in vitro and ex vivo characterization of cyclosporine A loaded ophthalmic systems. *Journal of Microencapsulation* 2010; 27: 735-746.

Severino, P. *Revestimento polimérico e farmacocinética de grânulos gastrorresistentes contendo didanosina incorporada em micropartículas de quitosana.* 2008. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, setembro de 2008.

Shah, K.M.; Date, A.A.; Joshi, M.D.; Patravale, V.B. Solid lipid nanoparticles (SLN) of tretinoin: Potential in topical delivery. *International Journal of Pharmaceutics* 2007; 345: 163-171.

Shaw, D.J. *Introduction to colloid and surface chemistry*, 4th ed., Butterworth-Heimann, Oxford, 1992, p. 491.

Shöler, N.; Hahn, H.; Müller, R.H.; Liesenfeld, O. Effect of lipid matrix and size of solid lipid nanoparticles (SLN) on the viability and cytokine production of macrophages. *International Journal of Pharmaceutics* 2002; 231: 167-176.

Slade, H.B.; Shroot, B.; Feldman, S.R.; Cargill, D.I.; Stanfield, J. Reappraising the phototoxicity of tretinoin: a report of four controlled clinical trials. *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine* 2009; 25: 146–152.

Üner M. Preparation, characterization and physico-chemical proprieties of solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructure lipid carriers (NLC): Their benefits as colloidal drug carrier system. *Phamazie* 2006; 61: 375-386.

Verma, A.; Stellacci, F. Effect of surface properties on nanoparticle-cell interactions. *small* 2010; 6: 12–21.

Weyenberg, W.; Filev, P.; Plas, D.V.; Vandervoort, J.; Smet, K.D.; Sollie, P.; Ludwig, A. Cytotoxicity of submicron emulsions and solid lipid nanoparticles for dermal application. *International Journal of Pharmaceutics* 2007; 337: 291-298.

Wissing, S.A.; Kayser, O. Müller, R.H.; Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2004; 56: 1257-1272.

## 7. ANEXOS

## ANEXO 1 – Equações de reta das curvas de calibração

# Quantificação da tretinoína para o cálculo da eficiência de encapsulação (item 3.3.2)

A equação da reta correspondente à curva de calibração utilizada na quantificação da tretinoína para o cálculo da eficiência de encapsulação (EE) está apresentada na equação 1. O coeficiente de correlação obtido foi maior do que 0.999, evidenciando uma boa qualidade da curva analítica (Ribani et al., 2004).

$$y = 169416, 2x + 516, 8 \quad (R^2 = 0.99943)$$
 (Equação 1)

# Quantificação do resíduo de etanol nas dispersões de NLS (item 3.3.3)

A equação da reta correspondente à curva de calibração utilizada na quantificação do etanol está apresentada na equação 2. O coeficiente de correlação obtido foi maior do que 0.99, o que também representa uma boa qualidade da curva analítica (Ribani et al., 2004).

$$y = 664, 1x - 23,0$$
 ( $R^2 = 0.9908$ ) (Equação2)

# ANEXO 2 – Curvas de distribuição de tamanhos obtidas por espalhamento dinâmico de luz (DLS) das NLS-TRE



Figura 1. Curva de distribuição de tamanhos por número das NLS-TRE.



Figura 2. Curva de distribuição de tamanhos por intensidade das NLS-TRE.



Figura 3. Curva de distribuição de tamanhos por volume das NLS-TRE.

# ANEXO 3 – Curvas de distribuição de tamanhos obtidas por espalhamento dinâmico de luz (DLS) das NLS-Quitosana-TRE



Figura 1. Curva de distribuição de tamanhos por número das NLS-Quitosana-TRE.



Figura 2. Curva de distribuição de tamanhos por intensidade das NLS-Quitosana-TRE.



Figura 3. Curva de distribuição de tamanhos por volume das NLS-Quitosana-TRE.

# ANEXO 4 – Curvas de distribuição de tamanhos obtidas por espalhamento dinâmico de luz (DLS) das NLS preparadas com etanol



Figura 1. Curva de distribuição de tamanhos por número das NLS preparadas com etanol.



Figura 2. Curva de distribuição de tamanhos por intensidade das NLS preparadas com etanol.



Figura 3. Curva de distribuição de tamanhos por volume das NLS preparadas com etanol.

# ANEXO 5 – Curvas de distribuição de tamanhos obtidas por espalhamento dinâmico de luz (DLS) das NLS sem quitosana vazias



Figura 1. Curva de distribuição de tamanhos por número das NLS sem quitosana vazias.



Figura 2. Curva de distribuição de tamanhos por intensidade das NLS sem quitosana vazias.


Figura 3. Curva de distribuição de tamanhos por volume das NLS sem quitosana vazias.

## ANEXO 6 – Curvas de distribuição de tamanhos obtidas por espalhamento dinâmico de luz (DLS) das NLS com quitosana vazias



Figura 1. Curva de distribuição de tamanhos por número das NLS com quitosana vazias.



Figura 2. Curva de distribuição de tamanhos por intensidade das NLS com quitosana vazias.



Figura 3. Curva de distribuição de tamanhos por volume das NLS com quitosana vazias.

## ANEXO 7 – Curvas de distribuição de tamanhos obtidas por espalhamento dinâmico de luz (DLS) das NLS vazias preparadas com palmitato de cetila (PC)



Figura 1. Curva de distribuição de tamanhos por número das NLS vazias preparadas com palmitato de cetila (PC).



Figura 2. Curva de distribuição de tamanhos por intensidade das NLS vazias preparadas com palmitato de cetila (PC).



Figura 3. Curva de distribuição de tamanhos por volume das NLS vazias preparadas com palmitato de cetila (PC).

## ANEXO 8 – Curvas de distribuição de tamanhos obtidas por espalhamento dinâmico de luz (DLS) das NLS vazias preparadas com mistura de ésteres cetílicos (EC)



Figura 1. Curva de distribuição de tamanhos por número das NLS vazias preparadas com mistura de ésteres cetílicos (EC).



Figura 2. Curva de distribuição de tamanhos por intensidade das NLS vazias preparadas com mistura de ésteres cetílicos (EC).



Figura 3. Curva de distribuição de tamanhos por volume das NLS vazias preparadas com mistura de ésteres cetílicos (EC).





Figura 1. Termograma do lipídio (Miristato de Miristila)



Figura 2. Termograma das NLS-TRE



Figura 3. Termograma das NLS-Quitosana-TRE