

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Campus de Araraquara

**DESENVOLVIMENTO DE CARREADORES LIPÍDICOS
NANOESTRUTURADOS PARA ADMINISTRAÇÃO CUTÂNEA DE
FLUCONAZOL**

FERNANDA PADILLA

Araraquara

2014

FERNANDA PADILLA

**DESENVOLVIMENTO DE CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS
PARA ADMINISTRAÇÃO CUTÂNEA DE FLUCONAZOL**

Monografia

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao curso de Graduação em
Farmácia-Bioquímica, da Faculdade de
Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da
Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho”- UNESP para obtenção do
grau de Farmacêutica-Bioquímica.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Palmira Daflon Gremião

Co-orientadora: Profa. Dra. Fernanda Kolenyak dos Santos

Araraquara

2014

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Janice e Manoel, que sempre se fizeram presentes, em cada etapa da minha vida, me apoiando e dando a oportunidade de seguir meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço à Deus, por me oferecer tantas oportunidades pelo caminho e por me cercar de pessoas maravilhosas que sempre estão dispostas a me ajudar e a me ensinar da melhor maneira possível. Durante esses anos, cada pessoa que conheci, foi um presente de Deus, pois marcaram minha vida de um jeito único e que jamais me esquecerei.

Aos meus pais, que são meus exemplos de vida, que me ensinaram meus valores e que estiveram sempre ao meu lado me apoiando nas minhas escolhas. Obrigada por todo amor, paciência e ensinamentos.

À minha irmã, Adriana, aos meus avós e aos meus tios que sempre me apoiaram e torceram pela minha felicidade.

À minha orientadora Profa. Palmira, que é um exemplo de professora e pesquisadora, e que sempre se mostrou solícita em me ajudar e a contribuir com os meus conhecimentos. Agradeço pela oportunidade de estágio em iniciação científica e por todos os ensinamentos! Muito obrigada!

Às minhas Co-orientadoras queridas, Hilris e Fernanda, a quem devo quase tudo o que eu aprendi até hoje na pesquisa, vocês com certeza são exemplos de profissionais para mim. De modo especial agradeço à Fer, por toda a disponibilidade, paciência, dedicação, ensinamentos e amizade durante esses anos. Lembrarei para sempre dos nossos momentos no lab! Muito obrigada!

Às mestrandas e doutorandas do laboratório, Roberta, Fabíola, Liliane, Jéssica, Maíra e Natália, que sempre me ajudaram quando eu precisei. Obrigada pelo apoio e carinho.

Aos professores da farmacotécnica, Ana Dóris, Marlus, Raul (*in memoriam*) e Josi, por todo apoio e ensinamentos.

Às minhas irmãs de república e todos os meus amigos obrigada pelos momentos inesquecíveis, por toda amizade e companheirismo. Fizeram desses anos os melhores da minha vida.

Às funcionárias, Margareth e Natália, pela imprescindível ajuda, tanto nas aulas de Farmacotécnica e Tecnologia Farmacêutica, quanto no laboratório.

À Neusa, está sempre presente para deixar tudo organizado e limpo. Sua dedicação e simplicidade serviram de exemplo para mim. Obrigada pelas conversas!

Ao CNPq pelo apoio financeiro para o desenvolvimento deste trabalho, na forma de bolsa de iniciação científica.

Enfim, obrigada à todos que de uma forma ou outra participaram da minha vida e me proporcionaram momentos que lembrarei para sempre.

‘Aqueles que passam por nós, não vão sós, não nos deixam sós. Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós.’ - Antoine de Saint-Exupéry

RESUMO

O fluconazol (FLU) é um antifúngico muito utilizado no tratamento de dermatomicoses devido à sua eficácia e segurança. No entanto, este pode apresentar perfil farmacocinético muitas vezes inadequado, promovendo recorrência da doença ou resistência do fungo, apresentando uma série de efeitos colaterais além de alta toxicidade. Por esta razão, há uma busca contínua de novos medicamentos antifúngicos mais potentes, mas, sobretudo, mais seguros que os existentes. Os carreadores lipídicos nanoestruturados (NLCs) são compostos por uma matriz contendo lipídio líquido e sólido, e possui como uma de suas vantagens a alta capacidade de encapsulamento. O objetivo do trabalho foi desenvolver e caracterizar NLCs para administração cutânea de fluconazol. A solubilidade do FLU foi avaliada em ácido oleico (AO) e monoestearato de glicerila (GMS) e observou-se uma maior incorporação de FLU na mistura desses lipídios do que nos compostos isolados. Os NLCs contendo AO, GMS, poloxamer-407, fosfatidilcolina de soja (PC) e FLU foram desenvolvidos empregando o método de homogeneização em alta velocidade de cisalhamento à quente. A caracterização foi realizada por espectroscopia de correlação de fótons e os resultados de diâmetro médio, índice de polidispersidade e potencial zeta foram de 218,63 e 314,1nm, 0,417 e 0,640 e -28,4 e -25,8mV para os NLCs com (NLC_FLU) e sem o FLU (NLC) respectivamente. No estudo de estabilidade, as formulações NLC e NLC_FLU foram armazenados à 8°C e à temperatura ambiente e os resultados mostraram maior estabilidade durante os seis meses para os NLC_FLU armazenada à 8°C. A morfologia dos NLCs foi determinada por microscopia eletrônica de varredura de efeito de campo na qual os NLCs apresentaram morfologia esférica e escala nanométrica. Uma metodologia foi validada por espectrofotometria na região do ultravioleta para a determinação da eficiência de encapsulação (EE) do fármaco que foi de 96,84%. Foram conduzidos ensaios *in vitro* de liberação, permeação e retenção cutânea nos quais o sistema foi capaz de liberar o fármaco de forma prolongada. A quantidade de FLU permeada pela pele foi de 0,30µg/cm² e 0,01µg/cm² ficou retido nas camadas superficiais da pele. Os resultados sugerem que os NLCs desenvolvidos demonstraram potencial para administração de FLU via cutânea.

ABSTRACT

The fluconazole (FLU) is an antifungal drug widely used in the treatment of dermatomycosis because of its great combination of efficacy as well as your safety profile. However, this can often provide an inadequate pharmacokinetic profile, providing resistance of the disease and presenting a large number of side effects as well as high toxicity. For this reason, there is a continuous search for new potent antifungal drugs, but above all, safer than the existing ones. The nanostructured lipid carriers (NLC) are systems produced by a blend of solid and liquid lipid and one of its advantages is high encapsulation efficiency. The aim of this study was to develop and characterize NLCs containing fluconazole to cutaneous route. First, it was done the solubility test of FLU in acid oleic (AO) and glyceryl monoestearate (GMS) which was observed a higher incorporation of FLU in this blend of lipids comparing with these lipids individually. The NLCs containing AO, GMS, poloxamer-407, soy phosphatidylcholine (PC) and FLU, were prepared by method using high-shear homogenization. The system was characterized by ultraviolet absorption spectrophotometry and the results of the average size, polydispersity (Pdl), and zeta potential were 218,63 and 314,1nm, 0,417 and 0,640, and -28,4 and -25,8mV to NLC with (NLC_FLU) or without FLU (NLC) respectively. For the study of stability, the NLCs and NLC_FLU was stored at 8°C and at room temperature and the results showed a greater stability to NLC_FLU stored at 8°C than the other ones after six months. The NLC were analyzed by field emission gun scanning electron microscope and the results showed a spherical and nanometric morphology. An analytical methodology was validated to evaluate the encapsulation efficiency (EE) by ultraviolet absorption spectrophotometry and the EE obtained was 96,84%. It was done the *in vitro* release, cutaneous permeation and retention of FLU which demonstrate that the NLCs were able to extend the drug release. The amount of FLU permeated was 0.30 $\mu\text{g} / \text{cm}^2$ and the retained in the upper layers of the skin was 0.01 $\mu\text{g} / \text{cm}^2$. The results suggest that this NLCs had potential for cutaneous route administration of FLU.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura da pele	12
Figura 2. Vias de permeação de fármacos através do estrato córneo	14
Figura 3. Absorção percutânea	14
Figura 4. Antifúngicos da classe dos azóis.....	15
Figura 5. Classificação do modelo de incorporação de fármacos nos NLCs.....	19
Figura 6. Representação esquemática do método de homogeneização em alta velocidade de cisalhamento a quente	24
Figura 7. Equipamento automatizado de permeação cutânea	30
Figura 8. Avaliação do diâmetro médio(nm) dos NLCs no período de seis meses ..	38
Figura 9. Avaliação do Pdl dos NLCs no período de seis meses	39
Figura 10. Avaliação do potencial zeta (mV) dos NLCs no período de seis meses..	40
Figura 11. Morfologia dos NLCs sem FLU por microscopia eletrônica de varredura de efeito de campo.....	41
Figura 12. Morfologia dos NLCs com FLU por microscopia eletrônica de varredura de efeito de campo.....	41
Figura 13. Espectro de absorção do FLU em álcool metílico	42
Figura 14. Curva analítica do FLU em metanol no comprimento de onda de 261nm	42
Figura 15. Curva analítica do FLU em tampão fosfato de potássio 0,01M pH 7,4....	48
Figura 16. Perfil de liberação do FLU incorporado nos NLCs.....	49
Figura 17. Perfil de permeação cutânea do FLU	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Seleção da proporção GMS/AO.....	23
Tabela 2. Condições analíticas empregadas nos estudos de liberação, permeação e retenção <i>in vitro</i> do FLU	29
Tabela 3. Solubilidade do FLU em AO.....	33
Tabela 4. Solubilidade do FLU em GMS.....	34
Tabela 5. Porcentagem de FLU solubilizado na mistura GMS/AO	35
Tabela 6. Valores de diâmetro médio, índice de polidispersidade e potencial zeta de NLC com e sem o FLU, armazenados em temperatura ambiente e à 8°C.....	37
Tabela 7. Precisão intra-corrida	43
Tabela 8. Precisão inter-corrida	44
Tabela 9. Limite de detecção e Limite de quantificação	45
Tabela 10. Exatidão	46
Tabela 11. Robustez	46
Tabela 12. Eficiência de encapsulação dos NLCs	47
Tabela 13. Quantidade de FLU liberado em sua forma livre e encapsulado nos NLCs após 24h de experimento	49
Tabela 14. Quantidade de fluconazol permeado na pele.....	51
Tabela 15. Quantidade do fluconazol retido nas camadas da pele.....	51

LISTA DE ABREVIATURAS

AO: Ácido Oléico

CLAE: Cromatografia líquida de alta eficiência

DP: Desvio Padrão

FLU: Fluconazol

MEV-FEG: Microscopia eletrônica de varredura de efeito de campo

GMS: Monoestearato de glicerila

ICH: *International Commision on Harmonisation*

LD: Limite de Detecção

LQ: Limite de Quantificação

NLC: Carreadores lipídicos nanoestruturados

PC: Fosfatidilcolina

PLU: Pluronic

SLN: Nanopartículas sólidas lipídicas

UV: Ultravioleta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. OBJETIVO	21
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
3. MATERIAIS.....	22
3.1. REAGENTES E MATÉRIAS PRIMAS:	22
3.2. EQUIPAMENTOS	22
4. METODOLOGIA.....	23
4.1. ESTUDO DE INCORPORAÇÃO DO FLU EM GMS E AO SEPARADAMENTE.	23
4.2. ESTUDO DE INCORPORAÇÃO DO FLU NA MISTURA GMS/AO.	23
4.3. DESENVOLVIMENTO DOS NLCs UTILIZANDO A TÉCNICA DE HOMOGENEIZAÇÃO EM ALTA VELOCIDADE DE CISALHAMENTO.	24
4.4. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS NLCs	24
4.4.1. AVALIAÇÃO DO DIÂMETRO MÉDIO, ÍNDICE DE POLIDISPERSIDADE E POTENCIAL ZETA.	25
4.4.2. AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DOS NLCs	25
4.4.3. AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DOS NLCs POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE EFEITO DE CAMPO (MEV-FEG)	25
4.5. VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA POR ESPECTROFOTOMETRIA NA REGIÃO ULTRAVIOLETA	26
4.5.1. CONSTRUÇÃO DA CURVA ANALÍTICA	26
4.5.2. LINEARIDADE	26
4.5.3. PRECISÃO	26
4.5.4. LIMITE DE DETECÇÃO E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO	27
4.5.5. EXATIDÃO.....	27
4.5.6. ROBUSTEZ.....	28
4.6. AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO DO FLU NOS NLCs.....	28
4.7. ESTUDO DE LIBERAÇÃO, PERMEAÇÃO E RETENÇÃO CUTÂNEA <i>IN VITRO</i>	29
4.7.1. CURVA ANALÍTICA DE FLU EM TAMPÃO FOSFATO 0,01M PH 7,4	29
4.7.2. PERFIL DE LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i>	30
4.7.3. PERMEAÇÃO E RETENÇÃO CUTÂNEA <i>IN VITRO</i>	31
5. RESULTADOS.....	33
5.1. ESTUDO DE INCORPORAÇÃO DO FLU EM GMS E AO ISOLADOS.	33
5.2. ESTUDO DA INCORPORAÇÃO DO FLU NA MISTURA GMS/AO.	34
5.3. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS NLCs	36
5.3.1. AVALIAÇÃO DO DIÂMETRO MÉDIO, ÍNDICE DE POLIDISPERSIDADE E POTENCIAL ZETA.....	36
5.3.2. AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DOS NLCs	38
5.3.3. AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DOS NLCs POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE EFEITO DE CAMPO (MEV-FEG)	40

5.4. VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO DE FLU POR ESPECTROMETRIA ULTRAVIOLETA.....	41
5.4.1. LINEARIDADE	42
5.4.2. PRECISÃO	43
5.4.3. LIMITE DE DETECÇÃO E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO	45
5.4.4. EXATIDÃO.....	45
5.4.5. ROBUSTEZ.....	46
5.4.6. DETERMINAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO.....	47
5.5.1. CURVA ANALÍTICA DE FLU EM TAMPÃO FOSFATO 0,01M PH 7,4	47
5.5.2. LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i>	48
5.5.3. PERMEAÇÃO E RETENÇÃO CUTÂNEA <i>IN VITRO</i>	50
6. DISCUSSÃO	52
7. CONCLUSÃO	53
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, tem ocorrido um expressivo aumento da incidência de infecções fúngicas, que são consideradas um dos maiores problemas de saúde pública. Dentre estas infecções, se destacam as dermatomicoses, que são infecções de natureza fúngica localizadas na pele, pelos, unhas e dobras periungueais, no conduto auditivo externo, nas mucosas e zonas cutâneo-mucosas (LACAZ *et. al.* 2002). São de ocorrência universal, com maior prevalência em regiões de clima quente e úmido. Um dos tipos de dermatomicose é a dermatofitose, causada por fungos dermatófitos, capazes de invadir ou parasitar tecidos queratinizados, como pele, pêlos e unhas e produzir doenças infectocontagiosas em homens e animais (CAMPANHA, 2007).

As infecções fúngicas que acometem a pele são classificadas em subcutâneas, profundas ou sistêmicas. As subcutâneas resultam de infecção traumática ocasionando doenças localizadas e as sistêmicas podem atingir os órgãos internos do corpo ou se difundirem pela circulação sanguínea. (SILVA, 2011)

O tratamento das micoses é difícil e nem sempre efetivo já que o sucesso terapêutico depende da adesão do paciente, pois as recidivas são frequentes e principalmente pela má utilização ou descontinuidade do fármaco (CAMPANHA, 2007).

Os fármacos antifúngicos disponíveis possuem um perfil farmacocinético muitas vezes inadequado, promovendo recorrência ou resistência, apresentando uma série de efeitos colaterais além de alta toxicidade. Por esta razão, há uma busca contínua de novos medicamentos antifúngicos mais potentes, mas sobretudo, mais seguros que os existentes (SILVA, 2011).

No entanto, o desenvolvimento de um novo antifúngico não é simples e representa um grande desafio para todos os pesquisadores da área, uma vez que o fungo sendo uma célula eucariótica, possui os mesmos alvos potenciais de ação da célula do hospedeiro, o que confere ao antifúngico altos níveis de toxicidade (SIZENANDO NETO; SVIDZINSKI, 2002).

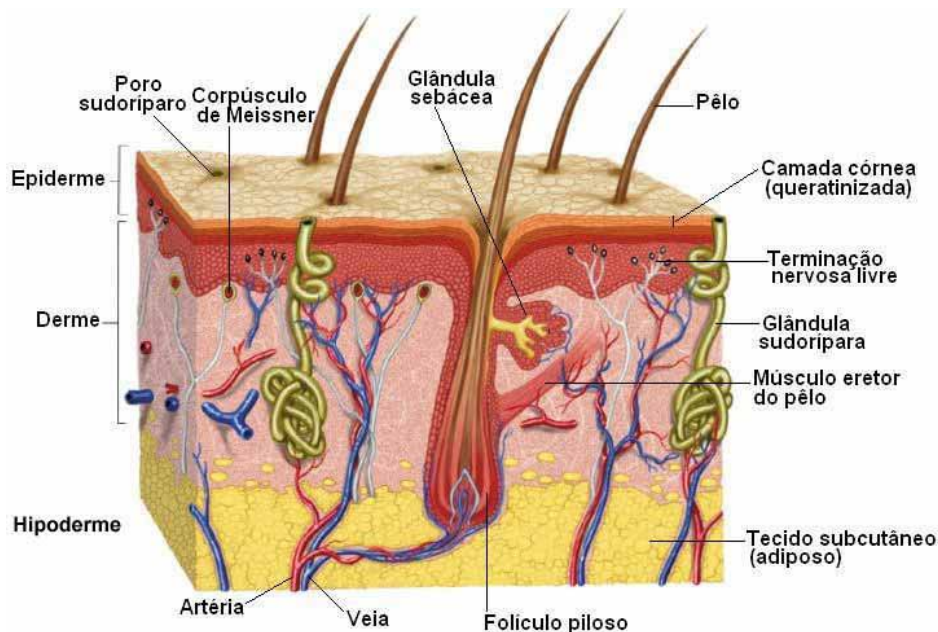
Por essa razão, nas últimas décadas vem aumentando o interesse no desenvolvimento de fármacos e sistemas de liberação farmacêuticos para serem administrados na pele ou mucosas, a fim de exercer ação local ou sistêmica tentando minimizar os efeitos colaterais causados pela maioria desses fármacos (SILVA, 2011).

A administração pela via cutânea oferece algumas vantagens como evitar o metabolismo pré-sistêmico do fármaco, ausência de degradação pelo trato gastro intestinal, além de melhorar a adesão do paciente ao tratamento (MACHET, BOUCAUD, 2002).

A pele é o maior órgão do corpo humano, com a função de proteção térmica, impedindo a perda de água e entrada de qualquer organismo ou partícula estranha sendo uma barreira eficiente contra a permeação de substâncias exógenas (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2013).

É um órgão estratificado que possui três camadas distintas: epiderme, derme e tecido subcutâneo, onde estão incluídos os apêndices como glândulas sebáceas e sudoríparas e folículos pilosos (Figura 1) (WALTERS, ROBERTS, 2002).

Figura 1. Estrutura da pele



(Fonte: SILVA, 2011)

Na camada mais externa da pele, a epiderme, está localizado o estrato córneo que possui um espaço intercelular rico em lipídios, formado por matrizes lamelares com camadas hidrofílicas e lipofílicas alternadas, além de possuir células queratinizadas sobrepostas umas às outras e comprimidas em diversas camadas. É devido a essa composição que o estrato córneo é considerado a principal barreira limitante à permeação de fármacos (WALTERS, ROBERTS, 2002; BLOCK, 2005).

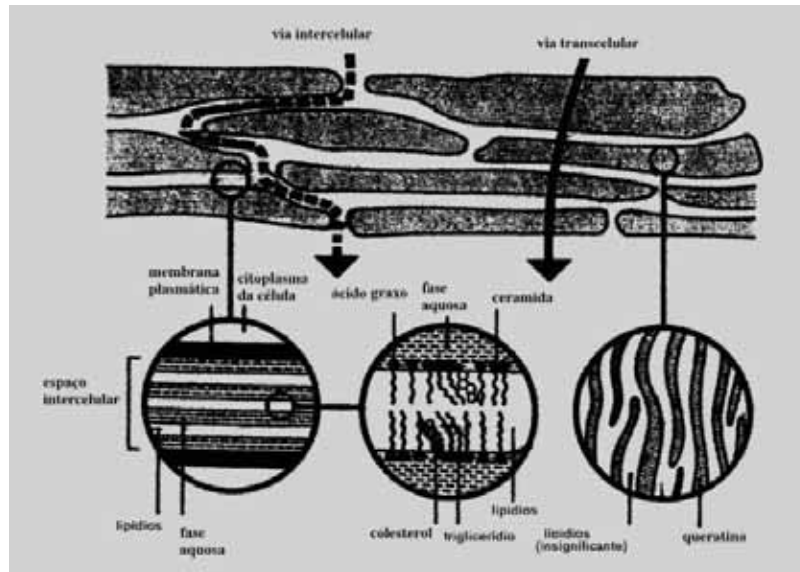
Algumas substâncias são capazes de interagir com o estrato córneo alterando a sua resistência à penetração de moléculas exógenas, aumentando assim a permeação cutânea. Esses agentes específicos são chamados de promotores de permeação, como o, dimetil-sulfóxido (DMSO), ácido láctico, ácido oleico, ácido salicílico, ureia, solventes orgânicos e os tensoativos, os quais podem ser incorporados em formulações tópicas facilitando assim a difusão do fármaco (SILVA, 2011).

A promoção de permeação de fármacos através da pele pode: melhorar a liberação do fármaco com a utilização de preparações farmacêuticas específicas; aumentar o fluxo ou retenção do fármaco através da pele, pode também aumentar a liberação localizada, tópica ou nos tecidos alvos por meio da pele (MARTINS; VEIGA; 2002)

Um promotor ideal deve ser farmacologicamente inerte, não tóxico, não irritante, química e fisicamente compatível com o fármaco e excipientes, aceitável cosmeticamente, inodoro e possuir boas propriedades solventes (HADGRAFT, 1999; SINHA; KAUR, 2000).

A permeação de fármacos através da pele pode ocorrer pelas vias: transcelular, na qual o fármaco atravessa estruturas lipídicas do estrato córneo e o citoplasma dos corneócitos, entrando em contato com estruturas hidrofílicas e lipofílicas; e via intercelular, passando por meio da matriz extracelular de característica predominantemente hidrofílica (RIGON, 2013). A Figura 2 apresenta o processo de permeação.

Figura 2. Vias de permeação de fármacos através do estrato córneo

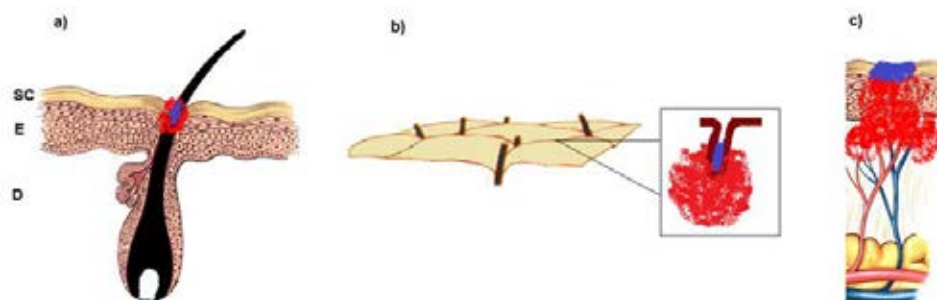


(Fonte: MOSER *et al.*, 2001)

Para uma partícula permear a pele, o ideal é que ela tenha um tamanho de até 700nm. No entanto, alguns estudos sobre permeação veem demonstrando que partículas de diferentes tamanhos, maiores até do que 700nm, também podem permear a pele humana (RIGON, 2013; ALVAREZ-ROMÁN *et al.*, 2004).

De acordo com PROW 2011, as nanopartículas podem apresentar três diferentes mecanismos de liberação, via folículo piloso (Figura 3a), sulcos (Figura 3b) e estrato córneo (Figura 3c) (PROW *et al.*, 2011).

Figura 3. Absorção percutânea

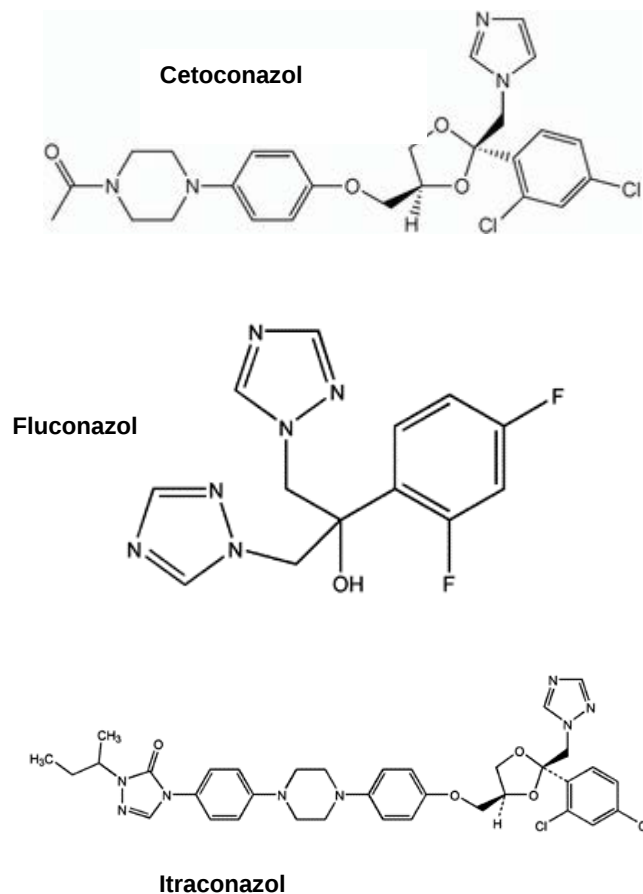


(adaptado de PROW, 2011)

O estrato córneo pode agir como um reservatório do fármaco, pois permite a penetração gradual para o interior das camadas da pele durante um longo período de tempo (PARKER, 2007). Considerando isso, um produto tópico ideal, seria aquele capaz de liberar concentrações ideais de fármaco no tecido cutâneo ou lesão por um período de tempo tão longo quanto o necessário (SILVA, 2011).

Antifúngicos da classe dos polienos, como a anfotericina B e a niacina, e da classe dos azóis como o itraconazol, cetoconazol e fluconazol (Figura 4) são atualmente os mais eficazes para o tratamento de infecções fúngicas. No entanto, possuem algumas limitações terapêuticas como falta de eficácia devido à crescente resistência dos fungos, índice de tolerância, espectro de atividade inadequado e custo excessivo (REX, 2011).

Figura 4. Antifúngicos da classe dos azóis



(Fonte: SILVA, 2011)

O ideal para um antifúngico é que ele possua amplo espectro de ação, apresente poucas interações medicamentosas, seja seguro em doses terapêuticas, tenha custo acessível, não apresente resistência e além disso tenha ação fungicida ao invés de fungistática (SIZENANDO NETO; SVIDZINSKI, 2002).

O fluconazol ($C_{13}H_{12}F_2N_6O$) é um pó branco, considerado uma base fraca, pouco solúvel em água, solúvel em etanol e acetona, facilmente solúvel em metanol e muito pouco solúvel em tolueno. Trata-se de um derivado triazólico resultante da substituição do anel imidazólico por triazólico, tal substituição, ampliou o espectro de ação e seletividade desse fármaco, além de torná-lo menos lipofílico (O'NEIL, 2006; DASH; ELMQUIST, 2001; COELHO *et al.*, 2004).

Os triazóis, agem inibindo o transporte de substâncias essenciais como aminoácidos, para o interior das células fúngicas, por meio da interferência na biossíntese de proteínas, RNA e DNA dos microrganismos. Há a inibição da enzima do P450-14-alfa-demetilase, responsável pela conversão do lanosterol em ergosterol. A depleção do ergosterol altera a fluidez da membrana celular fúngica, além de favorecer o acúmulo de peróxido de hidrogênio nas células levando a danos celulares (PIGATTO *et al.* 2009).

Além disso, em comparação aos imidazólicos, o fluconazol é metabolizado de forma mais lenta e praticamente não altera a síntese do ergosterol das membranas dos mamíferos, sendo melhor absorvido e menos tóxico. (PARK *et al.*, 2007).

Embora o fluconazol apresente uma lipofilicidade suficiente para ser reabsorvido no túbulo renal, sua depuração é predominantemente renal devido à sua alta estabilidade metabólica conseguida pela combinação de elementos estruturais como a resistência dos anéis triazólicos ao ataque oxidativo, o bloqueio da hidroxilação aromática pela presença de dois átomos de flúor e o impedimento estérico da hidroxila, podendo ser um sítio de conjugação (PEREIRA, 2007).

O fluconazol exerce atividade sobre várias espécies de fungos causadores de micoses profundas e superficiais e se destaca por sua ótima combinação de eficácia, características farmacocinéticas, solubilidade e perfil de segurança (PEREIRA, 2007). Entretanto, é necessário mais estudos para a determinação de dose ideal e duração do tratamento pois este é muito longo, principalmente quando há presença de lesões cutâneas, sendo que a dose quase sempre precisa ser aumentada para se obter melhor resposta ao tratamento (SILVA, 2011).

Ao longo dos últimos anos nosso grupo de pesquisa tem se dedicado ao desenvolvimento e avaliação de sistemas de liberação para administração de fluconazol. Klein, 2007 desenvolveu e caracterizou sistemas nanoestruturados (microemulsão e cristais líquidos) contendo FLU para o tratamento de esporotricose.

Em um estudo de permeação intestinal os resultados demonstraram que o transporte do FLU através da membrana intestinal aumentou de 4 a 5 vezes quando comparado com o fármaco em solução. Desta forma, com os resultados apresentados, sugere-se que o sistema foi capaz de atuar como sistema de liberação para o fluconazol.

Luz, 2011 avaliou a toxicidade dérmica aguda do fluconazol, incorporado em microemulsões e cristais líquidos. Os resultados mostraram que os sistemas contendo AO como fase lipídica, não apresentaram sinais de toxicidade irreversíveis, pois desapareceram em 9 dias. Além disso, o AO não apresentou alteração da morfologia epidermal. Com esses resultados sugere-se que o AO não é identificado como uma substância tóxica.

Em um estudo realizado por SILVA 2011, foram desenvolvidos sistemas nanoestruturados (microemulsão e cristais líquidos) estabilizados com álcool cetílico etoxilado e propoxilado contendo fluconazol para o tratamento de dermatomicoses. Nos ensaios de liberação *in vitro* os resultados mostraram que as formulações contendo AO foram capazes de modificar o perfil de liberação do FLU.

O ácido oleico por possuir propriedades promotoras de permeação, favorece a penetração cutânea devido à sua similaridade com as estruturas do estrato córneo, pois uma vez em contato com essa camada, sua molécula sofre uma torção causada pela presença da dupla ligação do tipo *cis*, gerando poros na superfície do estrato córneo aumentando sua permeabilidade (HOELLER; KLANG; VALENTA, 2008).

A nanotecnologia representa um grande avanço no desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos. Caracterizados por possuírem tamanho reduzido de partículas e principalmente pela propriedade de compartimentalização de fármacos em ambientes restritos, esses sistemas podem direcionar substâncias ativas para regiões específicas necessárias ao efeito farmacológico, além de poder controlar e prolongar sua liberação (MAINARDES *et al.*, 2005, MOURÃO *et al.*, 2005).

Há um grande interesse na busca de alternativas tecnológicas que melhorem as propriedades biofarmacêuticas dos fármacos, com o foco no desenvolvimento de sistemas de liberação, como lipossomas, microemulsões, dispersões sólidas, cristais líquidos, nanopartículas lipídicas sólidas e carreadores lipídicos nanoestruturados (MAINARDES *et al.* 2006)

As nanopartículas lipídicas sólidas ou *solid lipid nanoparticles* (SLNs) foram desenvolvidas como sistemas carreadores alternativos combinando as vantagens dos lipossomas, como propriedade de transporte e direcionamento de fármacos aos locais de ação, mas evitando desvantagens em relação à estabilidade frente à expulsão do fármaco e a dificuldade de escalonamento. São compostas por uma matriz, que é sólida a temperatura ambiente que protege os fármacos incorporados contra a degradação química, além de apresentarem custo relativamente baixo dos excipientes, capacidade de serem produzidos em larga escala e amplo espectro de aplicação (oral, intravenosa, dérmica, oftálmica) (HU *et al.*, 2008; KRISTL *et al.*, 2003; KUMAR *et al.*, 2007; LIN *et al.*, 2007; MÜLLER *et al.*, 2007; RADOMSKA-SOUKHAREV, 2007; ZHANG *et al.*, 2006).

Na tentativa de suprir as limitações das SLNs, foram desenvolvidos os carreadores lipídicos nanoestruturados ou *nanostructured lipid carriers* (NLC). São considerados uma nova geração das SLNs, porém, em contraste a estas, que são produzidas a partir de lipídios sólidos, os NLCs são compostos por uma matriz constituída de lipídios sólidos e lipídios líquidos (FANG *et al.*, 2008; JANNIN *et al.*, 2008; TEERANACHAIDEEKUL *et al.*, 2007). Devido sua natureza lipofílica, são utilizados como sistemas carreadores para fármacos que são mais solúveis em lipídios líquidos do que em lipídios sólidos (MÜLLER *et al.*, 2008).

As concentrações dos lipídios presentes nos NLCs e as suas características, tais como, ponto de fusão, viscosidade e a forma de cristalinização podem influenciar a estabilidade dos NLCs. (LIU & WU, 2010). A matriz lipídica resultante dos NLCs mostra uma redução no ponto de fusão quando comparado com as SLNs (JOSHI, 2008).

O tipo de lipídio utilizado na preparação dos NLCs, é o responsável pela formação de NLCs com diferentes matrizes. (SOUTO & MULLER, 2007), como ilustrado na Figura 5.

Figura 5. Classificação do modelo de incorporação de fármacos nos NLCs



(SOUTO & MULLER, 2007)

- Tipo I se refere ao tipo de cristal imperfeito, devido a formação de uma matriz única, que podem acomodar o fármaco.
- Tipo II é chamado de sistema amorfo, quando a mistura de lipídios não é recristalizada após o resfriamento, e estes obtêm partículas sólidas contendo sua estrutura amorfa.
- Tipo III também chamado de tipo múltiplo, ocorre com certos números de fármacos que são mais solúveis no lipídio líquido do que no lipídio sólido (SOUTO & MÜLLER, 2007).

Utiliza-se lipídios líquidos que sejam miscíveis nos lipídios sólidos quando fundidos, assim, na solidificação do lipídio sólido, este fixa o lipídio líquido em seus compartimentos (MÜLLER *et al.*, 2008). Assim, é formada uma estrutura interna menos ordenada na qual as moléculas de fármaco podem estar mais integradas entre as camadas lipídicas e/ou entre as cadeias de ácidos graxos fazendo com que os NLCs apresentem maior capacidade de encapsulamento além de minimizar o tempo de expulsão do fármaco (TEERANACHAIDEEKUL *et al.*, 2007).

Os lipídios usualmente escolhidos são excipientes comercialmente disponíveis para o uso em cosméticos ou preparações farmacêuticas (JOSHI & PATRAVALE, 2007).

Os tensoativos são substâncias naturais ou sintéticas que possuem uma parte lipofílica e outra hidrofílica, responsáveis pela adsorção de moléculas tensoativas nas interfaces (ROSSI *et al.* 2006).

Geralmente quando há a incorporação de tensoativo na formulação, observa-se a redução do tamanho de partícula e o aumento da estabilidade. Para a escolha do tensoativo, é importante considerar tanto os princípios físicos, propriedade das partículas quanto via de administração (MÜLLER *et al.*, 2006). Alguns parâmetros como distribuição do tamanho das partículas, índice de polidispersidade e potencial zeta são importantes na avaliação de estabilidade dos sistemas (HAN, *et al.*, 2008; TAN, *et al.*, 2010).

Tendo em vista essas dificuldades e sabendo da relevância das infecções fúngicas para a saúde pública, se torna cada vez mais necessária a busca por novas alternativas tecnológicas para o uso de antifúngicos no tratamento dessas doenças, de uma forma que possibilitem uma maior eficácia do mesmo na terapia e que forneça maior diversidade de tratamento. Portanto, o objetivo do presente trabalho foi desenvolver e caracterizar NLCs visando a administração cutânea do fluconazol.

Para o desenvolvimento dos NLCs, optou-se pela utilização de monoestearato de glicerila (GMS), ácido oleico (AO), fosfatidilcolina de soja (PC) e fluconazol como componentes da fase lipídica, e poloxamer-407 e água como componentes da fase aquosa.

2. OBJETIVO

Desenvolver e caracterizar carreadores lipídicos nanoestruturados a fim de melhorar as propriedades biofarmacêuticas do fluconazol visando a administração cutânea.

2.1. Objetivos específicos

- ✓ Desenvolver NLCs para a incorporação do FLU;
- ✓ Caracterizar físico-quimicamente os sistemas obtidos, através da determinação de diâmetro médio, índice de polidispersidade e potencial zeta;
- ✓ Avaliar a estabilidade dos NLCs no período de seis meses;
- ✓ Avaliar a morfologia dos NLCs através de microscopia eletrônica de varredura de efeito de campo (MEV-FEG);
- ✓ Validar o método de espectrofotometria na região ultravioleta para quantificar o FLU nos NLCs;
- ✓ Analisar a eficiência de encapsulação do FLU nos NLCs;
- ✓ Avaliar o perfil de liberação *in vitro* utilizando membranas de acetato de celulose;
- ✓ Avaliar *in vitro* de permeação e retenção cutânea empregando peles de orelha de porco.

3. MATERIAIS

3.1. Reagentes e matérias primas:

- ✓ Ácido oléico (Synth[®]);
- ✓ Água deionizada Milli-Q[®];
- ✓ Álcool metílico (QHEMIS[®]);
- ✓ Poloxamer – 407 (Pluronic- F127) (Sigma[®]);
- ✓ Fluconazol (Purifarma[®]);
- ✓ Fosfatidilcolina de soja (Lipoid[®])
- ✓ Monoestearato de Glicerila (Henrifarma[®])

3.2. Equipamentos

- ✓ Purificador de água Milli-Q Plus, Direct 8 – Millipore[®] ;
- ✓ Agitador Ultra-Turrax[®] (IKA, mod. TC 25 basic);
- ✓ Espectrofotômetro UV-VIS (Hewlett Packard-Kayak XA);
- ✓ Balança analítica (SHIMADZU[®]);
- ✓ pH-Metro MicroNal[®] B474;
- ✓ Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments, UK);
- ✓ Sistema automático com célula de difusão vertical de Franz – Microette Plus; (Hanson Research Corporation[®]);
- ✓ Microscópio Eletrônico de Varredura – JEOL JSM 7500F;
- ✓ HPLC Varian[®] ProStar 310.

4. METODOLOGIA

4.1. Estudo de incorporação do FLU em GMS e AO separadamente.

Primeiramente, realizou-se um teste de incorporação do FLU em *glyceryl monoestearate* ou monoestearato de glicerila (GMS) e AO separadamente. Para tanto, pesou-se 1g de GMS e 1g de AO em béqueres separados, nos quais, 0,01g de FLU foram sendo adicionados a medida que o sistema se saturava.

O teste de solubilidade do FLU em AO foi conduzido até a temperatura de 80°C. Para o ensaio de incorporação do FLU no GMS testou-se as temperaturas de 60°C, 70°C, 80°C e 90°C com a finalidade de avaliar a influência da temperatura sobre a solubilidade do FLU.

4.2. Estudo de incorporação do FLU na mistura GMS/AO.

Para o estudo de incorporação do FLU nos lipídios, preparou-se 2g da mistura binária em diferentes proporções (Tabela 1) com a finalidade de selecionar a proporção lipídica que incorporasse maior concentração de FLU. O teste iniciou-se a temperatura de 60°C, 0,01g de FLU foi sendo adicionado em cada amostra. No momento em que o sistema se saturava, a temperatura era aumentada em 10°C e seguia-se com as adições do fármaco, até se atingir a temperatura máxima de 90°C.

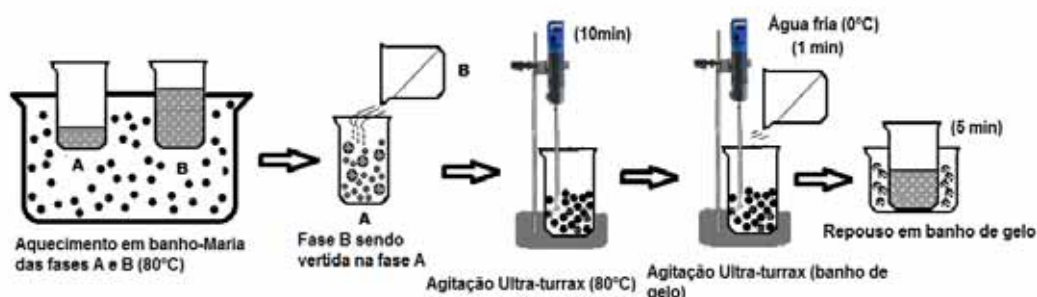
Tabela 1. Seleção da proporção GMS/AO

Amostra	GMS(%)	AO(%)
1	10	90
2	20	80
3	30	70
4	40	60
5	50	50
6	60	40
7	70	30
8	80	20
9	90	10

4.3. Desenvolvimento dos NLCs utilizando a técnica de homogeneização em alta velocidade de cisalhamento.

Os NLCs foram desenvolvidos utilizando o método de homogeneização em alta velocidade de cisalhamento a quente (Figura 6) conforme descrito por SILVA 2009 e KOLENYAK-SANTOS 2014.

Figura 6. Representação esquemática do método de homogeneização em alta velocidade de cisalhamento a quente



(KOLENYAK-SANTOS, 2011)

Primeiramente a fase lipídica contendo GMS, AO, fosfatidilcolina de soja (PC) foi aquecida a 80°C e a fase aquosa contendo água e Poloxamer – 407 (P-407) foi aquecida na mesma temperatura. Verteu-se a fase aquosa na lipídica e a emulsão formada foi submetida à agitação de 11000rpm em Ultra-Turrax® por 10 min. Em seguida, o sistema resultante foi submetido à agitação em banho de gelo e foram acrescentados 12,5mL de água destilada gelada para obter a solidificação dos NLCs. Nas preparações contendo FLU, o fármaco foi adicionado e dissolvido na fase lipídica e as etapas subsequentes foram às mesmas descritas.

4.4. Caracterização físico-química dos NLCs

Os sistemas foram caracterizados avaliando o diâmetro médio das partículas, índice de polidispersidade, potencial zeta e microscopia eletrônica de varredura de efeito de campo. Além disso, avaliou-se a estabilidade do sistema, o perfil de liberação, a permeação e retenção cutânea *in vitro*.

4.4.1. Avaliação do diâmetro médio, índice de polidispersidade e potencial zeta.

Os sistemas foram caracterizados por espectroscopia de correlação de fótons (Zetasizer Nano-ZS, Malvern Instruments, UK-Malvern). As preparações foram previamente filtradas em membranas de polycarbonato (Millipore®) com poros de 0,22 µm. A temperatura do sistema foi mantida a 25°C.

Para realização dos ensaios, 30 µL de amostra foi diluída em 970 µL de água Milli-Q. Os ensaios foram realizados em amostras com e sem o FLU, armazenadas tanto em temperatura ambiente quanto à 8°C. Para os sistemas armazenados à 8°C, o tempo inicial foi de seis horas após o seu desenvolvimento.

4.4.2. Avaliação da estabilidade dos NLCs

Para o estudo de estabilidade foram analisados o diâmetro médio, índice de polidispersidade e potencial zeta de NLCs com e sem o fármaco, determinados através da técnica de espectroscopia de correlação de fótons (Zetasizer Nano-ZS, Malvern Instruments, UK-Malvern). Os sistemas NLC e NLC_FLU foram armazenados a 8°C e à temperatura ambiente.

A avaliação foi feita nos tempos: zero (mesmo dia do desenvolvimento), um mês e seis meses após o desenvolvimento dos sistemas. Todas as amostras foram diluídas conforme item 4.4.1 e as medidas foram feitas em triplicata. Para as formulações armazenadas à 8°C as medidas foram realizadas 6 horas após o preparo.

4.4.3. Avaliação morfológica dos NLCs por microscopia eletrônica de varredura de efeito de campo (MEV-FEG)

As análises foram feitas em Microscópio Eletrônico de Varredura JEOL JSM 7500F em modo Alto Vácuo. O estudo foi feito após secagem da amostra em temperatura ambiente (25°C), que foi colocada sobre pino de alumínio e fixada em cola de carbono. A amostra tornou-se condutora por deposição de uma camada de ouro.

4.5. Validação da metodologia analítica por espectrofotometria na região ultravioleta

A validação da metodologia analítica utilizando espectrofotometria na região ultravioleta para a determinação do FLU, foi realizada de acordo com a resolução 899 publicada pela ANVISA, o *International Commision on Harmonisation* (ICH) e a Farmacopeia Britânica. O objetivo de uma validação é demonstrar que o método é apropriado para a finalidade pretendida e deve garantir que o método atenda as exigências das aplicações analíticas assegurando a confiabilidade dos resultados (ANVISA, 2003, ICH, 2005; BRITISH PHARMACOPOEIA, 2010).

4.5.1. Construção da curva analítica

Para obtenção da curva analítica, pesou-se 2mg/mL de fluconazol, transferiu-se para um balão volumétrico de 100mL. Transferiram-se alíquotas de solução estoque para um balão volumétrico a fim de obter as concentrações de 0,10; 0,20; 0,30; 0,40; 0,50; 0,60 mg/mL de fármaco respectivamente e o volume foi completado com álcool metílico absoluto, essa solução foi então homogeneizada e em seguida a absorbância das amostras foram medidas empregando como comprimento de onda 261nm, em um branco de álcool metílico absoluto. As diluições e as curvas foram preparadas em triplicata.

4.5.2. Linearidade

A linearidade do método foi determinada através da obtenção da curva analítica de FLU em álcool metílico absoluto, descrito no item 4.5.1.

4.5.3. Precisão

A precisão foi avaliada por ensaios de repetibilidade, sendo intra e inter dia, realizou-se em três dias diferentes, sendo preparadas e analisadas três concentrações em cada dia. Para determinar a precisão, a partir da solução estoque de 2mg/mL de FLU em álcool metílico absoluto, preparou-se soluções nas

concentrações de 0,1mg/ml , 0,3mg/ml e 0,6mg/ml o que corresponde as concentrações baixa, média e alta respectivamente da linearidade da curva padrão, os ensaios foram realizados em triplicata.

4.5.4. Limite de detecção e limite de quantificação

Para determinar o limite de detecção e quantificação, foram preparadas três soluções em triplicata. O limite de detecção foi calculado baseando na equação conforme descrito no ICH que é expresso conforme demonstrado na Equação 1 (ICH, 2005)

$$LD = \frac{3,3 \times \alpha}{S} \quad \text{Equação 1.}$$

Em que, α = desvio padrão e S= inclinação da curva de calibração.

O limite de quantificação foi calculado através da Equação 2 conforme descrito no ICH 2005.

$$LQ = \frac{10 \times \alpha}{S} \quad \text{Equação 2.}$$

Em que, α = desvio padrão e S= inclinação da curva de calibração.

4.5.5. Exatidão

De acordo com a ANVISA 2003, a exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor aceito como verdadeiro. Ela pode ser determinada pela aplicação do teste de recuperação da concentração média do analito em diferentes concentrações e pelo desvio padrão relativo. Deve-se avaliar a exatidão a partir de, no mínimo nove determinações contemplando o intervalo linear do procedimento, ou seja, três concentrações. Baixa, média e alta, feitas em triplicata. A exatidão é expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a

concentração teórica correspondente, sendo calculada pela Equação 3 (ANVISA, 2003). As concentrações utilizadas para este teste foram 0,1mg/ml (baixa), 0,3mg/ml (média) e 0,6mg/ml (alta).

$$\text{Exatidão} = (\text{CME}/\text{CT}) \times 100$$

Equação 3.

Em que, CME= concentração média experimental e CT= concentração teórica.

4.5.6. Robustez

A robustez é a medida da capacidade que o método possui e em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. Indica sua confiança durante o uso normal. Um método é considerado robusto quando as alterações testadas não produzem mudanças significativas nos resultados. Neste ensaio, avaliou-se a interferência de diferentes fabricantes do solvente.

4.6. Avaliação da eficiência de encapsulação do FLU nos NLCs

A capacidade de incorporação dos fármacos nos sistemas foi avaliada por espectrofotometria na região do ultravioleta. Para determinar a eficiência de encapsulação, a amostra foi ultracentrifugada na velocidade de 45000 g por 40 minutos à temperatura de 8°C, em seguida separou-se o sobrenadante e este foi diluído em álcool metílico absoluto e quantificado por espectrofotometria na região ultravioleta, em 261nm. A eficiência de encapsulação foi calculada a partir da concentração de fármaco livre encontrado no sobrenadante e foi determinada conforme a Equação 4.

$$EE (\%) = \frac{\text{massa total de FLU} - \text{massa FLU na fase aquosa}}{\text{massa de FLU total}} \times 100$$

Equação 4.

4.7. Estudo de liberação, permeação e retenção cutânea *in vitro*

Para avaliação do estudo *in vitro* de liberação, permeação e retenção cutânea construiu-se uma curva analítica (em triplicata) com base na metodologia validada por Silva 2011.

4.7.1. Curva analítica de FLU em tampão fosfato 0,01M pH 7,4

As condições experimentais utilizadas estão apresentadas na Tabela 2. Foi construída a curva analítica do FLU em tampão fosfato de potássio monobásico 0,01M pH 7,4 a partir de uma solução estoque contendo 1mg.mL^{-1} de FLU preparada com o mesmo tampão. A partir desta solução, preparou-se novas diluições em balões de 5mL, a fim de se obter concentrações finais de 100, 250, 750, 1250, 1750 e $2000\mu\text{g.mL}^{-1}$. Cada concentração foi preparada em triplicata e as soluções foram filtradas em membrana $0,22\mu\text{m}$ e analisadas por CLAE.

A curva foi construída com a média dos valores das áreas lidas para cada concentração, verificando-se a relação linear e o coeficiente de determinação.

Tabela 2. Condições analíticas empregadas nos estudos de liberação, permeação e retenção *in vitro* do FLU

Parâmetros	Condições
Coluna	C18-RP (VARIAN-CHROMSEP®)
Fase Móvel	MeOH/H ₂ O (7:3)
Comprimento de onda	210 nm
Meio para preparação da amostra	Fase móvel
Temperatura do forno	25 °C
Fluxo	1ml.min ⁻¹
Volume de injeção	20 µl

4.7.2. Perfil de liberação *in vitro*

A liberação do fluconazol dos NLCs foi avaliada utilizando o equipamento automatizado de permeação cutânea Microette Plus Hanson Research Corporation® (Figura 7), que contém seis células de Franz modificadas, de volume de 7mL aproximadamente. A solução receptora foi o tampão fosfato monobásico 0,01M pH 7,4 e membrana sintética utilizada foi de acetato de celulose 0,22 μ m (Sigma-Aldrich®).

Figura 7. Equipamento automatizado de permeação cutânea



As células foram previamente preparadas com anel dosador colocado sobre membrana disposta sobre a célula. Posteriormente foram adicionadas alíquotas de 300 μ L de NLC_FLU ($1,5 \times 10^3$ μ g/ μ L de FLU) em cada célula até completar o anel dosador (área de exposição de 1,77cm²).

Os experimentos foram conduzidos a 32,5°C e a solução receptora constantemente agitada a 300 rpm, por meio de um placa magnética agitadora onde as células ficaram dispostas.

Foram coletadas alíquotas de 2mL, nos tempos de 30 minutos, 1, 2, 4, 6 e 12, 14, 16, 18, 20, 22 e 24 horas, filtradas em membrana de 0,22 μ m e analisadas por CLAE para quantificação do fármaco liberado por tempo. Um volume de 0,8mL foi desprezado antes do início de cada coleta. As alíquotas da coleta e os volumes desprezados foram repostos automaticamente e os valores utilizados nos cálculos da quantidade real permeada por tempo em função da área de exposição.

A Equação 5 (USP, 2010), foi utilizada para calcular a quantidade real liberada/permeada (Q real) em determinado tempo:

$$Q_{\text{real}, t} = C_t \cdot V_r + \sum V_c \cdot C_c$$

Equação 5.

Na qual:

Q real, t = quantidade real permeada referente ao tempo t;

C t = concentração obtida referente ao tempo t;

Vr = volume da solução receptora (7 mL)

Cc = concentração da amostragem anterior

Vc = volume amostrado (coletado + limpeza)

4.7.3. Permeação e retenção cutânea *in vitro*

Nos ensaios de permeação e retenção cutânea foram utilizadas peles de orelhas de porcos, não escaldadas, obtidas no Frigorífico Olhos d'Água, logo após o abate rotineiro de animais para o consumo. A escolha da pele de orelha de porco se deve ao fato de possuir características semelhantes a da pele humana (OECD/428, 2004; SCCP, 2006). As orelhas recebidas foram lavadas e os vasos sanguíneos, gordura, tecidos e pelos foram removidos com o auxílio de tesoura, descartando-se as orelhas nas quais foram observados danos na pele. Em seguida, as orelhas foram dessecadas com auxílio de pinça e bisturi. As peles foram dermatomizadas, com o auxílio de um dermatômetro, na espessura de 500µm, para retirar apenas o estrato córneo, epiderme e a camada mais externa da derme.

As peles foram previamente hidratadas e recortadas em tamanhos adequados para os ensaios de permeação. Em seguida, foram colocadas nas células de difusão, com o lado da derme voltado para baixo em contato com a solução receptora e na parte de cima, na região do estrato córneo, foi adicionada a formulação. Os experimentos foram conduzidos nas mesmas condições descritas no item 4.7.2. Amostras da solução receptora foram coletadas nos intervalos de 4, 6, 8, 10, 12, 16 e 24 horas. Os experimentos foram realizados em sextuplicata. A quantificação de FLU foi realizada por CLAE, utilizando a curva analítica obtida.

No experimento de retenção cutânea a pele ficou exposta por 24 horas, nas condições experimentais da permeação cutânea *in vitro*.

Ao final do tempo, as peles foram retiradas da célula de difusão e removeu-se o excesso de formulação com papel. As peles foram fixadas em superfície lisa e a área exposta à formulação (1,77 cm²) foi submetida à técnica de “*tape stripping*” (HOSMER *et al.*, 2009; HERAI *et al.*, 2007; LOPEZ *et al.*, 2003) para remoção do estrato córneo (EC) usando 16 fitas adesivas (Scotch 750 3M), para cada pele. As fitas foram colocadas em um tubo de ensaio contendo 5 mL de metanol, agitado em vórtex por 2 minutos e posteriormente colocado em lavadora ultrassônica por 30 minutos. A solução foi filtrada em membrana 0,45 µm e avaliada por CLAE para quantificação do fármaco retido no EC.

A pele remanescente (epiderme viável + derme, E+D) foi cortada em tamanhos muito pequenos e colocada em um tubo de centrifuga contendo 5 mL de metanol, agitado em vórtex por 2 minutos, levado ao homogeneizador Turrax[®] na velocidade de 11.000rpm, por um minuto e em seguida para lavadora ultrassônica por 30 minutos. Ao final, filtrou-se em membrana de e 0,45µm e quantificou-se por CLAE.

5. RESULTADOS

5.1. Estudo de incorporação do FLU em GMS e AO isolados.

Para o AO (lipídio líquido), o teste iniciou-se à temperatura ambiente e terminou em 90°C onde o sistema ficou saturado (Tabela 3).

Tabela 3. Solubilidade do FLU em AO

AO (g)	Fluconazol (g)	Fármaco no lipídio (%)	Temperatura (°C)	Resultado
0,99	0,01	1	25	Solubilizou
0,98	0,02	2	25	Solubilizou
0,97	0,03	3	25	Solubilizou
0,96	0,04	4	60	Solubilizou
0,95	0,05	5	60	Solubilizou
0,94	0,06	6	60	Solubilizou
0,93	0,07	6,5	60	Solubilizou
0,92	0,08	7,4	60	Solubilizou
0,91	0,09	8,2	70	Solubilizou
0,90	0,10	9,1	70	Solubilizou
0,89	0,11	10	70	Solubilizou
0,88	0,12	10,7	80	Solubilizou
0,87	0,13	11,5	80	Solubilizou
0,86	0,14	12,3	90	Solubilizou
0,85	0,15	13	90	Solubilizou
0,84	0,16	14	90	Solubilizou
0,83	0,17	14,5	90	Solubilizou
0,82	0,18	15,2	90	Solubilizou
0,81	0,19	15,9	90	Precipitou

Para o GMS (lipídio sólido), a solubilidade começou a 60°C e se seguiu até 90°C (Tabela 4).

Tabela 4. Solubilidade do FLU em GMS

GMS (g)	Fluconazol (g)	Fármaco no lipídio (%)	Temperatura (°C)	Resultado
0,99	0,01	1	60	Solubilizou
0,98	0,02	2	60	Solubilizou
0,97	0,03	3	70	Solubilizou
0,96	0,04	4	70	Solubilizou
0,95	0,05	5	70	Solubilizou
0,94	0,06	6	80	Solubilizou
0,93	0,07	6,5	80	Solubilizou
0,92	0,08	7,4	80	Solubilizou
0,91	0,09	8,2	90	Solubilizou
0,90	0,10	9,1	90	Precipitou

Nos testes de solubilidade individuais, obteve-se a incorporação de 8,25% e 15,25% de FLU no GMS e no AO respectivamente.

5.2. Estudo da incorporação do FLU na mistura GMS/AO.

No ensaio de seleção da proporção de GMS/AO utilizados como fase lipídica dos NLCs, observou-se que a quantidade de FLU incorporada na mistura de lipídios sólidos e líquidos foi maior do que nesses lipídios separadamente e que a mistura contendo a maior quantidade de AO mostrou-se mais efetiva na incorporação do FLU.

Na tabela 5 encontram-se as porcentagens de FLU solubilizado na mistura GMS e AO.

Tabela 5. Porcentagem de FLU solubilizado na mistura GMS/AO

Amostras	Massa total de Fluconazol				Total em 90°C (%)
	solubilizado (g)				
	60°C	70°C	80°C	90°C	
GMS/AO 6:4	0,12	0,22	0,28	0,32	13,79
GMS/AO 7:3	0,11	0,17	0,22	0,29	12,66
GMS/AO 8:2	0,10	0,17	0,24	0,29	12,66
GMS/AO 9:1	0,10	0,17	0,24	0,27	11,89

Conforme demonstrado na Tabela 5, na amostra contendo a proporção de 6:4 de GMS e AO respectivamente foi possível solubilizar maior concentração de FLU. Além disso, o tempo necessário para essa solubilização foi menor quando comparado às proporções de 7:3, 8:2, 9:1. Quando preparadas formulações com maiores quantidades de AO (1:9, 2:8, 3:7, 4:6 e 5:5 de GMS e AO respectivamente), observou-se que não foi possível formar os NLCs, provavelmente para essa combinação de lipídios, a baixa concentração do lipídeo sólido dificultou a formação dos NLCs.

Outro aspecto considerado foi a temperatura, em que é possível observar que o seu aumento levou a maior concentração de FLU solubilizado. Como demonstrado, a quantidade de FLU solubilizada em 90° C foi cerca de 3 vezes a observada na temperatura de 60° C. Apesar de a temperatura de 90°C ter facilitado a solubilidade do FLU em maiores concentrações, não é aconselhável utilizá-la, pois está muito próximo da temperatura de ebulição da água, além disso, as temperaturas entre 75° e 80°C são bem descritas na literatura.

Portanto, para a sequência do trabalho selecionamos a proporção de 6:4 de GMS/AO na temperatura de 80°C.

5.3. Caracterização físico-química dos NLCs

5.3.1. Avaliação do diâmetro médio, índice de polidispersidade e potencial zeta

A técnica de espectroscopia de correlação de fótons determina o coeficiente de difusão das partículas por meio da variação do espalhamento de luz causado pelo movimento Browniano destas (SOUZA, 2011).

O índice de polidispersidade é o parâmetro para definir a distribuição do tamanho das partículas. Amostras com alta distribuição de tamanho de partículas apresentam índice de polidispersão $> 0,7$ (NIDHIN *et al.* 2008).

Uma polidispersidade alta indica que as partículas não estão homogêneas (JUNIOR, 2004).

A maioria das partículas quando em contato com um líquido, adquire uma carga elétrica na sua superfície. Este potencial elétrico é chamado de potencial zeta e é influenciado pelas mudanças na interface com o meio dispersante, em razão da dissociação de grupos funcionais na superfície da partícula ou da adsorção de espécies iônicas presentes no meio aquoso de dispersão (HEURTAULT *et al.*, 2003; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). O potencial zeta é o resultado das cargas elétricas na superfície da partícula, e está relacionado com a estabilidade física do sistema (OBEIDAT *et al.*, 2010).

Um valor elevado de potencial zeta sendo tanto positivo quanto negativo, demonstra que as partículas tendem a repelir uma das outras, podendo indicar boa estabilidade ao sistema, porém se o valor for baixo ou nulo haverá uma tendência de aproximação e possível aglomeração podendo o sistema flocular facilmente (PANDOCHI, 2009).

A Tabela 6 mostra a média dos valores de diâmetro médio das partículas bem como índice de polidispersidade (Pdl) e potencial zeta de NLC com e sem o FLU, armazenados em temperatura ambiente e à 8°C. Todas as análises foram feitas em triplicata.

Tabela 6. Valores de diâmetro médio, índice de polidispersidade e potencial zeta de NLC com e sem o FLU, armazenados em temperatura ambiente e à 8°C

Parâmetro avaliado	Temperatura ambiente		Temperatura de 8°C	
	NLC	NLC_FLU	NLC	NLC_FLU
Diâmetro médio (nm)	328,9	203,7	314,1	218,63
Pdl	0,612	0,443	0,640	0,417
Potencial Zeta (mV)	-29,8	-28,03	-25,8	-28,4

Conforme apresentado na Tabela 6, é possível observar que a adição do FLU levou a uma diminuição do diâmetro médio das partículas e do índice de polidispersidade para ambos os sistemas armazenados a temperatura ambiente e à 8°C. Isso sugere que a presença do fármaco altera a região lipofílica e influencia na organização da matriz lipídica dessas partículas, diminuindo os seus diâmetros (KOLENYAK-SANTOS *et al.* 2014).

Os valores encontrados de Pdl do NLC e NLC_FLU indicam um amplo tamanho de distribuição. Resultados semelhantes foram reportados pelo nosso grupo de pesquisa, Kolenyak-Santos *et al.*, 2014 no qual observou-se um alto valor de Pdl em NLCs contendo praziquantel. Com os resultados apresentados, os autores sugeriram que processo de solidificação favoreceu a transição de fase originando partículas com amplo tamanho de distribuição. Por outro lado, a incorporação do FLU nas partículas reduziram os valores de Pdl, o que pode indicar que o fármaco contribuiu para a estabilização do sistema.

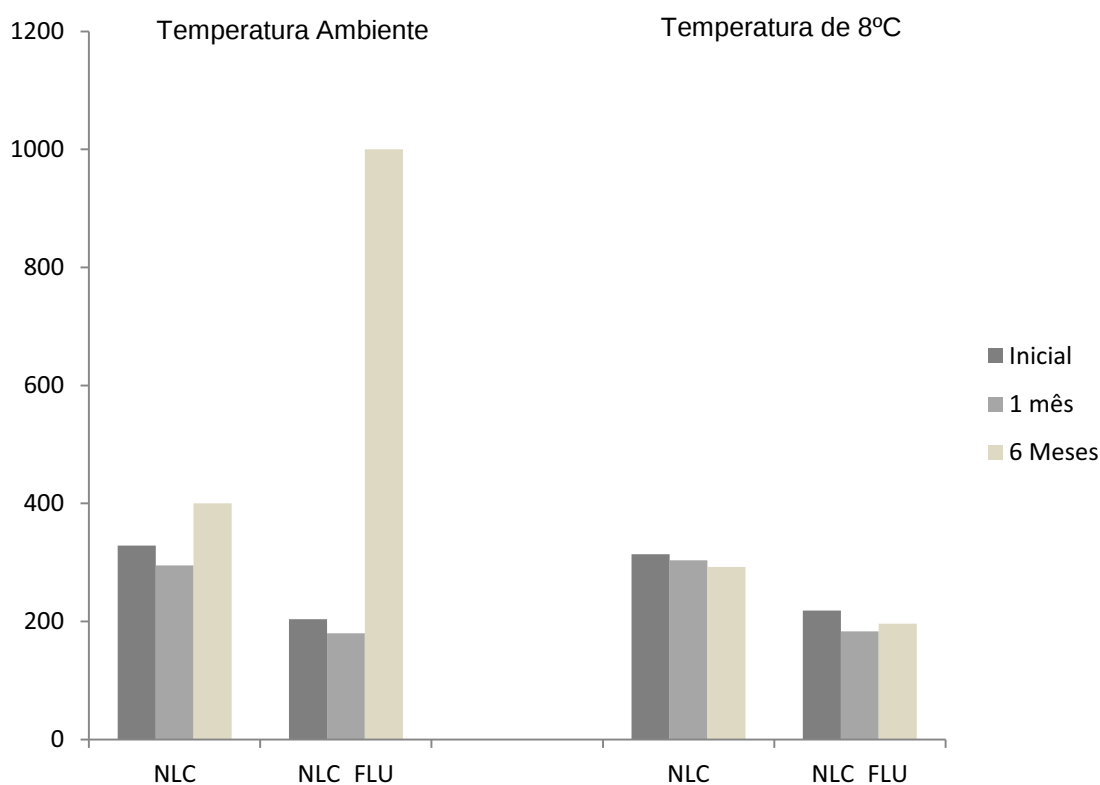
Com os valores altos de potencial zeta encontrados, sugere-se uma boa estabilidade do sistema. De acordo com Barrat 1999, o potencial zeta pode ser usado para determinar o tipo de interação entre a substância ativa e os carreadores, uma vez que o fármaco possa estar encapsulado ou adsorvido na superfície da partícula.

Os resultados encontrados mostraram uma pequena variação no valor de potencial zeta com a adição do FLU nos NLCs, sugerindo que uma parte do fármaco foi encapsulado e outra parte pode estar adsorvido na superfície da partícula.

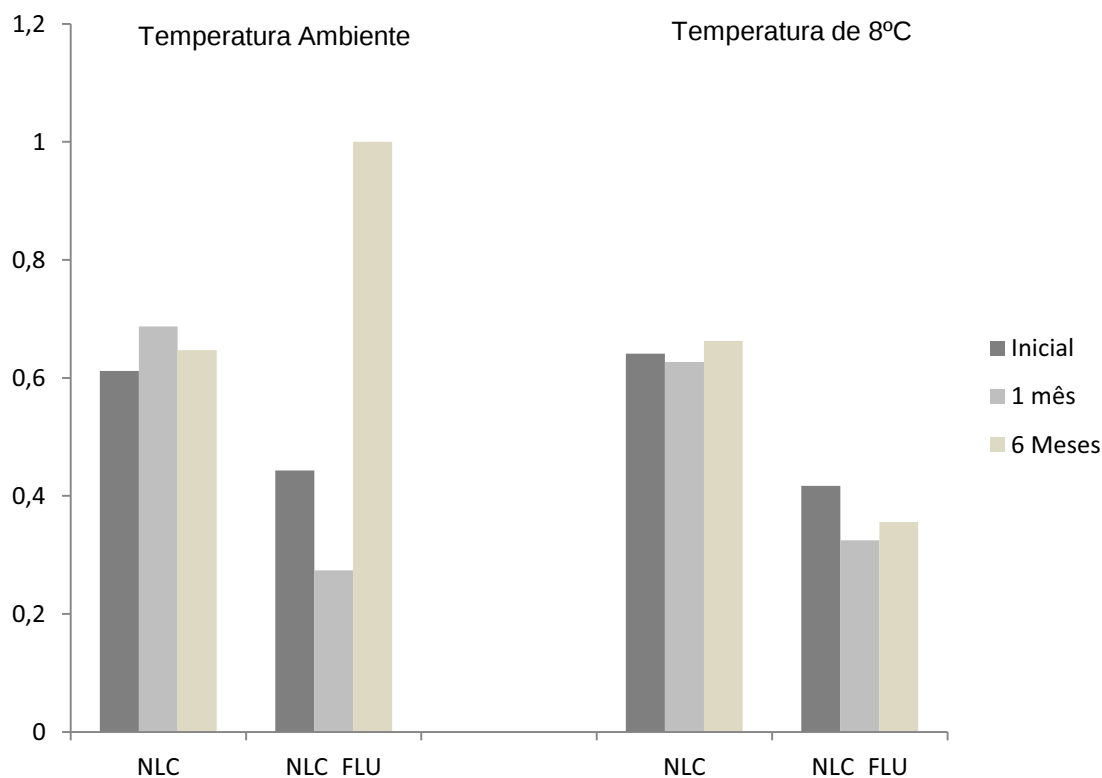
5.3.2. Avaliação da estabilidade dos NLCs

A partir dos valores em triplicata de diâmetro médio, índice de polidispersidade e potencial zeta, foram calculadas suas médias e representados nos gráficos das Figuras 8, 9 e 10.

Figura 8. Avaliação do diâmetro médio(nm) dos NLCs no período de seis meses



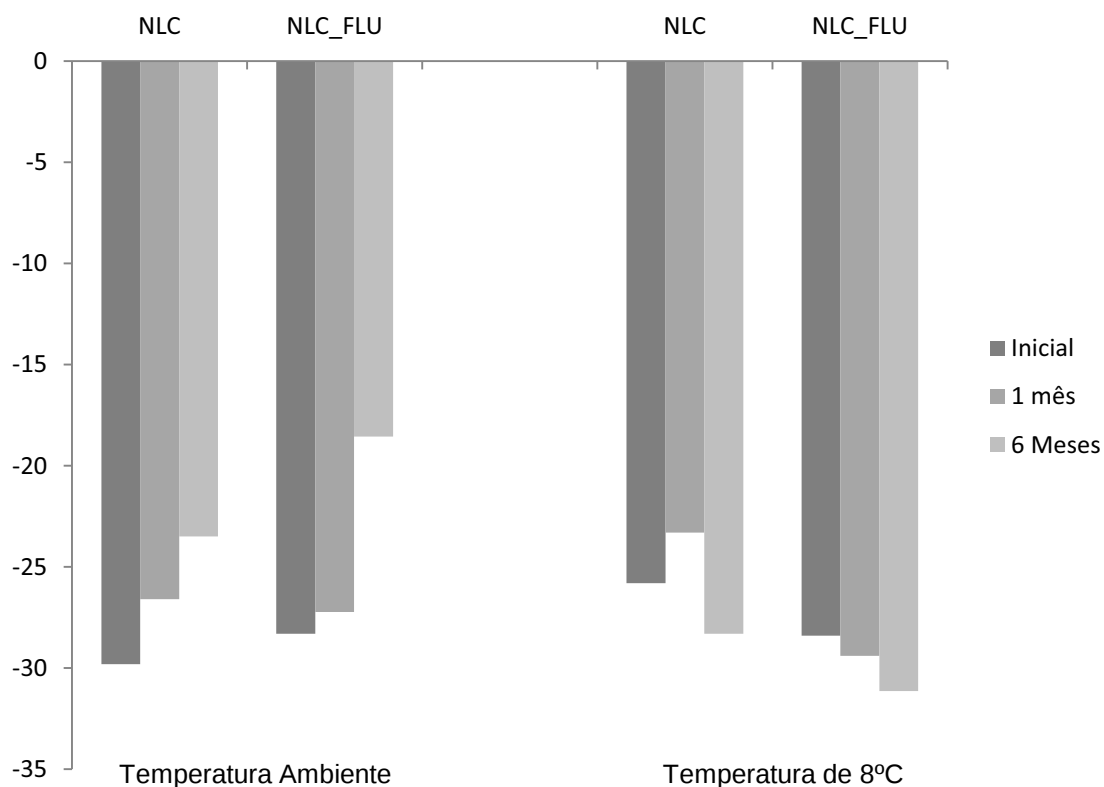
Como apresentado na Figura 8, para as amostras contendo o FLU, verifica-se que o diâmetro médio das partículas é menor em comparação com as NLCs sem o fármaco. No armazenamento a temperatura de 8°C, não houve muita variação de valores de diâmetro médio encontrados, podendo sugerir que o resfriamento favoreceu a estabilidade de ambos os NLCs. Por outro lado, os sistemas armazenados a temperatura ambiente, foram estáveis até o primeiro mês, porém observou-se uma instabilidade após o período de seis meses, o que pode ser notado pelo alto valor de diâmetro médio encontrado principalmente na amostra NLC_FLU, que atinge 1µm.

Figura 9. Avaliação do Pdl dos NLCs no período de seis meses

Na Figura 9, observou-se que, o Pdl do sistema NLC_FLU armazenado em temperatura de 8°C foi menor e permaneceu mais estável durante os seis meses com valores entre 0,325 e 0,417 , em comparação com NLC_FLU armazenado em temperatura ambiente, 0,274 e 1,0 e com os outros sistemas sem o FLU com valores entre 0,612 e 0,687. Esses resultados podem sugerir que o fármaco e o resfriamento contribuíram para a homogeneidade e estabilidade do sistema.

Os resultados de potencial zeta sugerem que os NLCs apresentaram estáveis durante o período de seis meses, com valores entre -23,5mV e -29,8mV, porém essa estabilidade é favorecida com a adição do fármaco e o armazenamento à temperatura de 8°C, como demonstram os valores de -28,4mV e -31,13mV para NLC_FLU, conforme apresentado na Figura 10.

Figura 10. Avaliação do potencial zeta (mV) dos NLCs no período de seis meses



5.3.3. Avaliação morfológica dos NLCs por microscopia eletrônica de varredura de efeito de campo (MEV-FEG)

A microscopia eletrônica de varredura de efeito de campo foi realizada a fim de verificar a morfologia dos NLCs. Conforme ilustrado nas Figuras 11 e 12, todos os NLCs apresentaram uma morfologia esférica e diâmetros em escala nanométrica, esses resultados estão conforme os descritos por SHAH 2007 (SHAH, *et al.* 2007).

Figura 11. Morfologia dos NLCs sem FLU por microscopia eletrônica de varredura de efeito de campo.

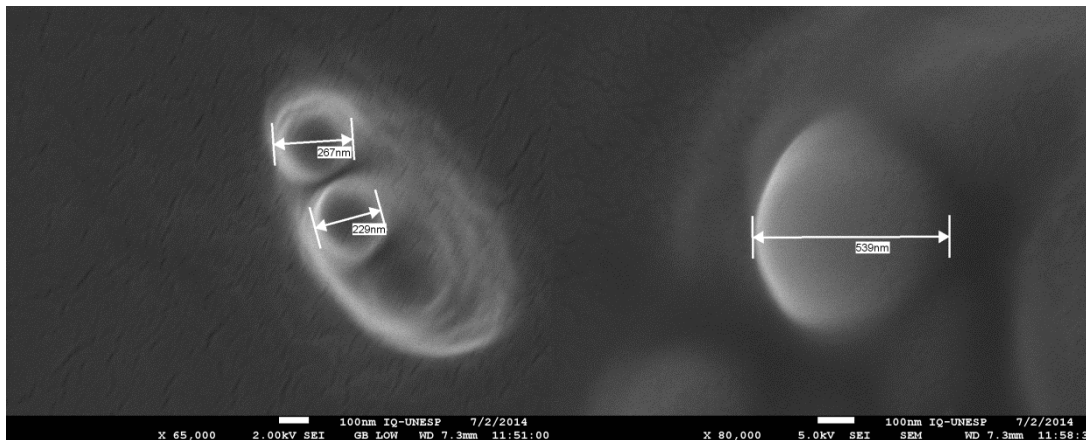
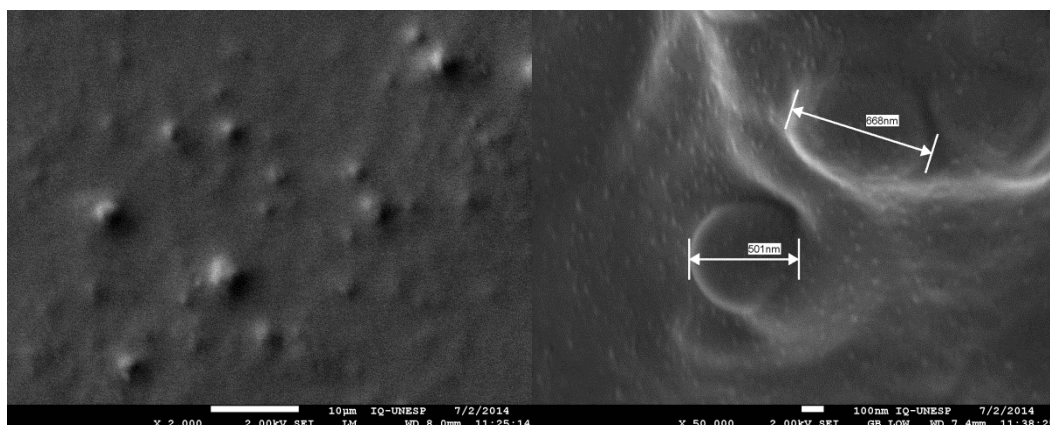


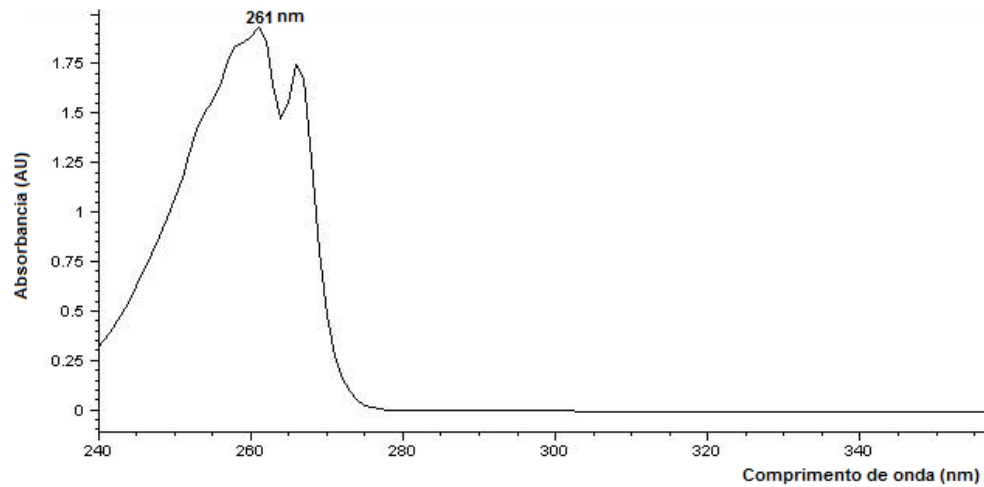
Figura 12. Morfologia dos NLCs com FLU por microscopia eletrônica de varredura de efeito de campo.



5.4. Validação da metodologia analítica para determinação de FLU por espectrometria ultravioleta.

A Figura 13 mostra o espectro de absorção máxima do FLU em álcool metílico em que é possível confirmar que o pico de absorção máxima foi de 261nm.

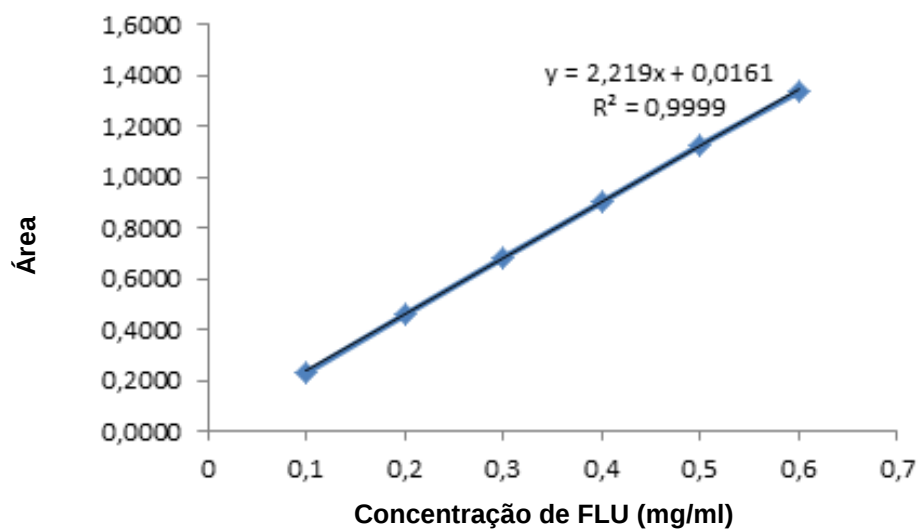
Figura 13. Espectro de absorção do FLU em álcool metílico



5.4.1. Linearidade

A linearidade do método de quantificação do FLU foi determinada através da regressão linear da curva analítica pela equação dos mínimos quadrados onde, $y = 2,219x + 0,0161$ e o coeficiente de determinação foi $r^2 = 0,9999$ (Figura 14). O critério mínimo aceitável do coeficiente de determinação (r^2) deve ser igual 0,99 (ANVISA, 2003).

Figura 14. Curva analítica do FLU em metanol no comprimento de onda de 261nm



Os resultados estão em conformidade como preconizado pela ANVISA, (que sugere $r^2=0,99$) indicando uma boa linearidade para o método desenvolvido.

5.4.2. Precisão

É a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra (ANVISA, 2003; BRITISH PHARMACOPEIA, 2010; ICH, 2005).

Para verificar a precisão, realizou-se ensaios de repetibilidade, (intra-corrída) e precisão intermediária (inter-corrída), utilizando três níveis de concentração, sendo, a baixa (0,10mg/mL), média (0,30mg/mL) e alta (0,60mg/mL), realizadas em triplicata e com três replicas para cada concentração, conforme Tabela 7.

Tabela 7. Precisão intra-corrída

Concentração de FLU	Absorbância (261nm)			Média	Desvio Padrão	Coeficiente de Variação (%)
	N1	N2	N3			
0,1mg/ml	0,2361	0,2364	0,2313	0,2346	0,0029	1,2199
0,3mg/ml	0,6870	0,6822	0,6829	0,6840	0,0026	0,3791
0,6mg/ml	1,3475	1,3419	1,3541	1,3478	0,0061	0,4531

A Tabela 7 mostra que o CV entre as amostras foi baixo, sendo que o maior valor foi de 1,21% para a menor concentração. De acordo com a ANVISA, o CV não deve ser superior a 5% nestes ensaios (ANVISA, 2003). O método mostrou-se, portanto preciso.

A Tabela 8 mostra os resultados obtidos para o ensaio de precisão intermediária, realizada em três dias consecutivos.

Tabela 8. Precisão inter-corrida

	Concentração de FLU	Absorbância (261nm)			Média	Desvio Padrão	Coeficiente de Variação (%)
		N1	N2	N3			
1º dia		0,2361	0,2364	0,2313	0,2346	0,0029	1,2199
2º dia	0,1mg/ml	0,2400	0,2386	0,2409	0,2398	0,0012	0,4833
3º dia		0,2267	0,2272	0,2301	0,2280	0,0018	0,8052
1º dia		0,6870	0,6822	0,6829	0,6840	0,0026	0,3791
2º dia	0,3mg/ml	0,6907	0,6855	0,6882	0,6881	0,0026	0,3779
3º dia		0,6688	0,6795	0,6683	0,6722	0,0063	0,9412
1º dia		1,3475	1,3419	1,3541	1,3478	0,0061	0,4531
2º dia	0,6mg/ml	1,3338	1,3601	1,3680	1,3540	0,0179	1,3225
3º dia		1,3185	1,3247	1,3320	1,3251	0,0068	0,5100

Os dados apresentados nas Tabelas 7 e 8 mostram que o método é preciso para a quantificação do FLU, pois observou-se que os valores de CV obtidos estão dentro do preconizado pela ANVISA (<5%).

5.4.3. Limite de detecção e limite de quantificação

O limite de detecção é a menor quantidade de analito em uma amostra que pode ser determinado. Limite de quantificação é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão (ANVISA, 2003, ICH, 2005, BRITISH PHARMACOPOEIA, 2010).

A Tabela 9 mostra os valores do limite de detecção e de quantificação.

Tabela 9. Limite de detecção e Limite de quantificação

Concentração	Inclinação da curva (a)	Intercepto (b)	Desvio Padrão	Limite de detecção (mg/ml)	Limite de quantificação (mg/ml)
0,1 mg/ml					
0,3 mg/ml	2,215233	0,0142	0,003676	0,005475	0,016592
0,6 mg/ml					

5.4.4. Exatidão

A exatidão (Tabela 10) foi avaliada usando as mesmas concentrações usadas no ensaio de Precisão, tendo os resultados analisados pelo percentual de recuperação da amostra, expresso pela relação entre as concentrações médias e teóricas.

Tabela 10. Exatidão

Concentração teórica	Concentração real	DP	CV	Recuperação (%)
0,1mg/ml	0,1130	0,0029	1,2199	113
0,3mg/ml	0,3144	0,0026	0,3791	104
0,6mg/ml	0,6122	0,0061	0,4531	102

Os dados mostram forte acordo entre os valores experimentais e teóricos, indicando que o método é exato para o objetivo proposto.

5.4.5. Robustez

Neste ensaio, avaliou-se a interferência do fabricante do solvente (metanol) na quantificação/recuperação do fármaco.

Tabela 11. Robustez

Parâmetro	Abs	Desvio Padrão	C.V
JT BAKER®	0,6704	0,0073	1,0940
PA-ACS Carlo ERBA®	0,6504	0,0146	2,2491

Verificou-se que mesmo variando o fabricante do solvente utilizado no método, não houve interferência significativa nos valores de absorbância do fármaco. Portanto, o método pode ser considerado robusto.

5.4.6. Determinação da eficiência de encapsulação

A Tabela 12 apresenta os dados obtidos para a eficiência de encapsulação dos NLCs.

Tabela 12. Eficiência de encapsulação dos NLCs

Amostra	Concentração teórica (mg)	Concentração fármaco determinado (mg)	Eficiência de Encapsulação (%)
NLC_FLU	500	15,75882	96,84

Os resultados obtidos foram satisfatórios mostrando uma alta eficiência de encapsulação na matriz dos NLCs. Esse resultado pode ter sido favorecido pela interação do fármaco com a matriz do sistema.

5.5. Estudo de liberação, permeação e retenção cutânea

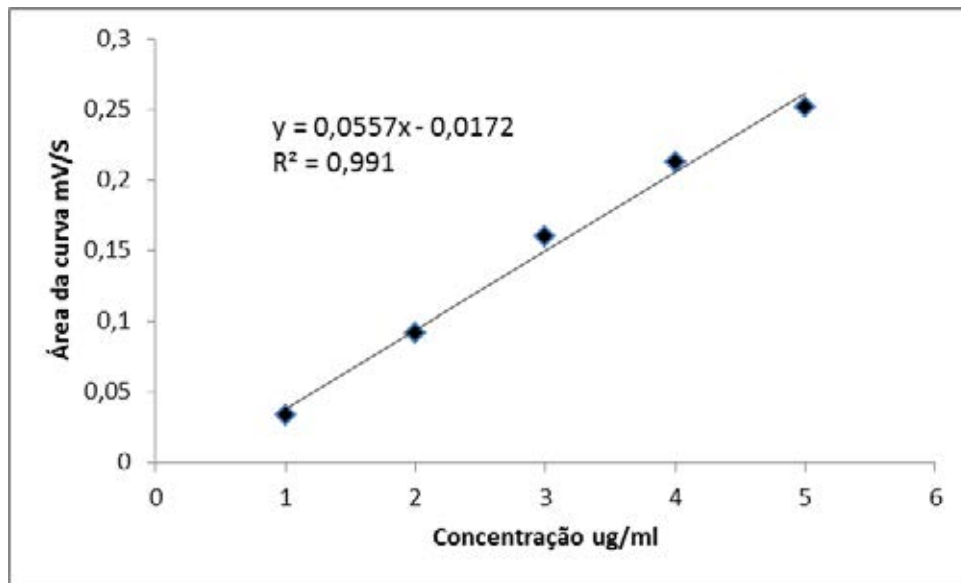
O estudo de liberação, permeação e retenção cutânea foi realizado conforme descrito nos itens 4.7.2. e 4.7.3.

5.5.1. Curva analítica de FLU em tampão fosfato 0,01M pH 7,4

A linearidade do método de quantificação do FLU por CLAE, foi determinada através da construção da curva analítica do FLU em tampão fosfato de potássio monobásico 0,01M pH 7,4 (Figura 15). A partir dos valores das áreas encontradas nos picos foram calculadas as médias, utilizadas para a construção da curva analítica *versus* concentração. O desvio padrão para a inclinação e o intercepto da curva foi calculado.

Os resultados encontrados foram utilizados nos ensaios de liberação *in vitro* e permeação cutânea.

Figura 15. Curva analítica do FLU em tampão fosfato de potássio 0,01M pH 7,4.

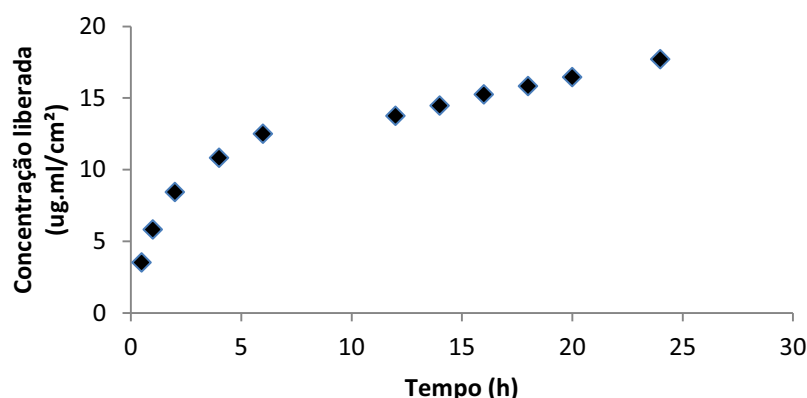


A curva analítica apresentou-se linear, com equação $y = 0,0557x - 0,0172$ e coeficiente de determinação de 0,991, demonstrando uma linearidade do método de acordo com ANVISA, 2003.

5.5.2. Liberação *in vitro*

A avaliação da liberação *in vitro* de formulações permite analisar o perfil de liberação do fármaco, isto pode estar relacionado com a saída do mesmo da matriz farmacêutica (PRAÇA *et al.*, 2010).

O teste de liberação *in vitro* foi realizado para os NLCs acrescido de 0,5% de FLU. A Figura 16 apresenta o perfil de liberação da formulação.

Figura 16. Perfil de liberação do FLU incorporado nos NLCs

De acordo com a Figura 16, nas primeiras seis horas são liberadas as maiores concentrações de fármaco, ocorrendo uma diminuição da taxa de liberação nas demais horas, porém essa liberação continua crescente, sendo observada uma concentração de aproximadamente $17,7\mu\text{g}/\text{cm}^2$ no final de 24 horas, mostrando que o sistema é capaz de prolongar a liberação do fármaco.

A Tabela 13 mostra a porcentagem de FLU liberado do NLC por um período de 24 horas.

Tabela 13. Quantidade de FLU liberado em sua forma livre e encapsulado nos NLCs após 24h de experimento

Amostra	Fármaco Inicial ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Q real ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	% Liberação
PG_FLU	1694,92	1601,70	94,50
NLC_FLU	1500	17,708	1,180

Dados obtidos pelo nosso grupo de pesquisa (SILVA, 2011) tem demonstrado uma liberação de 94,50% de FLU em propilenoglicol (PG) (Tabela 13) testado como controle. Com os resultados apresentados, podemos prever que os NLCs são capazes de prolongar a liberação do FLU.

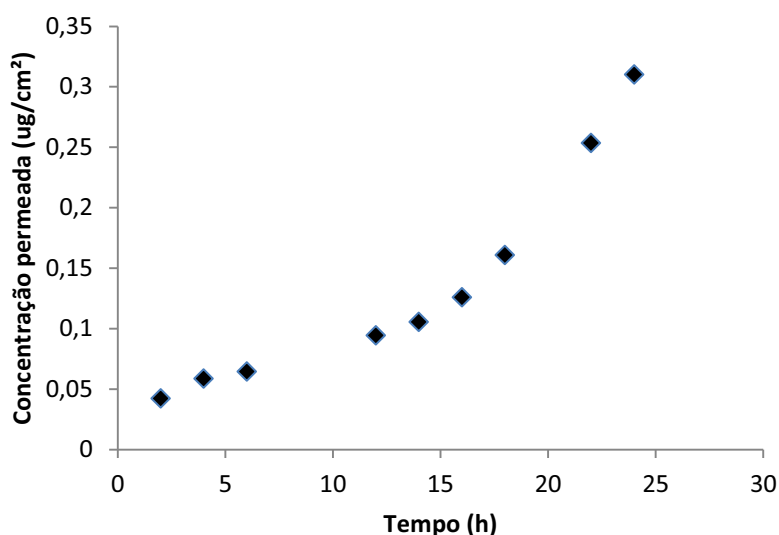
5.5.3. Permeação e retenção cutânea *in vitro*

Os ensaios de permeação e retenção *in vitro* foram realizados com o intuito de avaliar a interação do sistema com as camadas da pele.

Durante a difusão do fármaco, ele pode ficar retido no estrato córneo, ou na região que engloba a epiderme e derme ou pode também permear por todas as camadas da pele (SILVA, 2009).

Esses ensaios foram realizados com as mesmas condições do ensaio de liberação, com exceção da membrana utilizada e os tempos de coleta. Os resultados encontrados para a permeação cutânea estão ilustrados na Figura 17.

Figura 17. Perfil de permeação cutânea do FLU



O tamanho das partículas é muito importante para a permeação cutânea. Dependendo do tamanho, pode ocorrer uma permeação seletiva através dos ductos foliculares ou retenção sobre a superfície cutânea (ALVAREZ-ROMÁN *et al.* 2004). Além disso, os NLCs podem interagir com o estrato córneo, devido à sua composição lipídica, facilitando a permeação do fármaco através da pele (LEE, 2000).

Conforme demonstrado na Figura 17, o perfil de permeação cutânea se mostra crescente durante as 24 horas de experimento, sugerindo que ainda há uma permeação do fluconazol após esse período. O tamanho nanométrico e a

composição lipídica dos NLCs podem ter influenciado positivamente nesse resultado.

As Tabelas 14 e 15 mostram os resultados para a permeação e retenção cutânea do fluconazol.

Tabela 14. Quantidade de fluconazol permeado na pele

Amostra	Q real ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)
NLC_FLU	0,3091

Tabela 15. Quantidade do fluconazol retido nas camadas da pele

Camada da pele	Concentração retida ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)
Estrato Córneo	0,004518
Derme e epiderme	0,005682

De acordo com a Tabela 15, pode-se observar que houve uma concentração de aproximadamente $0,0102 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de fármaco retido nessas camadas após 24 horas enquanto que a concentração permeada na pele foi de aproximadamente $0,0391 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ sendo maior do que a retida.

6. DISCUSSÃO

As dermatomicoses são infecções fúngicas causadas por inúmeras espécies de fungos, cada qual com a sua patogenicidade, sendo que algumas são consideradas superficiais, como é o caso das candidíases (*Candida* sp), e outras profundas, como a esporotricose causada pelo fungo *Sporothrix schenckii* que pode até mesmo atingir a circulação sistêmica e outros órgãos.

Para o tratamento dessas doenças, é preciso pensar não somente no fármaco de escolha, mas também na estratégia do sistema de liberação farmacêutica, visando conciliar a patogenicidade que cada doença possui, com as propriedades biofarmacêuticas que esses sistemas podem oferecer.

Considerando isso, pode-se dizer que a retenção ou permeação do fármaco podem ser interessantes dependendo do tipo de infecção fúngica em questão.

Nesse trabalho, optou-se pelo desenvolvimento de NLCs ao invés das SLNs, devido aos resultados do ensaio de seleção de lipídios e de solubilidade do FLU na mistura.

O desenvolvimento dos NLCs foi possível com a técnica de homogeneização a alta velocidade e cisalhamento, no qual foram obtidos NLCs com escala nanométrica, com amplo espectro de distribuição e relativamente estáveis. A utilização de outras técnicas como homogeneização em alta pressão à quente ou à frio por exemplo, deve ser considerada na tentativa de se obter partículas com diâmetro médio e índice de polidispersidade de valores menores aos encontrados neste trabalho.

Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que os NLCs desenvolvidos e analisados podem ser utilizados para a incorporação de fluconazol, visando aumentar sua eficácia terapêutica.

7. CONCLUSÃO

Foi possível incorporar o FLU em maior quantidade na mistura de lipídios (GMS/AO) do que quando comparado com esses componentes isolados, sendo então escolhidos para compor a fase lipídica dos NLCs.

Foram encontrados NLCs contendo ou não o FLU com morfologia esférica e observou-se uma diminuição do diâmetro médio e Pdl nos NLCs que continham o fluconazol.

Os sistemas NLC_FLU que foram armazenados à 8°C se apresentaram mais estáveis durante os seis meses em comparação com NLC sem FLU armazenados à temperatura ambiente, sugerindo que o armazenamento à baixas temperaturas seja interessante para garantir a estabilidade desses sistemas.

Para a validação da metodologia analítica todos os parâmetros empregados foram satisfatórios e estão em conformidade com o preconizado pela ANVISA e ICH, indicando que o método de espectrofotometria na região do ultravioleta é eficaz para a quantificação do FLU.

Os NLCs apresentaram eficiência de encapsulação de 96,84% indicando alta encapsulação do fármaco pelo sistema.

O ensaio de liberação *in vitro* mostrou que os NLCs apresentaram uma baixa porcentagem de liberação do fármaco em 24 horas, apresentando um perfil de liberação prolongado, estando de acordo com o objetivo do trabalho.

O ensaio de permeação e retenção cutânea *in vitro* demonstraram uma maior quantidade de fluconazol permeada e uma menor quantidade retida. O perfil de permeação permaneceu crescente durante as 24 horas, estando de acordo com a cinética de liberação encontrada.

Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que o sistema contendo AO, GMS, PC, Poloxamer 407 e fluconazol, se mostrou potencial para administração via cutânea.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANVISA. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos conforme o anexo desta resolução. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 02 jun. 2003.

ALVAREZ-ROMÁN, R., NAIK, A., KALIA, Y. N., GUY, H. R., FESSI, H. Skin penetration and distribution of polymeric nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, 99, 53-62. 2004

BRITISH PHARMACOPEIA. London: The Stationery Office, 2010.

BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. (Ed.) **Goodman & Gilman: As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 11 ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2007.

CAMPANHA, A. M.; TASCA, R. S.; SVIDZINSKI, T. I. E. Dermatomicoses: Frequência, Diagnóstico Laboratorial e Adesão de Pacientes ao Tratamento em um Sistema Público de Saúde. **Lat. Am. J. pharm.**, v. 26, p. 442-8, 2007.

CHEN, C.; C.; TSAI, T.; H.; HUANG, Z.; R., FANG, Y. J. Effects of lipophilic emulsifiers on the oral administration of lovastatin from nanostructured lipid carriers: Physicochemical characterization and pharmacokinetics. **Eur. J.Pharm. Biopharm.** v. 74, p. 474-482, 2010.

COELHO, H. et al. Análise químico-farmacêutica do fluconazol e especialidade farmacêutica cápsula. **Rev. Bras. Cienc. Farm.** vol.40, n.2, pp. 235-246, 2004.

DASH, A.K.; ELMQUIST, W.F. Fluconazole. In: BRITTAIN, H.G. Analytical profiles of drug substances and excipients. San Diego: Academic Press, v.27, p.67-113, 2001.

FANG, J.-Y.; FANG, C.-L.; LIU, C.-H.; SU, Y.-H. Lipid nanoparticles as vehicles for topical psoralen delivery: Solid lipid nanoparticles (SLN) versus nanostructured lipid carriers (NLC). **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 70, p. 633-640, 2008.

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

HADGRAFT, J. Skin, the final frontier. **Int. J. Pharm.**, v. 224, p. 1-18, 2001.

HAN, F.; LI, S.; YIN, R.; LIU, H.; XU, L. Effect of surfactants on the formation and characterization of a new type of colloidal drug delivery system: Nanostructured lipid carriers. **Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Asp.**, v. 315, p. 210-216, 2008.

HERAI, H.; GRATIERI, T.; THOMAZINE, J. A.; BENTLEY, M. V. L. B.; LOPEZ, R. F. V. Doxorubicin skin penetration from monoolein-containing propylene glycol formulations. **Int. J. Pharmaceutic.**, v. 329, n. 1-2, p. 88-93, 2007.

HEURTAULT, B.; SAULNIER, P.; PECH, B.; PROUST, J.-E.; BENOIT, J.-P. Physico-chemical stability of colloidal lipid particles. **Biomaterials**, v. 24, p. 4283–4300, 2003.

HOLLER, S.; VALENTA, C. Effect of selected fluorinated drugs in a “ringing” gel on rheological behavior and skin permeation. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.66, p.120–126, 2007.

HOSMER, J.; REED, R.; VITÓRIA, M.; BENTLEY, L.B.; NORNOO, A.; LOPES, L.B. Microemulsions Containing Medium-Chain Glycerides as Transdermal Delivery Systems for Hydrophilic and Hydrophobic Drugs. **American Association of Pharmaceutical Scientists: Pharmaceutical Sciences Technology**, v. 10, n. 2, p. 589-596, 2009.

HU, F.-Q.; ZHANG, Y.; DU, Y.-Z.; YUAN, H. Nimodipine loaded lipid nanospheres prepared by solvent diffusion method in a drug saturated aqueous system. **Int. J. Pharm.**, v. 348, p. 146-152, 2008.

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

JANNIN, V.; MUSAKHANIAN, J.; MARCHAUD, D. Approaches for the development of solid and semi-solid lipid-based formulations. **Adv. Drug Delivery.**, v.60 p. 734-746 2008.

JOSHI, M.; PATHAK, S.; SHARMA, S.; PATRAVALE, V. Design and *in vivo* pharmacodynamic evaluation of nanostructured lipid carriers for parenteral delivery of artemether: Nanoject. **Int. J. Pharm.**, v. 364, p. 119-126, 2008.

JUNIOR, S.V.C. Técnicas de caracterização de polímeros, São Paulo, Artliber, 2004

JUNQUEIRA, L. C. & CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 12ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

KLEIN, T. **Desenvolvimento de sistemas nanoestruturados estabilizados com álcool cetílico etoxilado e propoxilado contendo fluconazol potencialmente ativo contra esporotricose**. Araraquara, Dissertação (Mestrado) 2007. Faculdade de Ciencias Farmacêuticas. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. UNESP-SP, 2007.

KOLENYAK-SANTOS, F. **Desenvolvimento e caracterização de carreadores lipídicos nanoestruturados contendo praziquantel**. Tese (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2011.

KOLENYAK-SANTOS, F., GARNERO, C., OLIVEIRA, R. N., et al. Nanostructured lipid carriers as a strategy to improve the in vitro schistosomiasis activity of praziquantel. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**. 2014;14:1–12.

KRISTL, J.; VOLK, B.; AHLIN, P.; GOMBAČ, K.; ŠENTJURC, M. Interactions of solid lipid nanoparticles with model membranes and leukocytes studied by EPR. **Int. J. Pharm.**, v. 256, p. 133–140, 2003.

KUMAR, V. V.; CHANDRASEKAR, D.; RAMAKRISHNA, S.; KISHAN, V.; RAO, Y. M.; DIWAN, P. V. Development and evaluation of nitrendipine loaded solid lipid nanoparticles: Influence of wax and glyceride lipids on plasma pharmacokinetics. **Int. J. Pharm.**, v. 335, p. 167-175, 2007.

LACAZ, C. S., E. PORTO, J. E. C. MARTINS, E. M. HEINS-ACCARI & N. T. DE MELO. **Tratado de micologia médica**, 5. Ed. São Paulo: Sarvier, p. 252-340, 2002.

LEE, J.; KELLAWAY, I.W. Buccal permeation of [D-Ala², D-Leu⁵] enkephalin from liquid crystalline phases of glyceryl monooleate. **Int. J. Pharm.**, v.195, p. 35-38, 2000.

LEHMANN, L.; KEIPERT, S.; GLOOR, M. Effects of microemulsion on the stratum corneum and hydrocortisone penetration. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 52, p. 129-136, 2001.

LIN, X.; LI, X.; ZHENG, L.; YU, L.; ZHANG, Q.; LIU, W. Preparation and characterization of monocaprates nanostructured lipid carriers. **Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Asp.** v. 311, p. 106-111, 2007.

LIU, C. H.; WU, T.C. Optimization of nanostructured lipid carriers for lutein delivery. **Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Asp.** v. 353, P. 149-156, 2010.

LOPEZ, R.F.V.; BENTLEY, M.V.L.B.; DELGADO-CHARRO, M. B.; GUY, R. H. Optimization of aminolevulinic acid delivery by iontophoresis. **Journal of Controlled Release**, n. 14, p. 65-70, 2003.

LUZ, G. M., **Desenvolvimento de sistemas nanoestruturados estabilizados com álcool cetílico etoxilado e propoxilado para administração cutânea**. Trabalho de conclusão de curso – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2011.

MACHET, L.; BOUCAUD, A. Phonophoresis: efficiency, mechanisms and skin tolerance. **Int. J. Pharm.**, v. 243, p. 1-15, 2002.

MAINARDES, R. M.; URBAN, M. C. C.; CINTO, P. O.; CHAUD, M. V.; EVANGELISTA, R. C.; GREMIÃO, M. P. D. Colloidal carriers for ophthalmic drug delivery. **Curr. Drug Targets**, v. 6, n. 2, p. 363-371, 2005.

MAINARDES, R. M.; URBAN, M. C. C.; CINTO P. O.; CHAUD, M. V.; EVANGELISTA, R. C.; GREMIÃO, M. P. D. LIPOSSOMES AND MICRO/NANOPARTICLES AS COLLOIDAL CARRIERS FOR NASAL DRUG DELIVERY. **CUR DRUG DELIVERY.**, V. 3, P. 275-285, 2006.

MARTINS, M.R.F.M; VEIGA, F. Promotores de permeação para a liberação transdérmica de fármacos: uma nova aplicação para as ciclodextrinas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. Portugal, v. 38, n. 1, p. 33-54, 2002.

MOURÃO, S.C.; COSTA, P.I.; SALGADO, H.R.M.; GREMIÃO, M.P.D. Improvement of antischistosomal activity of praziquantel by incorporation into phosphatidylcholinecontaining liposomes. **Int. J. Pharm.**, v. 295, p. 157-162, 2005.

MÜLLER, R. H.; MÖSCHWITZER, J.; BUSHRAB, F. N. Manufacturing of nanoparticles by milling and homogenization techniques. In: Nanoparticle technology for drug delivery. Taylor & Francis, v. 159, p. 21- 51, 2006.

MÜLLER, R. H. Cetyl palmitate-based NLC for topical delivery of Coenzyme Q10 – Development, physicochemical characterization and in vitro release studies **Eur J Pharm Biopharm**. v. 67 p. 141-148 2007.

MÜLLER, R. H.; RUNGE, S. A.; RAVELLI, V.; THÜNEMANN, F.; MEHNERT, W.; SOUTO, E. B. Cyclosporine-loaded solid lipid nanoparticles (SLN[®]): Drug–lipid physicochemical interactions and characterization of drug incorporation. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 68, p. 535-544, 2008.

NIDHIN, M., INDUMATHY, R., SREERAM, K.J., NAUR, B.U. Synthesis of iron oxide nanoparticles of narrow size distribution on polysaccharide templates. **Bulletin of Material Science** 31, 93-96, 2008.

OBEIDAT, W. M.; SCHWABE, K.; MÜLLER, R. H.; KECK, C. M. Preservation of nanostructured lipid carriers (NLC). **Eur J Pharm Biopharm.** v. 76 p. 56 – 67, 2010.

OECD 428. **OECD Guideline for Testing of Chemicals. Skin Absorption: *In vitro* Method**, 2004.

O'NEIL, M.J. et al. **The Merck Index – An Encyclopedic of Chemicals, Drugs and Biologicals**, 14th Ed. New Jersey: Merck & Co, 2006.

PARDEIKE, J.; HOMMOS, A.; MÜLLER, R. H. Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products **Int. J. Pharm.**, v. 366, p. 170-184, 2009.

PARK, J.S.; YU, K.A.; KANG, T.H.; KIM, S.; SUH, Y.G. Discovery of novel indazole-linked triazoles as antifungal agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v.17, p.3486–3490, 2007.

PANDOCHI, L. **Estudo do com portamento coloidal de suspensão de fibra de celulose, carbonato de cálcio, amido catiônico: variação da força iônica e do pH**. Tese (Mestrado) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara -SP. 2009.

PEREIRA, D. G. IMPORTÂNCIA DO METABOLISMO NO PLANEJAMENTO DE FÁRMACOS. **Quim. Nova.**, v. 30, p. 171-177, 2007.

PRAÇA, F. S. G. **Liberção e permeação *in vitro* de produtos transdérmicos: um estudo metodológico de aparatos e de condições experimentais.** Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Departamento de Medicamentos e Cosméticos, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto – SP. 2010.

PROW, T. W.; GRICE, J. E.; LIN, L. L.; FAYE, R.; BUTLER, M.; BECKER, W.; WURM, E. M. T.; YOONG, C.; ROBERTSON, T. A.; SOYER, H. P.; ROBERTS, M. S. Nanoparticle and microparticles for skin drug delivery. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 63, p. 470-491, 2011.

RADOMSKA-SOUKHAREV, A. Stability of lipid excipients in solid lipid nanoparticles. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 59, p. 411–418, 2007.

REX, J. H. O desafio das infecções fúngicas no século XXI. Disponível em: <http://ccih.med.med.br/fungos21.html>. Acessado em 15 de maio de 2014.

RIGON, R. B., **Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas lipídicas sólidas para administração cutânea de trans-resveratrol.** Tese (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2013.

ROSSI, C. G. F. T.; DANTAS, T. N. de C.; NETO, A. A. D.; MACIEL, M. A.M. Tensoativos: uma abordagem básica e perspectivas para aplicabilidade industrial. **Revista Universidade Rural**, Série Ciências Exatas e da Terra, Seropédica, RJ: EDUR, v. 25, n.1-2, p. 73-85, 2006.

SCCP 0970/06. Opinion on Basic Criteria for In vitro assessment of dermal absorption of cosmetic ingredients. Scientific Committee on Consumer Products, Adapted by the SCCP, March 28th, 2006.

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

SHAH, J.S.; SADHALE, Y.; CHILUKURI, D.M. Cubic phase gels as drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Review**, Arlington, v. 47 p. 229–250, 2001.

SIZENANDO NETO, D.; SVIDZINSKI, T. I. E. Antifúngicos disponíveis para o tratamento das dermatomicoses. **Revista de Ciências da Saúde.**, v. 2, n. 1, 2002.

SILVA, A. C.; SANTOS, D.; FERREIRA, D. C.; SOUTO, E. B. Minoxidil-loaded nanostructured lipid carriers (NLC): characterization and rheological behaviour of topical formulations. **Pharmazie**, v. 64, n. 3, p. 177-182, 2009.

SILVA, H. R. **Sistemas nanoestruturados estabilizados com álcool cetílico etoxilado e propoxilado contendo fluconazol potencialmente ativo contra dermatomicoses**. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas), - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2011.

SOUTO, E. B.; WISSING, S. A.; BARBOSA, C. M.; MÜLLER, R.H. Development of a controlled release formulation based on SLN and NLC for topical clotrimazole delivery. **Int. J. Pharm.**, v. 278, p. 71–77, 2004.

SOUTO, E. B.; MÜLLER, R. H. Lipid Nanoparticles (SLN and NLC) for Drug Delivery. In: *Nanoparticles for Pharmaceuticals Applications*, ed. Copyright, cap.5, p. 103-122, 2007.

SOUZA, A. L. R. **Avaliação do efeito do praziquantel veiculado em dispersões lipídicas no tratamento camundongos infectados com *Scistosoma mansoni***. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2008.

TAN, S.W.; BILLA, N. ROBERTS, C.R.; BURLEY, J. C. Surfactant effects on the physical characteristics of Amphotericin B-containing nanostructured lipid **Physicochem. Eng. Aspects.**, 372, p.73-79, 2010.

TEERANACHAIDEEKUL, V.; SOUTO, E. B.; JUNYAPRASERT, V. P.;MÜLLER, R. H. Cetyl palmitate-based NLC for topical delivery of Coenzyme Q10 – Development, physicochemical characterization and in vitro release studies *Eur J Pharm Biopharm.* v. 67 p. 141-148 2007.

WALTERS, K; ROBERTS, M. S. The structure and function of skin. In: **Dermatologic and transdermal formulations**. Walters, K: Marcel Dekker; p. 1-41, 2002.

ZHANG, N.; PING, Q.; HUANG, G.; XU, W.; CHENG, Y.; HAN, X. Lectinmodified solid lipid nanoparticles as carriers for oral administration of insulin. **Int. J. Pharm.**, v. 327, p. 153–159, 2006.

De acordo,

Profa. Dra. Maria Palmira Daflon Gremião
Orientadora

Fernanda Padilla
Aluna

