



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE
MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE
ARARAQUARA

FLÁVIO AUGUSTO SANCHES POLITI

Avaliação do potencial de filmes bioadesivos contendo piperina encapsulada em nanopartículas poliméricas no tratamento de doenças inflamatórias cutâneas

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biociências e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Marlus Chorilli

Coorientadora: Leila Aparecida C. Favorin

Araraquara

2022

FLÁVIO AUGUSTO SANCHES POLITI

Avaliação do potencial de filmes bioadesivos contendo piperina encapsulada em nanopartículas poliméricas no tratamento de doenças inflamatórias cutâneas

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biociências e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Marlus Chorilli

Coorientadora: Leila Aparecida C. Favorin

Araraquara

2022

P769a Politi, Flávio Augusto Sanches.
Avaliação do potencial de filmes bioadesivos contendo piperina encapsulada em nanopartículas poliméricas no tratamento de doenças inflamatórias cutâneas / Flávio Augusto Sanches Politi. – Araraquara: [S.n.], 2022.
87 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia. Área de Bacteriologia.

Orientador: Marlus Chorilli.

Coorientadora: Leila Aparecida C. Favorin.

1. Eudragit® S100. 2. Ácido hialurônico. 3. Nanoprecipitação. 4. Piperaceae. 5. Membranas poliméricas. 6. Alginato de sódio. I. Chorilli, Marlus, orient. II. Favorin, Leila Aparecida C., coorient. III. Título.

Diretoria do Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

CAPES: 33004030081P7

Esta ficha não pode ser modificada

*Aos meus saudosos pais, José Américo
Politi e Delci Aparecida Sanches Politi,
que me deixaram como legado uma
educação irrepreensível e uma
formação moral exemplar.*

Educar verdadeiramente não é ensinar fatos novos ou enumerar fórmulas prontas, mas sim preparar a mente para pensar.

Albert Einstein

O Homem que não cultiva o hábito de pensar desperdiça um dos maiores prazeres da vida e não consegue aproveitar o máximo de si.

Thomas A. Edison

AGRADECIMENTOS

- Ao professor Marlus Chorilli pela orientação, amizade e ensinamentos;
- À professora Leila Aparecida C. Favorin pela coorientação;
- Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa concedida durante parte do desenvolvimento do trabalho;
- Aos colegas de laboratório que auxiliaram em diversos momentos: Suzana Carvalho, Maurício Palmeira, Aline Martins, Camila Roderio, Andréia Meneguim, Rodrigo Sorrechia, dentre outros.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	21
2.1. Piperina	21
2.2. Nanoprecipitação	23
3. OBJETIVOS	24
4. MATERIAIS E MÉTODOS	25
4.1. Preparo das nanopartículas (NPs)	25
4.2. Caracterização das NPs	26
4.2.1. Análise do tamanho e do índice de polidispersão (PDI) das NPs	26
4.2.2. Análise do potencial zeta das NPs	26
4.2.3. Análise de rastreamento de nanopartículas (NTA)	27
4.2.4. Termogravimetria e análise térmica diferencial simultânea (TG-DTA)	27
4.2.5. Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)	28
4.2.6. Método analítico de quantificação por CLAE-UV	28
4.3. Validação do método cromatográfico	29
4.3.1. Adequabilidade do sistema	29
4.3.2. Especificidade/seletividade	29
4.3.3. Linearidade, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)	29
4.3.4. Precisão	30
4.3.5. Exatidão	30
4.4. Avaliação da eficiência de incorporação (EI%)	31
4.5. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) das NPs	31
4.6. Preparo dos filmes de ácido hialurônico (AH)/alginate de sódio (AS)	31
4.7. Caracterização dos filmes poliméricos de AH/AS	34
4.7.1. Espessura	34
4.7.2. Análises mecânicas	34
4.7.3. Perfil de intumescimento dos filmes	35
4.7.4. Permeabilidade ao vapor de água pelo método gravimétrico.	35
4.7.5. Teste de bioadesão <i>in vitro</i>	36
4.8. Preparo dos filmes contendo o fármaco e dos filmes contendo as NPs	37
4.9. Teste de solubilidade	37
4.10. Avaliação do perfil de liberação <i>in vitro</i> da piperina	38
4.11. Estudo de permeação cutânea <i>in vitro</i> das NPs.	39

4.12.	Estudo de retenção cutânea <i>in vitro</i>	40
4.13.	Ensaio biológicos	41
4.13.1.	Ensaio de citotoxicidade	41
4.13.2.	Atividade anti-inflamatória <i>in vivo</i>	42
4.14.	Análises estatísticas	42
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.1.	Caracterização das NPs	43
5.2.	Análise de rastreamento de nanopartículas (NTA)	46
5.3.	Análises de TG-DTA e DSC.	47
5.4.	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR).	49
5.5.	Validação do método cromatográfico	50
5.5.1.	Adequabilidade do sistema	50
5.5.2.	Especificidade/seletividade	51
5.5.3.	Linearidade, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)	52
5.5.4.	Precisão	55
5.5.5.	Exatidão	56
5.6.	Eficiência de incorporação (EI%)	57
5.7.	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	57
5.8.	Preparo e caracterização dos filmes poliméricos de AH/AS	59
5.9.	Avaliação do perfil de liberação e de permeação <i>in vitro</i> da piperina.	67
5.10.	Avaliação do ensaio de retenção cutânea <i>in vitro</i>	70
5.11.	Ensaio de citotoxicidade	72
5.12.	Atividade anti-inflamatória <i>in vivo</i>	74
6.	CONCLUSÕES	74
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 01. Referências do potencial anti-inflamatório apresentado pela piperina.	16
Tabela 02. Condições cromatográficas empregadas na metodologia analítica.	28
Tabela 03. Caracterização das nanopartículas com e sem incorporação da piperina segundo os parâmetros tamanho (nm), índice de polidispersividade (PDI) e potencial zeta (mV).	44
Tabela 04. Parâmetros avaliados para adequabilidade do sistema cromatográfico.	51
Tabela 05. Análise de variância da regressão linear da curva analítica de piperina.	55
Tabela 06. Repetibilidade (intra-ensaio) e precisão intermediária (inter-ensaio).	55
Tabela 07. Valores de porcentagem de recuperação (média $\pm$ DP) obtidos no ensaio de determinação da exatidão do método analítico proposto.	56
Tabela 08. Eficiência de incorporação do fármaco piperina.	57
Tabela 09. Parâmetros analisados na caracterização mecânica dos filmes de ácido hialurônico (AH)/alginato de sódio (AS). Os resultados são expressos como a média $\pm$ desvio padrão.	59
Tabela 10. Perfil de intumescimento dos filmes A4, D3 e G4.	62
Tabela 11. Classificação da permeabilidade ao vapor de água (PVA).	64
Tabela 12. Coeficiente de correlação e parâmetros dos modelos matemáticos de cinética de liberação do fármaco.	69
Tabela 13. Interpretação dos mecanismos de liberação a partir dos filmes poliméricos para sistemas esféricos.	69
Tabela 14. Medidas da extensão (mm) das áreas descoloridas por quadrante relativas ao ensaio de citotoxicidade (método de difusão em ágar).	71
Tabela 15. Resultados qualitativos de citotoxicidade.	73
Tabela 16. Resultados de inflamação e redução da inflamação (média $\pm$ DP).	74

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 01. Representação esquemática das nanopartículas poliméricas: (A) Fármaco dissolvido no núcleo lipofílico da nanocápsula; (B) Fármaco retido na membrana polimérica externa; (C) Fármaco retido na superfície da matriz polimérica; (D) Fármaco distribuído uniformemente pela matriz polimérica. 18
- Figura 02. Estrutura molecular do Eudragit® S100. A proporção dos grupos carboxílicos (RCOOH) para os grupos ésteres (RCOOR') é de aproximadamente 1:2. 19
- Figura 03. Estrutura molecular do alginato. 20
- Figura 04. Estrutura molecular do ácido hialurônico. 21
- Figura 05. Estrutura molecular da piperina. 22
- Figura 06. Ilustração esquemática do método de nanoprecipitação. 24
- Figura 07. Processador líquido ultrassônico QSonica Q700. (A) Amostra em banho de gelo (v = 20 mL). (B) *Probe* de 1/2" (12,7 mm) equipada com *tip* de titânio. (C) Equipamento ajustado com 4 W de força durante t = 45 minutos. 26
- Figura 08. Análises mecânicas dos filmes de ácido hialurônico (AH)/alginato de sódio (AS). (A) Micrômetro digital MDC-lite (Mitutoyo) (B) Filme com boas propriedades mecânicas observadas macroscopicamente (espessura, maleabilidade e resistência à tração; observar a transparência e homogeneidade da membrana); (C) Filme com propriedades mecânicas indesejáveis (quebradiça e pouco maleável; observar as rugosidades na superfície da membrana); (D) Seções de filme para análises de resistência à perfuração (Rp) e energia de perfuração por unidade de volume (EP); (E) Analisador universal de textura TA-XT2 Texture Analyser (Stable Micro Systems, UK); (F) Detalhe de uma seção de filme disposta sobre a prancha de acrílico do texturômetro. 33
- Figura 09. Ensaio para determinação do perfil de intumescimento dos filmes de AH/AS. (A) Dispositivo de Enslin adaptado, utilizando-se uma pipeta de 2 mL; (B) Seção de filme de cerca de 1 cm², previamente pesado, alocado na base de vidro sinterizado do funil do dispositivo. 35
- Figura 10. Ensaio de permeabilidade ao vapor d'água. (A) Seções circulares dos filmes poliméricos, com diâmetro similar ao do frasco de vidro utilizado, foram recortadas e fixadas na superfície interna da tampa. O sistema foi pesado inicialmente e após 24, 48,

72, 96 e 120 horas; (B) Frascos acondicionados em dessecador contendo sílica gel, diariamente trocada. 36

Figura 11. Teste de bioadesão. (A) No detalhe, o filme de AS/AH contendo o fármaco piperina dispersado em sua matriz. Os filmes foram recortados, de modo a serem obtidas seções de cerca de 2 cm²; (B) Analisador universal de textura TA-XT2 equipado com sonda específica para o modo *Adesive Test*. 37

Figura 12. Equipamento utilizado para os estudos de liberação e permeação *in vitro*. (A) Hanson Microette® (Hanson 0700-1251) com coletor automático; (B) Detalhe das células de Franz montadas com membrana de celulose de 0,45 µm. 38

Figura 13. Curva analítica obtida a partir do ensaio de solubilidade para se determinar as condições *sink* a serem empregadas nos ensaios de liberação e permeação *in vitro* das nanopartículas (NPs) de piperina. 39

Figura 14. Dermatômização de orelhas de porco compradas junto à empresa Frigodelis Ltda. para ensaio de permeação cutânea *in vitro*. (A) Extração de seções de pele com auxílio de dermatômetro; (B) As seções de pele foram estendidas em folha de PVC e acondicionados em pacotes de alumínio, mantidos em freezer a -4 °C até seu uso. 39

Figura 15. Diâmetro médio (nm) – representado pelas barras – e índice de polidispersão – representado pelos pontos – das nanopartículas com e sem sonicação. 45

Figura 16. Gráfico de intensidade em função da distribuição de tamanho. (A) Bco; (B) Bco S; (C) NPPi; (D) NPPi S. 45

Figura 17. Gráficos da concentração em relação ao tamanho, obtidos por análise de rastreamento de nanopartículas (NTA). (A) Bco; (B) Bco S; (C) NPPi; (D) NPPi S. As barras de erro em vermelho indicam +/- 1 desvio padrão. 46

Figura 18. Curvas de TG-DSC a 800 °C. (A) Amostras liofilizadas de nano branco (Bco); (B) Amostras liofilizadas de nano piperina (NPPi). 48

Figura 19. Curvas DSC das amostras Bco e NPPi. 49

Figura 20. Espectros de FTIR. (A) Sobreposição das 5 amostras; (B) Eudragit® S100; (C) Poloxamer 188; (D) NP Bco; (E) Piperina; (F) NPPi. 49

Figura 21. Cromatogramas obtidos para o ensaio de seletividade/especificidade utilizando coluna de fase reversa C18 XSelect HSS 5 µm 4,6 x 150 mm (Waters, USA). (A) Cromatograma do diluente (metanol). (B) Cromatograma da amostra placebo. (C) Cromatograma da amostra NPPi. (D) Cromatograma do padrão de piperina (97,5%

pureza). (E) Sobreposição dos cromatogramas A-D (azul: metanol; verde: amostra placebo; preto: amostra NPPI; rosa: piperina).	52
Figura 22. Curva padrão da piperina obtida pelo método cromatográfico proposto.	53
Figura 23. Gráficos de resíduos tendo a área como resposta. (A) Gráfico de probabilidade normal. (B) Gráfico de resíduos em função dos valores ajustados.	54
Figura 24. Microscopia eletrônica de varredura das nanopartículas preparadas pelo método de nanoprecipitação. (A) Branco, aumento $\times 20.000$; (B) Branco S, aumento $\times 100.000$; (C) NPPI, aumento $\times 20.000$; (D) NPPI S, aumento $\times 20.000$.	58
Figura 25. Gráficos dos parâmetros analisados na caracterização mecânica dos filmes de AH/AS. (A) Espessura; (B) Energia de perfuração por unidade de volume; (C) Resistência a perfuração; (D) Porcentagem de elongação antes da ruptura.	61
Figura 26. Perfil de intumescimento dos filmes poliméricos de AS/AH. (A) Filme A4 e sua curva de regressão linear; (B) Filme D3 e sua curva de regressão linear; (C) Filme G4 e sua curva de regressão linear.	62
Figura 27. Permeabilidade ao vapor de água dos filmes de AS/AH.	64
Figura 28. Propriedades mecânicas do filme G4 com a piperina (F_{pip}) e o nanossistema incorporados (F_{NPPI}).	65
Figura 29. Força de bioadesão e trabalho de bioadesão do filme de G4 contendo o fármaco (F_{pip}) e do filme G4 contendo o nanossistema (F_{NPPI}), empregando-se peles de orelhas de porco dermatomizadas.	66
Figura 30. Perfil de liberação de piperina do filme G4 em meio contendo tampão PBS (pH 7,4), etanol (20%, v/v) e surfactante (Tween [®] 20, 2% v/v). Os resultados são apresentados como a média $\pm$ desvio padrão de 3 replicatas.	68
Figura 31. Piperina recuperada da pele de porco dermatomizada após 24 horas de experimento de permeação <i>in vitro</i> . (A) Perfil de recuperação de piperina a partir do filme G4 (F_{pip}); (B) Perfil de recuperação de piperina contida no nanossistema incorporado no filme G4 (F_{NPPI}).	70
Figura 32. Quantidade retida <i>in vitro</i> de piperina. (A) Concentração de piperina retida no estrato córneo ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$); (B) Concentração de piperina retida na derme + epiderme ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$); (C) Concentração de piperina recuperada no compartimento receptor ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$).	71

RESUMO

A piperina é um alcaloide encontrado nos frutos de diversas espécies do gênero *Piper*, e seu potencial anti-inflamatório tem sido amplamente explorado pela medicina tradicional. Entretanto, suas aplicações terapêuticas ainda necessitam serem melhor exploradas devido à sua baixa solubilidade em água. Neste sentido, o foco deste trabalho foi avaliar a eficiência da nanoencapsulação deste composto bem como sua incorporação em biomembranas sintetizadas a partir de polímeros de origem natural, em ordem a contornar a limitação de uso devido sua hidrofobicidade, e assim, testar sua ação anti-inflamatória contra um modelo de edema de orelha utilizando camundongos albinos Swiss. Para a síntese das nanopartículas, a técnica de nanoprecipitação foi empregada, obtendo-se nanopartículas esféricas com diâmetro médio de $122,1 \pm 2,0$ nm, distribuição estreita de tamanho (índice de polidispersividade $0,266 \pm 0,044$) e eficiência de encapsulação de $76,2 \pm 0,102\%$, as quais permaneceram estáveis por até 60 dias após seu preparo. Entre as diferentes membranas sintetizadas, foi escolhida aquela que demonstrou possuir boa resistência e maleabilidade e que apresentou taxa de permeabilidade ao vapor d'água e porcentagem de intumescimento favoráveis à liberação controlada da piperina. Através dos ensaios de liberação *in vitro*, verificou-se que tanto o filme sintetizado com a piperina (F_{Pip}) quanto o filme sintetizado com as nanopartículas (F_{NPPI}) apresentaram modelo de cinética não Fickiano. A respeito da permeação, uma taxa de passagem lenta foi observada até as 14 horas iniciais, quando um aumento exponencial na concentração da droga recuperada começou a ocorrer. Isto é uma característica farmacocinética positiva quando pensamos na aplicação local de um anti-inflamatório, desde que sua taxa de penetração nas camadas da pele é bastante lenta, evitando assim uma ação sistêmica. O ensaio *in vivo* mostrou uma redução na inflamação de cerca de 43,6%, e nenhuma citotoxicidade contra fibroblastos foi observada.

Palavras-chave: Eudragit® S100; ácido hialurônico; nanoprecipitação; Piperaceae; membranas poliméricas; alginato de sódio.

ABSTRACT

Piperine is an alkaloid mostly found in the fruits of several species of the *Piper* genus, and its anti-inflammatory potential has already been widely explored by traditional medicine. However, its therapeutic applications still need to be better explored due to the low aqueous solubility of this active. In this sense, the aim of this work was to evaluate the efficiency of the nanoencapsulation of the compound as well as its incorporation into biomembranes synthesized from natural polymers, in order to circumvent the limitation of its hydrophobicity, and thus, test its anti-inflammatory action against an ear edema model using male Swiss albino mice. For the synthesis of the nanoparticles, the nanoprecipitation technique was used, obtaining spherical nanosized particles with an average diameter of 122.1 ± 2.0 nm, narrow size distribution (polydispersity index 0.266 ± 0.044) and encapsulation efficiency of $76.2 \pm 0.102\%$, which remained stable for at least 60 days. Among the different synthesized films, the one with good strength and malleability was chosen, whose water vapor permeability rate and swelling percentage favored the controlled release of piperine. Regarding permeation, a slow passage rate was observed until the initial 14 hours, when an exponential increase in the recovered drug concentration began to occur. This is a positive pharmacokinetic characteristic when we think about a local anti-inflammatory application of the active, since its penetration rate in the skin layers is quite slow, avoiding systemic action. The *in vivo* assay showed a reduction in inflammation up to 43.6%, and no cytotoxicity against fibroblasts was observed.

Keywords: Eudragit® S100; hyaluronic acid; nanoprecipitation; Piperaceae; polymeric membranes; sodium alginate.

1. INTRODUÇÃO

A pele é o maior órgão do corpo humano e, por fazer interface diretamente com o meio externo, é susceptível a sofrer danos e lesões, o que pode levar à invasão por agentes patogênicos, ocasionando diversas desordens imunológicas. O processo inflamatório cutâneo é produzido e mantido pela liberação de vários mediadores pró-inflamatórios, incluindo prostanoídes, aminas vasoativas, citocinas, óxido nítrico (NO), espécies reativas de oxigênio (EROS), entre outros (BUCKLE; HEDGECOCK, 1997). A interação complexa entre essas substâncias e as diferentes células do tecido cutâneo resulta em uma série de eventos celulares e microvasculares, como vasoconstrição seguida de vasodilação, aumento do fluxo sanguíneo, ampliação da permeabilidade vascular, estase sanguínea e migração e recrutamento de leucócitos para o local afetado, levando ao aparecimento de quatro sinais clínicos característicos: dor, calor, rubor e edema (RANG *et al.*, 2016). O contato destas substâncias com seus receptores específicos sinaliza para a produção e liberação de segundos mensageiros, os quais são responsáveis por ativar proteínas quinases (BHAGWAT *et al.*, 1999). A proteína quinase C, uma vez ativada, promove a fosforilação e subsequente degradação das proteínas inibitórias kappa B (I κ B), habilitando a translocação do fator nuclear-kappa B (NF- κ B) para o núcleo e subsequente transcrição gênica de fatores pró-inflamatórios, tais como as enzimas ciclo-oxigenase-2 (COX-2) e óxido nítrico sintase, citocinas (IL-1 β , IL-6, TNF α), quimiocinas e moléculas de adesão, as quais modulam, mantêm e amplificam o processo inflamatório (BARNES; KARIN, 1997). Essa cadeia de eventos inicia-se como objetivo de erradicar o agente agressor, promover o reparo e restabelecer a homeostase cutânea e, adjacente a ela, são gerados mecanismos para sua regulação e inibição. Porém, por motivos diversos, pode haver uma falha nestes mecanismos, desencadeando o surgimento de doenças inflamatórias e crônicas, tais como a dermatite atópica e a psoríase (WEINDINGER *et al.*, 2018).

A dermatite atópica está relacionada a um estado de reatividade cutânea hiperativada por estímulos inócuos em indivíduos normais (LEUNG *et al.*, 2004). Em aproximadamente 80% dos casos a doença inicia-se antes dos 5 anos de idade, podendo persistir até a fase adulta, sendo caracterizada por xerose, prurido, intenso, eczemas, altos níveis de IgE e eosinofilia (GUTTMAN-YASSKY *et al.*, 2007).

A psoríase é outra doença inflamatória cutânea e apresenta grande prevalência, afetando aproximadamente 3% da população mundial. É caracterizada por hiperproliferação dos queratinócitos e formação de um foco inflamatório e sua patogênese está associada à integração de infiltrados de leucócitos, quimiocinas, células residentes, diversas citocinas

pró-inflamatórias, fatores de crescimento e eicosanoides presentes no tecido cutâneo, e em quadros mais graves, pode levar ao desenvolvimento de artrite psoriática (NICKOLOFF; NESTLÉ, 2004; KRUEGER; BAWCOCK, 2005).

Estas doenças dermatológicas são caracterizadas por alterações cutâneas que resultam em um aspecto desagradável à pele, afetando significativamente a qualidade de vida dos pacientes por envolverem componentes emocionais, os quais promovem recidivas ou exacerbação das lesões (RUSSEL-JONES *et al.*, 2005). Os anti-inflamatórios corticosteroides são geralmente empregados para reduzir a dor e inflamação resultantes destas lesões, e são usualmente administrados pelas vias oral ou parenteral, contudo, seu uso crônico pode levar a efeitos gastrointestinais bastante severos, incluindo náuseas, dor abdominal e ulceração gástrica, além de interferirem com o efeito de outros terapêuticos, tais como barbitúricos, antiácidos, hipoglicemiantes, contraceptivos, anti-hipertensivos, anti-inflamatórios não esteroidais, entre outros (ANTI *et al.*, 2008).

Com vistas a tentar evitar a ocorrência destes efeitos adversos, bem como propor a aplicação de substâncias diferentes ao que se tem atualmente disponível no mercado, uma opção válida é o emprego de anti-inflamatórios de origem natural. A piperina é um alcaloide isolado de espécies vegetais do gênero *Piper*, sendo bastante abundante nos frutos secos de *Piper nigrum* e *Piper longum* [Piperaceae] (RIBEIRO *et al.*, 2004). No campo farmacêutico, a piperina é descrita por possuir diversas atividades biológicas, sendo as mais recorrentes a atividade anipirética (PARMAR *et al.*, 1997), antifúngica (NAVICKIENE *et al.*, 2000), antioxidante (MITTAL; GUPTA, 2000; VIJAYAKUMAR *et al.*, 2004; SAMYKUTTY *et al.*, 2013), antimutagênica (SELVENDIRAN *et al.*, 2005; WONGPA *et al.*, 2007), antitumoral (SUNILA; KUTTAN, 2004; MANOHARAN *et al.*, 2009; RATHER; BHAGAT, 2018) e principalmente anti-inflamatória (**Tabela 01**).

Tabela 01. Referências do potencial anti-inflamatório apresentado pela piperina.

Modelo	Ação	Referência
Células de melanoma B16F-10	Reduziu a expressão dos genes de IL-1 β , TNF- α , IL-6, GM-CSF (fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos), IL-12p40	PRADEEP & KUTAN (2004)
Artrite	Inibiu a expressão de IL-6, MMP-13 e a produção de PGE2; inibiu a migração de proteína ativadora AP-1 para o núcleo em resposta a IL-1 β	BANG <i>et al.</i> (2009)
Pancreatite aguda	Reduziu o dano histológico e reduziu a atividade da	BAE <i>et al.</i> (2011)

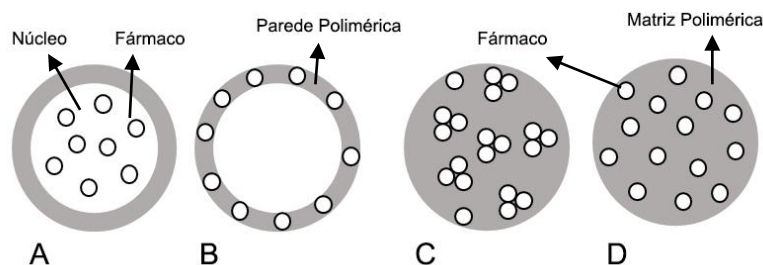
	mieloperoxidase no pâncreas; reduziu a produção de fator de necrose tumoral (TNF α), interleucina (IL)-1 β e IL-6; inibiu proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPKs)	
Artrite gotosa	Inibiu a inflamação induzida por cristais de urato monossódicos; reduziu a contagem de TNF α ; diminuiu a ação de enzimas lisossômicas	SABINA <i>et al.</i> (2011)
Artrite	Administração oral significativamente reduziu os níveis de mediadores inflamatórios (IL-1 β , TNF- α , and PGE2) e aumentou o nível de IL-10	UMAR <i>et al.</i> (2013)
Periodontite	Reduziu a infiltração de células pró-inflamatórias (IL-1 β) e ação de metaloproteinases de matriz (MMP-8 e MMP-13) em tecidos moles	DONG <i>et al.</i> (2015)
Degeneração de disco intervertebral	Inibiu múltiplos fatores inflamatórios (IL-1 β , TNF- α , IL-6, iNOS); MMP-3 e MMP-13; proteínas <i>desintegrina e metaloproteinase com motivos de trombospondina</i> (ADAMTS-4 e 5)	LI <i>et al.</i> (2015)
Edema de pata	Diminuiu a contagem de leucócitos; reduziu a liberação de TNF- α , prostaglandina E2 (PGE2), substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs) e nitrato/nitrito total (NOx)	EL-GHAZALY <i>et al.</i> (2016)
Endometrite	Reduziu a expressão de TNF- α , IL-1 β e IL-6; aumentou a expressão de IL-10; inibiu a fosforilação de II- κ B α , p65, p38, ERK, and JNK de forma dose-dependente	ZHAI <i>et al.</i> (2016)
Inflamação de pulmão	Limitou a elevação de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6 e TNF α) no soro de ratos pré-irradiados com radiação γ	ELKADY & TAWFIK (2018)
Edema de pata	Diminuiu a contagem de leucócitos; reduziu a liberação de TNF- α e IL-1 β	OLIVEIRA <i>et al.</i> (2018)

Outra propriedade interessante do ponto de vista da aplicabilidade desta molécula, diz respeito ao potencial de aumentar a biodisponibilidade de outros fármacos, incluindo antibióticos, antivirais, tuberculostáticos, drogas utilizadas para o tratamento de problemas cardíacos e do sistema nervoso central, além dos AINEs (ATAL; BEDI, 2010). Isto pode ocorrer pela promoção de uma rápida absorção através das interações polares/apolares da sua molécula anfifílica, ou ainda, através da inibição de enzimas do sistema citocromo p450 (CYP450) e da γ -glutamyltranspeptidase (JOHRI *et al.*, 1992), envolvidas na biotransformação destes compostos (OLIVEIRA *et al.*, 2014). Apesar destes atrativos, o emprego da piperina enfrenta desafios, devido principalmente às suas características físico-químicas, como baixa solubilidade aquosa, resultando inclusive em restrições farmacocinéticas, tais como reduzida absorção por via oral, metabolismo hepático extenso e

rápida excreção. O encapsulamento da piperina em nanopartículas poliméricas é uma estratégia tecnológica muito interessante do ponto de vista de se contornar estas limitações, possibilitando que sejam alcançados sítios específicos de ação a partir de uma liberação sustentada do princípio ativo, além de solucionar eventuais problemas de solubilidade do mesmo.

As nanopartículas poliméricas (NPs) são sistemas rígidos e que apresentam diâmetro inferior a 1 μm , podendo apresentar baixa ou rápida velocidade de bioerosão, dependendo das características dos materiais que as compõem (CASTRO *et al.*, 2020). Dividem-se em dois grupos: i) nanocápsulas, as quais são constituídas por um invólucro polimérico com o fármaco encerrado em seu interior ou aderido na estrutura molecular deste revestimento; ii) nanoesferas, as quais são formadas por uma matriz polimérica maciça com o fármaco aderido na sua superfície ou disperso pela nanopartícula (**Figura 01**) (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

Figura 01. Representação esquemática das nanopartículas poliméricas: (A) Fármaco dissolvido no núcleo lipofílico da nanocápsula; (B) Fármaco retido na membrana polimérica externa; (C) Fármaco retido na superfície da matriz polimérica; (D) Fármaco distribuído uniformemente pela matriz polimérica.

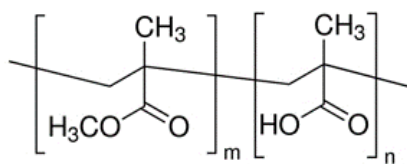


Fonte: Adaptado de SCHAFFAZICK *et al.* (2003).

As NPs podem ser obtidas por diversos métodos de preparo tais como polimerização *in situ*, emulsificação, *salting out* e nanoprecipitação (REIS *et al.*, 2006). Uma outra técnica muito utilizada quando se empregam polímeros ionizáveis é a geleificação ionotrópica, que consiste na adição de um agente reticulante ao polímero disperso em água, organizando as cadeias poliméricas que encapsularão o fármaco dissolvido ou disperso no sistema (CALVO *et al.*, 1997). Dentre os principais polímeros utilizados para a obtenção de nanopartículas estão o óxido de polietileno (PEO), óxido de polipropileno (PPO), ácido polilático (PLA), policaprolactona (PCL), e poli *L*-ácido láctico-co-ácido glicólico [PLGA] (CALVO *et al.*, 1997), porém, os monômeros ácidos liberados por essas matrizes podem prejudicar a ação

dos compostos encapsulados (KUMAR; SARKAR, 2018). Para minimizar este tipo de inconveniente outras substâncias já foram utilizadas para revestimento e formação de NPs, tais como álcool polivinílico (PVA) e poliésteres, ou ainda, biopolímeros como a pectina, alginato e quitosana, os quais apresentam a vantagem de serem bastante estáveis, biocompatíveis e biodegradáveis (LIU *et al.*, 2010; PATIL *et al.*, 2004; WANG *et al.*, 2006). Uma outra possibilidade é o emprego de copolímeros derivados do ácido metacrílico e metilmetacrílico que compõe sistemas pH dependentes, destacando-se o Eudragit® R100 e o Eudragit® S100 (**Figura 02**). Segundo EL-KAMEL *et al.* (2001), em pH ácido, micropartículas preparadas com Eudragit® S100 possuem baixa permeabilidade devido a interações de hidrogênio entre as hidroxilas dos grupos carboxílicos e o oxigênio da carbonila dos grupamentos éster, minimizando a liberação do princípio ativo neste meio.

Figura 02. Estrutura molecular do Eudragit® S100. A proporção dos grupos carboxílicos (RCOOH) para os grupos ésteres (RCOOR') é de aproximadamente 1:2.



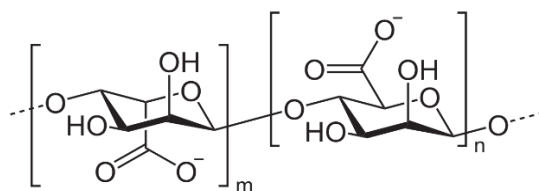
LABOURET *et al.* (1995) relataram a preparação de nanoesferas de Eudragit S® 100 e Eudragit® R100 através de nanoprecipitação, com uma concentração polimérica entre 20-30%, avaliando a possível aplicação desses sistemas como materiais de revestimento. No estudo, foram realizadas a preparação e caracterização das dispersões coloidais, resultando em partículas com tamanhos entre 40 e 130 nm. Em relação à estabilidade, ambas se apresentaram estáveis tanto a 4 °C quanto a 35 °C durante 6 meses, e a formulação preparada com Eudragit® S100 permaneceu estável durante 2 anos.

De forma a viabilizar a administração tópica destas NPs, a utilização de filmes com propriedades bioadesivas constituídos por biopolímeros pode ser interessante, pois estes sistemas permitem um maior tempo de retenção local da substância ativa. O desenvolvimento de filmes para liberação cutânea de fármacos tem sido bastante incentivado devido ao seu baixo custo, à sua facilidade de processamento e propriedades físico-químicas ajustáveis através da síntese (KABANOV *et al.*, 2002; TORCHILIN, 2001). A combinação entre polímeros naturais, seja na forma de complexos e coacervados polieletrólíticos, ou de blendas resultantes da mistura física de dois materiais distintos, tem grande importância na área de

biomateriais e possibilita muitas aplicações, uma vez que, por meio destas abordagens, torna-se possível a obtenção de dispositivos com propriedades biológicas, mecânicas e físico-químicas melhoradas relativamente aos polímeros isolados (SIONKOWSKA, 2011). Em trabalho recente, ABOU-OKEIL *et al.* (2018) demonstraram a eficácia de filmes constituídos por uma blenda de ácido hialurônico e alginato de sódio na recomposição da homeostase do tecido dérmico de ratos excisados dorsalmente, bem como comprovaram a atividade antibacteriana de nanopartículas de prata incorporadas nestas formulações.

O alginato (**Figura 03**) é um carboidrato coloidal hidrofílico extraído com álcali diluído de várias espécies de algas Phaeophyceae, sendo constituído por subunidades monoméricas de ácido β -D-manurônico (M) e ácido α -L-gulurônico (G) interligados por ligações glicosídicas [1 $\rightarrow$ 4] (SKJK-BRAEK *et al.*, 1986). Estes monômeros podem ser organizados em blocos de resíduos G consecutivos (blocos G-G), resíduos M consecutivos (blocos M-M) ou resíduos alternados de M e G (blocos M-G). É destacável o seu potencial como componente estrutural de filmes e coberturas devido às suas propriedades coloidais únicas, dentre elas compactação e estabilização da emulsão, além de serem termoestáveis e detentores da capacidade de funcionar como suporte para substâncias ativas a partir do processo de reticulação na presença de cátions bivalentes (SIMPSON *et al.*, 2004). Suas propriedades materiais, versatilidade e biocompatibilidade, boa biodegradação e baixa toxicidade, levaram à ampla utilização do alginato para aplicações médicas, incluindo curativos, sistemas de liberação controlada de fármacos e, mais recentemente, para terapia regenerativa de queimaduras e feridas de difícil cicatrização (TONNESEN; KARLSEN, 2002).

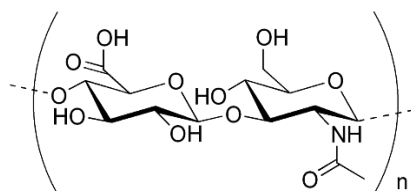
Figura 03. Estrutura molecular do alginato.



O ácido hialurônico (**Figura 04**), um polissacarídeo linear de ocorrência natural, composto de 2.000-25.000 unidades dissacarídicas de ácido D-glicurônico (GlcUA) e N-acetilglicosamina (GlcNAc) unidas alternadamente por ligações glicosídicas β (1 $\rightarrow$ 3) e β [1 $\rightarrow$ 4] (GARG; HALES, 2004), apresenta propriedades higroscópica, reológica e viscoelástica, influenciando o macro e microambiente por meio de suas interações com as

células e outros componentes da matriz extracelular como o colágeno e a fibrina, desempenhando um papel fundamental na angiogênese e na manutenção da integridade tecidual, facilitando a adesão e diferenciação de células durante processos inflamatórios e reparos de feridas (CHEN; ABATANGELO, 1999; SLEVIN *et al.*, 2007). Quando é incorporado a uma solução aquosa neutra ocorrem interações de hidrogênio entre os grupos carboxila e *N*-acetil e as moléculas de água, conferindo ao polímero capacidade de retenção hídrica e dureza conformacional, limitando sua flexibilidade (CHONG *et al.*, 2005). Na área dos biomateriais, o ácido hialurônico tem sido aplicado em diversos campos da medicina, como em neurocirurgia, recobrimento de ferimentos e desenvolvimento de cosméticos (PRICE *et al.*, 2007).

Figura 04. Estrutura molecular do ácido hialurônico.



Tendo em vista o exposto acerca da versatilidade dos biomateriais e sua aplicabilidade em sistemas de liberação controlada de fármacos, o presente trabalho teve como objetivo, a obtenção e caracterização de nanopartículas poliméricas contendo um ativo de origem natural (piperina), as quais foram incorporadas em filmes bioadesivos para aplicação tópica no tratamento de afecções inflamatórias cutâneas, com vistas à produção de uma formulação protótipo para uso comercial.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. Piperina

Piperaceae é umas das maiores famílias de Angiospermas com cerca de 3.615 espécies distribuídas ao redor de todo o planeta. Suas espécies, distribuídas dentro de cerca de 19 gêneros, são importantes elementos da composição do sub-bosque de florestas tropicais (JARAMILLO; MANOS, 2001), sendo facilmente reconhecidos por apresentarem folhas simples, flores diminutas, aclamídeas reunidas em inflorescências do tipo espiga, ovário súpero com um óvulo e fruto do tipo drupa (YUNCKER, 1972).

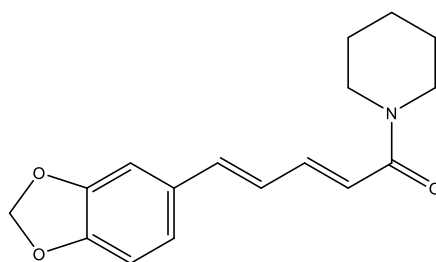
O gênero *Piper* é o maior da família Piperaceae, reunindo atualmente cerca de 2.000 espécies, 289 delas encontradas em território brasileiro, das quais 178 são endêmicas

(OLIVEIRA *et al.*, 2020). Estudos filogenéticos sugerem que esse gênero é monofilético, dando suporte para 3 clados principais, incluindo espécies da Ásia, do Neotrópico e do Pacífico Sul (JARAMILLO; MANOS, 2001). O principal caractere utilizado para distinguir *Piper* dos demais gêneros da família é seu hábito arbóreo-arbustivo (SOUZA; LORENZI, 2012; SCHUBERT *et al.*, 2012), sendo que a morfologia das folhas, das nervuras e das brácteas florais são os caracteres morfológicos tradicionalmente empregados para circunscrever suas espécies (SILVA *et al.*, 2015).

Economicamente as espécies de *Piper* são importantes pela exploração da pimenta como condimento nos mercados no mundo todo. Além disso, são há muito tempo utilizadas no sistema de medicina indiano (Ayurvédica), na medicina popular da América Latina e nas Índias Orientais (PARMAR *et al.*, 1997). Os constituintes químicos mais comuns são alcaloides e amidas, em especial a isobutilamida, piperidina, pirrolidina e a piperina (SENGUPTA; RAY, 1987).

A piperina (**Figura 05**) é o principal metabólito secundário isolado de *P. nigrum*, estando presente em concentrações que chegam a 90 g/Kg do fruto seco (THIEL, 2014). É caracterizada como uma substância cristalina de coloração amarela, com ponto de fusão entre 127-135 °C, massa molecular de 285,3377 g.mol⁻¹, fraca solubilidade em água (0,04 mg.mL⁻¹ a 18 °C), boa solubilidade em etanol (60 mg.mL⁻¹), log *P* = 2,25 (WU *et al.*, 2012), ρ (23 °C) = 1,39 g.mL⁻¹, e pKa (18 °C) = 12,22 [catiônico em pH baixo] (ELNAGGAR *et al.*, 2015).

Figura 05. Estrutura molecular da piperina.



A molécula apresenta várias propriedades farmacológicas, com destaque para estudos que atestam sua efetividade antipirética, analgésica e, sobretudo, anti-inflamatória (GUPTA *et al.*, 2000; BUKHARI *et al.*, 2013; YING *et al.*, 2013; TASLEEM *et al.*, 2014). Também há referências quanto ao seu potencial antidepressivo (LEE *et al.*, 2005; LI *et al.*, 2007), imunomodulador, antitumoral e antimetastático (DARSHAN; DORESWANY, 2004; SUNILA; KUTTAN, 2004; PRADEEP; KUTTAN, 2000), antimicrobiano (YANG *et al.*,

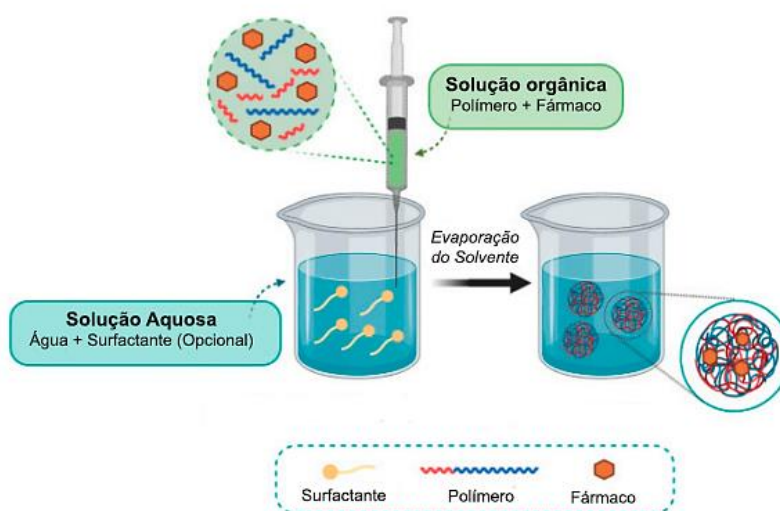
2002), hepatoprotetor e antiulceroso (DESAI *et al.*, 2008; BAI; XU, 2000) e antioxidante (SELVENDIRAM *et al.*, 2004; SELVENDIRAM *et al.*, 2005). Na literatura também é reportado o aumento da biodisponibilidade de diversos fármacos co-administrados com a piperina, *e.g.* propranolol, esparteína, fenitoína, nimesulida, nevirapina, pirazinamida, teofilina, etc. (BANO *et al.*, 1991; OLIVEIRA *et al.*, 2014; MEGHWAL *et al.*, 2021), e também de outros bioativos, como por exemplo, a curcumina (BASPINAR *et al.*, 2018). Este efeito acarreta em maior absorção do fármaco, elevando sua concentração plasmática devido à interferência no metabolismo de primeira passagem e inibição da glicoproteína P (Gp-P) e também da atividade constitutiva do citocromo P450 [CYP 450] (BADMAEV *et al.*, 2000; BHARDWAJ *et al.*, 2002, OLIVEIRA *et al.*, 2014).

2.2. Nanoprecipitação

A nanoprecipitação (**Figura 06**), ou deslocamento de solvente, é um método de preparação de nanopartículas poliméricas desenvolvido por FESSI *et al.* (1989), sendo bastante atrativo do ponto de vista comercial por sua simplicidade e baixo custo. Seu princípio é a formação de partículas a partir da deposição interfacial do polímero após o deslocamento do solvente da fase orgânica (etanol, metanol, acetona, acetato de etila, etc.) para fase aquosa de uma solução lipofílica mantida sob agitação constante, desde que o par solvente/anti-solvente seja total ou parcialmente miscível (BECK-BROICHSITTER *et al.*, 2010; RAO; GECKELER, 2011). Após a mistura das fases, há a diminuição da tensão superficial entre elas, aumentando a área superficial, levando então à formação de nanoesferas instantaneamente, em um processo denominado de Efeito Marangoni (MORA-HUERTAS *et al.*, 2011). Brevemente, partículas com tamanho de micro a nanométrico são formadas devido à diferença de tensão superficial existente entre o solvente orgânico (baixa tensão) e o anti-solvente (a água, com alta tensão). Esse gradiente gera uma turbulência entre as fases, interferindo no mecanismo de equilíbrio do sistema, resultando num decréscimo da energia livre de Gibbs. A ocorrência de perturbações na interface do sistema resulta em padrões de circulação e movimentos que geram uma convecção, promovendo o aumento da transferência de massa entre as duas fases. A mistura entre as fases orgânica e aquosa conduz à quebra das gotas da primeira em gotas cada vez menores, culminando com a formação de gotas com tamanho nanométrico. Assim, o fluxo do solvente a partir de regiões de baixa tensão superficial leva à agregação do polímero na superfície orgânica, levando à formação das nanopartículas (FESSI *et al.*, 1989; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

As partículas podem ser obtidas através de diferentes formas de adição da fase orgânica na fase aquosa do sistema, com ou sem a presença de um agente tensoativo nessa última: *i)* adição total; *ii)* em alíquotas; *iii)* com taxa controlada; *iv)* gota-a-gota (NAGAVARMA *et al.*, 2012; ALI; LAMPRECHT, 2013). Após finalizada a adição do volume pré-determinado de fase orgânica, é realizada a remoção do solvente por técnicas de diálise ou evaporação (LEE; FEIJEN, 2012).

Figura 06. Ilustração esquemática do método de nanoprecipitação.



Fonte: ZIELINSKA *et al.* (2020).

Dentre os parâmetros que podem influenciar nas características físico-químicas e na morfologia e tamanho das nanopartículas obtidas através da técnica, pode-se citar a composição molecular, massa molar e concentração dos polímeros (BILATI *et al.*, 2005; LEGRAND *et al.*, 2007; CHOURASIYA *et al.*, 2016), formas de adição da fase orgânica (MORA-HUERTAS *et al.*, 2011), natureza e quantidade dos solventes utilizados (MOLPECERES *et al.*, 1996; PELTONEN *et al.*, 2004), temperatura da fase aquosa (GOVENDER *et al.*, 1999), velocidade de agitação do meio e solubilidade do ativo na fase orgânica (SOUTO *et al.*, 2012).

3. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo central a produção de filmes bioadesivos obtidos a partir de uma blenda polimérica de alginato de sódio/ácido hialurônico (F_{AS/AH})

para administração tópica de piperina nanoencapsulada. Para tal, foram propostos os seguintes objetivos secundários:

- Promover o nanoencapsulamento da piperina (NPPi) utilizando Eudragit® S100 como agente encapsulante, empregando-se a técnica de nanoprecipitação;
- Caracterizar as NPPi quanto ao tamanho, potencial zeta, morfologia, estabilidade física e eficiência de encapsulação;
- Desenvolver os F_{AS/AH} pela técnica de evaporação do solvente (*casting*);
- Determinar as propriedades mecânicas, perfil de intumescimento e análise de permeabilidade ao vapor d'água nos F_{AS/AH};
- Incorporar as NPPi nos F_{AS/AH} e estudar sua viabilidade como sistema de liberação controlada;
- Realizar ensaios de liberação, permeação e retenção *in vitro*;
- Realizar ensaios biológicos de citotoxicidade e atividade anti-inflamatória.

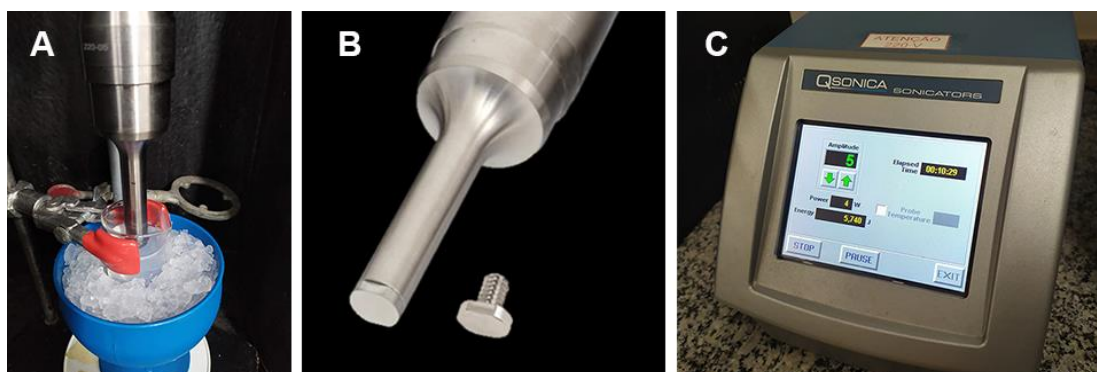
4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Preparo das nanopartículas (NPs)

As nanopartículas de piperina foram preparadas de acordo com o método de nanoprecipitação, com breves modificações (FESSI *et al.*, 1989; MOORTHY *et al.*, 2012, REN *et al.*, 2019). A fase orgânica foi preparada dissolvendo-se a piperina (97% pureza, Sigma-Aldrich) e o Eudragit® S100 (Evonik) em etanol (EtOH) a 2,5 mg.mL⁻¹ e 12,5 mg.mL⁻¹, respectivamente (concentração final de piperina = 2,5 mg/mL). As soluções foram deixadas em banho ultrassônico durante 1 hora, sendo posteriormente filtradas em membrana de 45 µm (Millipore®). A fase aquosa consistiu de água e poloxamer 188 (Pluronic® F-68, Sigma-Aldrich) a 5 mg.mL⁻¹ (MILADI *et al.*, 2016). Um volume de 4 mL de fase orgânica (FO) foi adicionado gota-a-gota (0,3 mL.min⁻¹) com o auxílio de seringa em 10 mL da fase aquosa (FA), mantendo-se a solução sob constante agitação (1000 rpm). O processo manteve-se *overnight*, de modo a permitir a evaporação do solvente orgânico residual. O volume final da solução foi ajustado com água ultrapura em proveta de 10 mL. As nanopartículas placebo foram preparadas da mesma forma, porém, sem a adição do fármaco.

Para fins comparativos em relação às características físicas e de incorporação do fármaco, um grupo de amostras foi submetido à sonicação em processador líquido ultrassônico QSonica Q700 (QSonica Sonicators, USA), aplicando-se energia de 4 W durante 45 minutos, utilizando-se *probe* de titânio de 1/2" (**Figura 07**).

Figura 07. Processador líquido ultrassônico QSonica Q700. (A) Amostra em banho de gelo ($v = 20$ mL). (B) *Probe* de 1/2" (12,7 mm) equipada com *tip* de titânio. (C) Equipamento ajustado com 4 W de força durante $t = 45$ minutos.



4.2. Caracterização das NPs

4.2.1. Análise do tamanho e do índice de polidispersão (PDI) das NPs

O diâmetro médio e o PDI das NPs foram determinados através da técnica de espalhamento de luz dinâmico (*Dynamic Light Scattering*, DLS), utilizando-se o equipamento Zetasizer Nano-ZS (Malvern Panalytical Instruments, UK) equipado com laser de 4,0 mV de He-Ne ($\lambda = 633$ nm), aplicando ângulo de detecção de 175° a cubetas capilares do tipo DTS1070. As medidas foram feitas em triplicata a 25°C , com 10 determinações de tamanho para cada amostra diluída a 1:5 (v/v) em água ultrapura. O *software* do equipamento mede a difusão das nanopartículas que se movem aleatoriamente através de movimento browniano no fluido em que estão dispersas, convertendo esse dado em distribuição de tamanhos, utilizando-se da relação de Stokes-Einstein, observada na Equação 01 (PECORA, 2000).

$$Dh = \frac{KT}{3\pi\eta D} \quad (\text{Equação 01})$$

Onde: Dh = diâmetro hidrodinâmico; K = constante de Boltzman; T = temperatura absoluta; η = viscosidade do meio de dispersão; D = coeficiente de difusão.

A polidispersão é um fator que determina a homogeneidade da dispersão e tratando-se de nanopartículas contendo polímeros naturais, considera-se que valores menores que 0,5 são indicativos de dispersões relativamente homogêneas (AVADI *et al.*, 2010).

4.2.2. Análise do potencial zeta das NPs

O potencial zeta das dispersões de NPs foi determinado pela técnica de mobilidade eletroforética, por meio da equação de Smoluchowski (Equação 02), empregando-se analisador de partículas Zetasizer Nano-ZS, sob ângulo de 175° (25°C). Todas as medidas foram conduzidas em triplicata.

$$\zeta = \frac{\mu\eta}{\varepsilon} \quad (\text{Equação 02})$$

Onde: ζ = potencial zeta, μ = mobilidade eletroforética, η = viscosidade do meio de dispersão e ε = constante dielétrica.

Além de providenciar informação acerca da carga superficial das NPs, o potencial zeta indica se as amostras tem uma boa estabilidade coloidal, sendo que NPs com potencial zeta acima de +30 mV ou abaixo de -30 mV são usualmente consideradas como estáveis (SILVA *et al.*, 2011).

4.2.3. Análise de rastreamento de nanopartículas (NTA)

A análise de rastreamento das nanopartículas (*Nanoparticle Tracking Analysis*, NTA) é uma técnica baseada na dispersão de luz ocasionada pelas partículas em suspensão e que através de uma câmera sCMOS, monitora individualmente e em tempo real o movimento browniano de cada nanopartícula presente na dispersão, possibilitando caracterizá-las quanto à distribuição de tamanho e concentração. O experimento foi realizado a 22,5 °C, utilizando-se equipamento NanoSight NS300 (Malvern, UK) em seu script padrão (SOP *Standard Measurement*), equipado com laser verde ($\lambda = 532 \text{ nm}$) e *software* NTA Build 3.4.003. As amostras foram diluídas em água ultrapura na razão 1:100000 (v/v).

4.2.4. Termogravimetria e análise térmica diferencial simultânea (TG-DTA)

Para as análises, cerca de 10 mg das amostras de NPs, previamente liofilizadas, foram pesadas e transferidas para cadinhos de alumina (Al_2O_3). As curvas TG-DTA foram obtidas num sistema de análise térmica modelo TG/DSC 1 (Mettler Toledo, USA), utilizando atmosfera dinâmica de ar seco como gás de purga com vazão de $50 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e razão de aquecimento de $10 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$.

4.2.4.1. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

Para as análises, cerca de 2,5 mg das amostras de NPs previamente liofilizadas foram pesadas e transferidas para cadinhos de alumínio com tampa perfurada. As curvas de DSC (*Differential Scanning Calorimetry*) foram obtidos utilizando-se calorímetro exploratório diferencial modelo Q10 DSC (TA Instruments, USA), empregando-se nitrogênio (N_2) como gás de purga a um fluxo de $50 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. A razão de temperatura adotada foi de $10 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ até a temperatura máxima de $400 \text{ }^\circ\text{C}$.

4.2.5. Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

As potenciais interações químicas entre a piperina e os polímeros ou surfactante utilizados durante a nanoprecipitação bem como suas integridades químicas foram avaliados por análise de espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) usando um espectrômetro IRPrestige-21 (Shimadzu, Japão). Piperina, Eudragit® S100 (Evonik), poloxamer 188 (Pluronic® F-68, Sigma-Aldrich), nanopartículas liofilizadas sem o fármaco (Bco) e nanopartículas liofilizadas contendo piperina (NPPi) foram misturadas separadamente com brometo de potássio (KBr, Supelco) e pressionadas em prensa hidráulica para formar as pastilhas. Durante o análise, as amostras foram escaneadas aplicando pastilhas de KBr como branco com resolução de 2 cm^{-1} , de $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$ (REN *et al.*, 2019). Os gráficos foram construídos utilizando-se o *software* Origin 2021 (OriginLab®).

4.2.6. Método analítico de quantificação por CLAE-UV

Os parâmetros conformidade do sistema, linearidade, precisão intracorrida e intercorrida, exatidão, especificidade/seletividade, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ), foram analisados para validação do método analítico para quantificação da piperina por CLAE-UV segundo o preconizado pela resolução RE nº 899, de 29/05/2003 e RDC nº 166 de 24/07/2017 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2003; BRASIL, 2017), e pela *International Conference on Harmonization* (ICH, 2005).

4.2.6.1. Condições cromatográficas para validação de metodologia analítica

Validou-se a metodologia analítica segundo adaptação de MOTTA *et al.* 2018 (**Tabela 02**). O equipamento utilizado foi um HPLC Agilent, modelo 1220 Infinity LC, com detector UV-Vis. A coluna utilizada foi uma C18 XSelect HSS $5\text{ }\mu\text{m}$ $4,6 \times 150\text{ mm}$ (Waters, USA).

Tabela 02. Condições cromatográficas empregadas na metodologia analítica.

Parâmetros	Condições
Modo de eluição	Isocrático
Fase Estacionária	C18
Fase Móvel	Metanol : Água (70 : 30, v/v)
Comprimento de onda	343 nm (UV)
Fluxo	$1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$
Volume de Injeção	20 μL

Tempo de Corrida	20 minutos
------------------	------------

A solução estoque foi preparada pesando-se analiticamente 26 mg de piperina e transferindo esta massa para um balão volumétrico de 25 mL, diluindo-se em metanol para obter uma solução na concentração de 1 mg.mL⁻¹. Após, uma alíquota de 400 µL foi diluída em metanol (20 mL), de modo a obter-se a solução padrão a 20 µg.mL⁻¹.

4.3. Validação do método cromatográfico

4.3.1. Adequabilidade do sistema

De modo a assegurar que os parâmetros cromatográficos selecionados são confiáveis, 5 injeções da solução de piperina (20 µg.mL⁻¹), preparada a partir da solução estoque em fase móvel, foram analisadas. O espectro de absorção do fármaco bem como o comprimento de onda de máxima absorção foi verificado e, a partir dos picos cromatográficos de cada injeção, foram calculados a média e os desvios padrões relativos percentuais (DPR%) das áreas (análise da repetitividade), dos tempos de retenção (tR), dos números de pratos teóricos (N), do fator de cauda (FC) e do fator de retenção ou fator de capacidade (k'). Os resultados foram confrontados com as recomendações preconizadas pela *Food and Drug Administration* (FDA, 2004).

4.3.2. Especificidade/seletividade

O ensaio avalia a interferência da matriz polimérica e dos meios utilizados no ensaio de dissolução, empregando-se o comprimento de onda de máxima absorção do fármaco. A especificidade/seletividade foi determinada verificando-se o resultado da injeção dos polímeros em solução e do filtrado das nanopartículas sem a piperina. Analisou-se também a interferência do meio de dissolução no cromatograma do fármaco. Todas as análises foram realizadas em triplicata com soluções de piperina e dos polímeros na concentração de 20 µg.mL⁻¹.

4.3.3. Linearidade, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

A linearidade foi determinada pela construção de curvas analíticas do padrão piperina. A partir da solução estoque (1 mg.mL⁻¹), procedeu-se a uma diluição seriada, obtendo-se amostras a 10, 20, 30, 40, e 50 µg.mL⁻¹, as quais foram deixadas em banho ultrassônico durante 30 minutos para desgaseificação, sendo posteriormente filtradas em membrana 0,45 µm (Millipore®). Estas amostras foram injetadas em triplicata e a linearidade foi avaliada a

partir da média dos valores das áreas encontradas, fornecendo a equação de regressão da reta e os coeficientes de correlação (R) e determinação (R^2). A partir da curva analítica, os limites de detecção e quantificação foram calculados empregando-se as Equações 03 e 04:

$$LD = \left(\frac{3,3 \times DP}{IC} \right) \quad (\text{Equação 03}) \qquad LQ = \left(\frac{10 \times DP}{IC} \right) \quad (\text{Equação 04})$$

Onde: LD = limite de detecção; S = desvio padrão do intercepto com o eixo y de 3 curvas de calibração; LQ = limite de quantificação; IC = inclinação da curva de calibração (coeficiente angular).

Segundo a RDC 899/2003, o LD representa a menor quantidade do fármaco presente na amostra que pode ser detectada mas não necessariamente quantificada, enquanto o LQ representa a menor quantidade de fármaco na amostra que pode ser medida com precisão e exatidão (BRASIL, 2003).

4.3.4. Precisão

A repetibilidade ou precisão intra-dia foi realizada a partir da injeção de 3 repetições de 3 diluições da solução estoque de piperina (10, 30 e 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). As injeções foram realizadas no mesmo dia e sob condições de trabalho idênticas. Para a precisão intermediária, realizou-se a análise das diluições da solução estoque de piperina em 2 dias distintos e com 2 analistas diferentes, sob as mesmas condições experimentais. Os resultados foram avaliados e expressados em relação ao DPR%, conforme a Equação 05:

$$DPR\% = \frac{DP}{CMD} \times 100 \quad (\text{Equação 05})$$

Onde: $DPR\%$ = desvio padrão relativo percentual ou coeficiente de variação (CV); DP = desvio padrão; CMD = concentração média determinada.

4.3.5. Exatidão

A exatidão do método foi determinada a partir da solução estoque de piperina diluída em fase móvel nas concentrações 5, 20 e 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Foram realizadas 3 injeções para cada concentração, procedendo-se ao cálculo de exatidão por meio da Equação 06:

$$\text{Exatidão (\%)} = \left(\frac{C_{exp}}{C_t} \right) \times 100 \quad (\text{Equação 06})$$

Onde: C_{exp} = concentração média experimental; C_t = concentração teórica.

4.4. Avaliação da eficiência de incorporação (EI%)

Uma alíquota das formulações preparadas com concentrações conhecidas foi centrifugada a 10.000 rpm durante 30 minutos. O sobrenadante foi filtrado através de membrana de acetato de celulose (0,22 µm) e a concentração de fármaco livre foi então analisada por meio do método cromatográfico validado apresentado no item 4.3 (KATIYAR *et al.*, 2015). A eficiência de incorporação percentual foi calculada a partir da média de 3 determinações, empregando-se a Equação 07:

$$EI (\%) = \left(\frac{CTF - CLF}{CTF} \right) \times 100 \quad (\text{Equação 07})$$

Onde: $EI (\%)$ = eficiência de incorporação do fármaco; CT_F = concentração teórica do fármaco na nanoformulação; CL_F = concentração do fármaco livre no sobrenadante.

4.5. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) das NPs

A morfologia das NPs foi analisada por microscopia eletrônica de varredura de alta resolução (MEV-FEG) em equipamento JEOL JSM-7500F, aplicando-se raio de 2,0 kV de intensidade. Quatro amostras foram selecionadas, liofilizadas e então diluídas na proporção 1:30 (v/v) em uma dispersão de Tween[®] 20 (0,5%, v/v), de modo a evitar que ocorresse aglomeração das partículas durante o processo de secagem. Para tanto, foi aplicada uma gota de cada amostra sobre substratos de silício, os quais foram deixados para secagem em dessecador, durante 48 h. Após, o suporte foi revestido com material condutor (carbono) e procedeu-se às análises utilizando-se o *software* PC-SEM v 2.1.0.3.

4.6. Preparo dos filmes de ácido hialurônico (AH)/alginate de sódio (AS)

Soluções de ácido hialurônico (Vitax Biochemical, China) e alginato de sódio (Sigma-Aldrich, USA) a 1%, 1,5% e 2% foram preparadas individualmente por dissolução destes biopolímeros em água destilada durante 60 minutos sob agitação constante (1000 rpm). Diferentes formulações formadoras de filme foram preparadas pela técnica da evaporação do solvente (*solvent casting*) misturando-se as soluções supramencionadas durante 30 minutos em diferentes proporções em massa (AH 1%/AS 1%, AH 1%/AS 1,5%, AH 1%/AS 2%, AH 2%/AS 1% e AH 1,5%/AS 1%) e em diferentes proporções em volume (1:1, 1:1,5, 1:2, 2:1 e 1,5:1 v/v), adicionando-se ainda um volume de glicerina correspondente a 50% em massa do peso seco dos polímeros, obtendo-se amostras com $V_{\text{Final}} = 17 \text{ mL}$. As formulações foram despejadas sobre placas de Petri de plástico, as quais foram deixadas para secar em estufa de

circulação de ar a 35 °C durante 24 horas. Após, foram recolhidas e mantidas em dessecador sob vácuo. Os ensaios seguiram o planejamento experimental apresentado abaixo:

Etapa 01: Soluções de alginato de sódio (AS) e ácido hialurônico (AH) a 1% e 2% (m/v), variando-se a proporção em volume dos polímeros.

Polímeros 1% (m/v)				Polímeros 2% (m/v)			
AH	AS	v _{AH} (mL)	v _{AS} (mL)	AH	AS	v _{AH} (mL)	v _{AS} (mL)
1	1	8,5	8,5	1	1	8,5	8,5
1	1,5	6,8	10,2	1	1,5	6,8	10,2
1	2	5,6	11,4	1	2	5,6	11,4
2	1	11,4	5,6	2	1	11,4	5,6
1,5	1	10,2	6,8	1,5	1	10,2	6,8

Etapa 02: Após a observação macroscópica das membranas formadas, foram excluídas aquelas que se apresentaram quebradiças, muito finas ou muito grossas, onduladas e/ou irregulares, além daquelas que foram difíceis de descolar da superfície das placas de Petri. Assim, optou-se por seguir com os filmes preparados na razão 1:1 (v/v), variando-se então as proporções em massa dos polímeros.

Amostra	*V _{Glicerina} (μL)	AH (% m)	m (mg)	AS (% m)	m (mg)
A	70,0	1	85,0	1	85,0
B	85,0	1	85,0	1,5	127,5
C	100,0	1	85,0	2,0	170,0
D	100,0	1,5	127,5	1,5	127,5
E	85,0	1,5	127,5	1	85,0
F	120,0	1,5	127,5	2,0	170,0
G	135,0	2,0	170,0	2,0	170,0
H	120,0	2,0	170,0	1,5	127,5
I	100,0	2,0	170,0	1,0	85,0

Etapa 03: A partir da análise macroscópica dos filmes obtidos na etapa 02, foram escolhidos aqueles que apresentaram boa maleabilidade, espessura fina e adequada resistência à tração para darem prosseguimento nos testes (filmes A, D e G). Esses filmes foram preparados novamente, variando-se agora suas proporções em volume.

Amostra	*V _{Glicerina} (μL)	AH (% V)	Volume (mL)	massa (mg)	AS (% V)	Volume (mL)	massa (mg)
---------	------------------------------	----------	-------------	------------	----------	-------------	------------

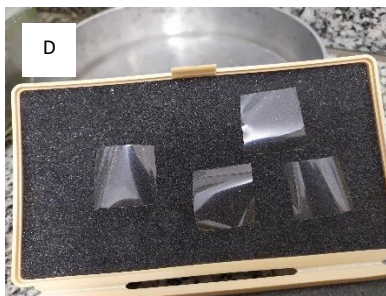
A1	70	1	6,8	68	1,5	10,2	102
D1	100	1	6,8	102	1,5	10,2	153
G1	135	1	6,8	136	1,5	10,2	204
A2	70	1	5,6	56	2,0	11,4	114
D2	100	1	5,6	84	2,0	11,4	171
G2	135	1	5,6	112	2,0	11,4	228
A3	70	1,5	10,2	102	1	6,8	68
D3	100	1,5	10,2	153	1	6,8	102
G3	135	1,5	10,2	204	1	6,8	136
A4	70	2,0	11,4	114	1	5,6	56
D4	100	2,0	11,4	171	1	5,6	84
G4	135	2,0	11,4	228	1	5,6	112

*Os volumes de glicerina foram arredondados ($\rho_{\text{glicerina}} = 1,26 \text{ g.mL}^{-1}$). A = AH/AS 1:1 (% m); D = AH/AS 1,5:1,5 (% m); G = AH/AS 2,0:2,0 (% m) .

Os filmes preparados na etapa 03 foram submetidos a ensaios de caracterização mecânica descritos na seção seguinte, de modo a serem selecionadas 3 amostras, segundo critérios analíticos, para a incorporação do fármaco nanoencapsulado (**Figura 08**).

Figura 08. Análises mecânicas dos filmes de ácido hialurônico (AH)/alginato de sódio (AS). (A) Micrômetro digital MDC-lite (Mitutoyo) (B) Filme com boas propriedades mecânicas observadas macroscopicamente (espessura, maleabilidade e resistência à tração; observar a transparência e homogeneidade da membrana); (C) Filme com propriedades mecânicas indesejáveis (quebradiça e pouco maleável; observar as rugosidades na superfície da membrana); (D) Seções de filme para análises de resistência à perfuração (R_p) e energia de perfuração por unidade de volume (EP); (E) Analisador universal de textura TA-XT2 Texture Analyser (Stable Micro Systems, UK); (F) Detalhe de uma seção de filme disposta sobre a prancha de acrílico do texturômetro.





4.7. Caracterização dos filmes poliméricos de AH/AS

4.7.1. Espessura

A espessura dos filmes foi medida em triplicata utilizando-se micrômetro digital MDC-Lite (Mitutoyo®) em 5 pontos aleatórios de seções de aproximadamente 2 x 2 cm².

4.7.2. Análises mecânicas

Propriedades mecânicas dos filmes foram registradas utilizando-se analisador universal de textura TA-XT2 *Texture Analyser* (Stable Micro Systems, UK), equipado com sonda em aço inoxidável com ponteira esférica (D = 2,5 cm). Curvas de força versus deslocamento foram registradas pelo *software* Exponent Connect Lite até o momento da ruptura do filme e utilizadas para determinar os seguintes parâmetros (MENEGUIN *et al.*, 2014):

$$Rp = \frac{F}{A} \quad (\text{Equação 08})$$

Onde: Rp = resistência à perfuração (MPa); F = força (N) requerida para a ruptura do filme; A = área da seção transversal do filme (cm²) [$A = 2rd$, onde r é o raio do orifício e d a espessura do filme];

$$AP\% = \frac{\sqrt{r^2 + d^2} - r}{r} \times 100 \quad (\text{Equação 09})$$

Onde: AP = alongamento durante a perfuração; r = raio exposto no orifício da placa; d = deslocamento do dispositivo do ponto de contato até a ruptura do filme;

$$EP = \frac{AUC}{V} \quad (\text{Equação 10})$$

Onde: EP = energia na perfuração por unidade de volume; AUC = área sob a curva (força versus deslocamento); V = volume do filme localizado no orifício da placa.

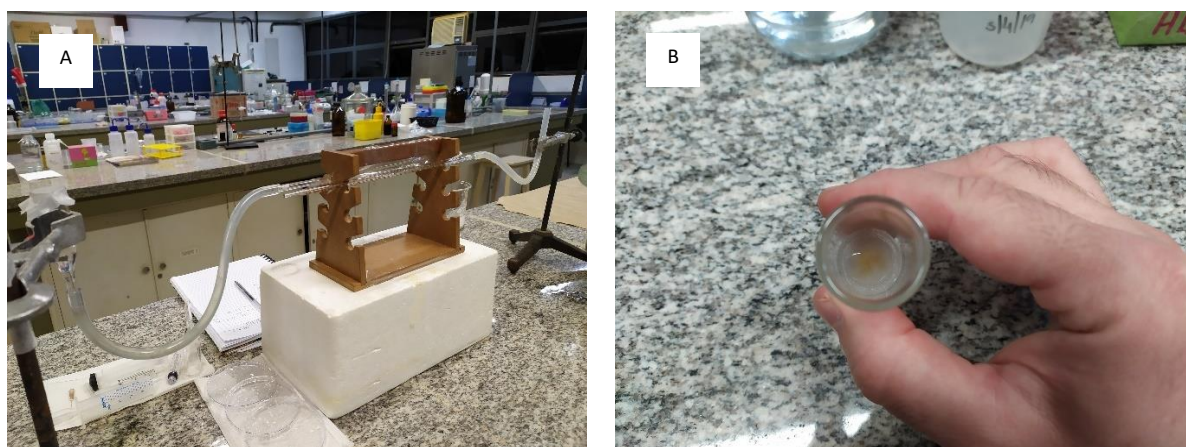
4.7.3. Perfil de intumescimento dos filmes

Uma seção de cerca de 1 cm² de cada filme foi analiticamente pesada e colocado sobre a placa de vidro sinterizada do funil do dispositivo. O sistema foi fechado com auxílio de filme de policloreto de vinila e papel alumínio. O volume de líquido absorvido pelos filmes foi avaliado após 1, 2, 5, 10, 30 e 60 minutos (**Figura 09**). Os testes foram realizados em triplicata e os resultados expressos em porcentagem de líquido absorvido em relação à massa inicial da amostra, de acordo com a Equação 11 (VOIGT, 2000; PREZOTTI *et al.*, 2012):

$$I\% = \frac{V}{m} \times 100 \quad (\text{Equação 11})$$

Onde: $I\%$ = porcentagem de intumescimento do filme; V = volume do meio absorvido (mL); m = massa do filme (g).

Figura 09. Ensaio para determinação do perfil de intumescimento dos filmes de AH/AS. **(A)** Dispositivo de Enslin adaptado, utilizando-se uma pipeta de 2 mL; **(B)** Seção de filme de cerca de 1 cm², previamente pesado, alocado na base de vidro sinterizado do funil do dispositivo.



4.7.4. Permeabilidade ao vapor de água pelo método gravimétrico.

Seções circulares dos filmes foram pesadas e firmemente fixadas no topo de recipientes de vidro de 20 mL com abertura de 1.1 cm contendo 10 mL de água destilada. Os filmes foram também fixados em frascos vazios (sem água), como referência. Ambos foram previamente pesados e colocados no interior de um dessecador contendo sílica gel (**Figura 10**). Em intervalos específicos (24, 48, 72, 96 e 120 h), o perfil de perda de massa foi obtido para cada amostra e a permeabilidade ao vapor d'água foi calculada através da Equação 12:

$$PVA = \frac{G^{\circ}.L}{A_e.P_o.(UR_1-UR_2)} \quad (\text{Equação 12})$$

Onde: PVA = permeabilidade ao vapor d'água (g.mm)/(m².dia.kPa); G° = taxa de ganho de massa (g/dia); L = espessura inicial do filme (mm); A_e = área exposta do filme (m²); P_o = pressão de saturação de vapor da água na temperatura do ensaio (KPa); $(UR_1 - UR_2)$ = gradiente de umidade relativa.

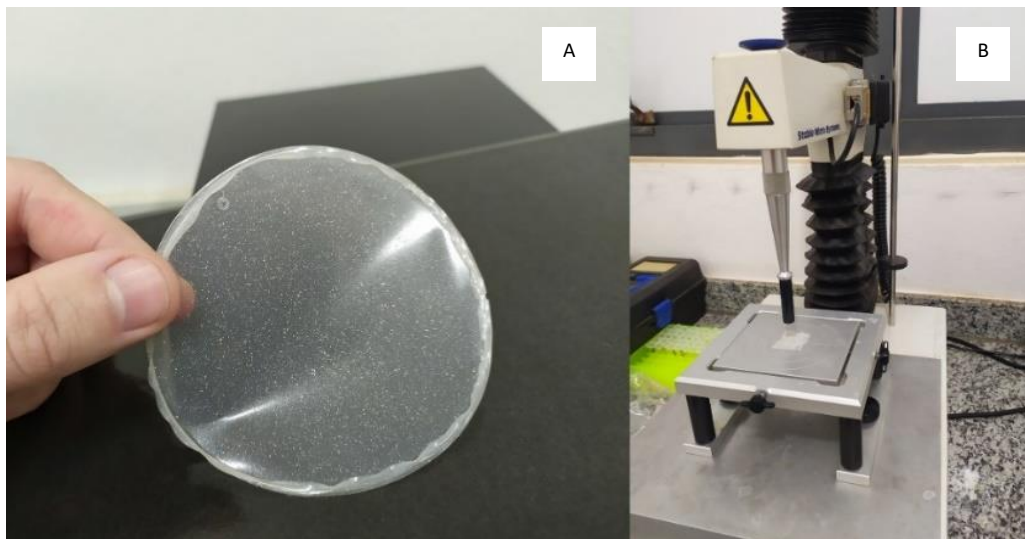
Figura 10. Ensaio de permeabilidade ao vapor d'água. **(A)** Seções circulares dos filmes poliméricos, com diâmetro similar ao do frasco de vidro utilizado, foram recortadas e fixadas na superfície interna da tampa. O sistema foi pesado inicialmente e após 24, 48, 72, 96 e 120 horas; **(B)** Frascos acondicionados em dessecador contendo sílica gel, diariamente trocada.



4.7.5. Teste de bioadesão *in vitro*

A força bioadesiva das membranas foi avaliada através da medida da força necessária para removê-las de seções de pele de porco (previamente imersas em solução salina 0,9% a 25 °C por 30 minutos), utilizando um analisador de textura TA.XT plus, operando no modo *Adesive Test* (DICK; SCOTT, 1992). Os filmes, cortados em seções de tamanho semelhante aos das peles de porco, foram aderidos à sonda cilíndrica do equipamento (10 cm de diâmetro) com uma fita dupla face. As amostras de pele também foram coladas no suporte do aparelho com a mesma fita, umedecendo-as com uma solução de pH 7,4. A sonda foi então abaixada a 0,5 N até que a pele de porco e a membrana mantivessem contato, o qual foi mantido por 60 segundos. Em seguida, a sonda foi levantada com uma velocidade constante de 0,5 mm.s⁻¹, até que ocorresse total separação das duas superfícies (**Figura 11**). A força e o trabalho máximo para a separação das amostras foram obtidos através do *software* Exponent Lite (EOUANI *et al.*, 2001).

Figura 11. Teste de bioadesão. **(A)** No detalhe, o filme de AS/AH contendo o fármaco piperina dispersado em sua matriz. Os filmes foram recortados, de modo a serem obtidas seções de cerca de 2 cm²; **(B)** Analisador universal de textura TA-XT2 equipado com sonda específica para o modo *Adesive Test*.



4.8. Preparo dos filmes contendo o fármaco e dos filmes contendo as NPs

A partir da escolha do melhor sistema polimérico para formulação dos filmes de AH/AS (Filme G4), foram preparadas as membranas com incorporação da piperina (F_{Pip}) e das nanopartículas com o fármaco (F_{NPPI}) para execução dos ensaios *in vitro* de liberação, permeação, retenção e também para os ensaios biológicos.

Para a síntese de F_{Pip} , foram adicionados cerca de 20 mg de piperina no volume de 135 μ L de glicerina, seguindo-se ao procedimento descrito na etapa 3 do item 4.6. para preparo do filme G4 (AH/AS 11,4:5,6 mL, $V_{Final} = 17$ mL, $R_{Membrana} = 4,25$ cm, $A = 56,7$ cm²). Para a síntese de F_{NPPI} , foi empregada uma proporção de 9 mL de sistema polimérico do filme G4 (AH/AS 6:3 mL) para 8 mL do nanossistema a 2,5 mg.mL⁻¹ ($V_{Final} = 17$ mL, $R_{Membrana} = 4,25$ cm, $A = 56,7$ cm²).

4.9. Teste de solubilidade

A solubilidade da piperina foi determinada em meio receptor contendo água ultrapura e tampão fosfato 7,4, adicionado de tensoativo (Tween[®] 80, Tween[®] 20, dimetilsulfóxido ou propilenoglicol) e etanol, em diferentes concentrações, para determinação das condições *sink* do estudo de liberação do fármaco. O fármaco foi adicionado em excesso nos diferentes meios

testados até a saturação, permanecendo sob agitação mecânica por 24 horas. Em seguida as amostras foram centrifugadas (3400 rpm por 10 minutos) e o sobrenadante foi filtrado em membrana filtrante (PTFE 0,22 μm). As soluções resultantes foram diluídas e analisadas por CLAE a partir do método analítico validado previamente (PRAKASH *et al.*, 2008).

4.10. Avaliação do perfil de liberação *in vitro* da piperina

O perfil de liberação da piperina nas formulações foi avaliado em equipamento Hanson Microette® (Hanson 0700-1251) constituído por 6 células de Franz com volume de 7,0 mL, preenchidas por solução receptora composta por tampão fosfato (PBS 7,4), etanol (20%, v/v) e tensoativo (Tween® 20, 2% v/v), de acordo com as condições *sink* determinadas pelo estudo de solubilidade descrito no item 4.9. Seções de cerca de 2 cm² dos filmes foram recortadas, pesadas e transferidas para o copo dosador, colocadas sobre as membranas sintéticas de poliéterssulfona e/ou celulose (0,45 μm), dispostas na célula de Franz, com área de exposição de 1,77 cm² (

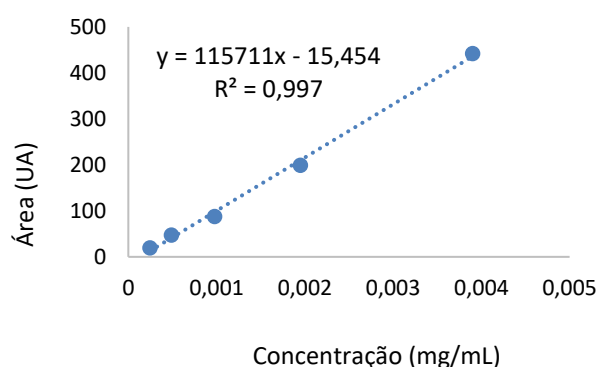
Figura 12). Os experimentos foram realizados com 6 replicatas a 32 °C e agitação constante da solução receptora (300 rpm).

Alíquotas de 2 mL foram coletadas após 15, 30 minutos, 1, 2, 4, 8, 12, 16, 20 e 24 horas, sendo então filtradas em membrana de celulose [Millipore®, 0,22 μm] (PRIMO *et al.*, 2007). A quantificação da piperina na solução receptora foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando a curva analítica obtida no estudo de solubilidade das condições *sink* (**Figura 13**):

Figura 12. Equipamento utilizado para os estudos de liberação e permeação *in vitro*. **(A)** Hanson Microette® (Hanson 0700-1251) com coletor automático; **(B)** Detalhe das células de Franz montadas com membrana de celulose de 0,45 μm .



Figura 13. Curva analítica obtida a partir do ensaio de solubilidade para se determinar as condições *sink* a serem empregadas nos ensaios de liberação e permeação *in vitro* das nanopartículas (NPs) de piperina.

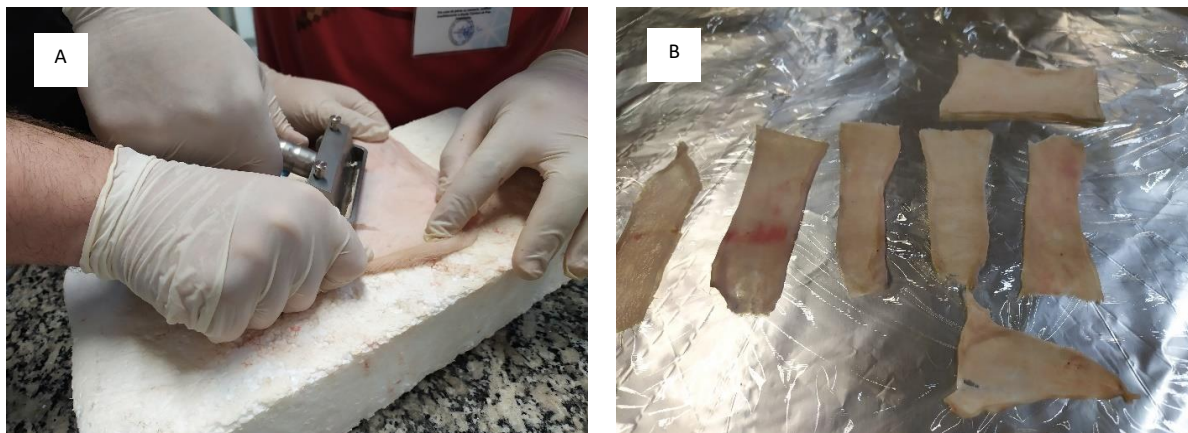


4.11. Estudo de permeação cutânea *in vitro* das NPs.

O estudo de permeação cutânea *in vitro* da piperina nas formulações foi realizado no mesmo equipamento e sob as mesmas condições do ensaio de liberação. Porém, neste ensaio foram utilizadas peles de orelha de porco como membrana biológica. A pele dermatomizada (**Figura 14**) foi inserida entre o compartimento doador e receptor da célula de Franz, de forma que, o estrato córneo ficasse em contato com a formulação, e a derme em contato com a solução receptora (PRIMO, *et al.*, 2008). A quantificação da piperina na solução receptora foi realizada por CLAE, empregando-se a equação da **Figura 13**.

Figura 14. Dermatomização de orelhas de porco compradas junto à empresa Frigodelis Ltda. para ensaio de permeação cutânea *in vitro*. (A) Extração de seções de pele com auxílio de

dermatômetro; **(B)** As seções de pele foram estendidas em folha de PVC e acondicionados em pacotes de alumínio, mantidos em freezer a -4 °C até seu uso.



4.12. Estudo de retenção cutânea *in vitro*

Para análise de retenção cutânea *in vitro* a pele de porco ficou exposta às formulações por 24 horas, nas mesmas condições experimentais da permeação cutânea *in vitro*. Ao final do experimento, as superfícies das peles foram lavadas com água destilada em abundância, a fim de remover o excesso de formulação, sendo mantidas em vidro de relógio para não haver perda do fármaco. O estrato córneo foi retirado com a técnica de *tape stripping*, de modo a se determinar a concentração de fármaco retido nessa camada da pele, utilizando-se 16 fitas adesivas (Scotch® 750 3M), descartando-se sempre a primeira (PADULA *et al.*, 2003). As fitas foram transferidas para um tubo de extração com 10 mL de metanol, agitado em vórtex por 1 minuto e posteriormente submetido ao banho de ultrassom por 15 minutos. A solução foi filtrada em membrana 0,22 µm (Millipore®) e injetada em CLAE para quantificação da piperina. Após a retirada do estrato córneo, a pele remanescente (epiderme viável + derme) foi picotada com o auxílio de uma tesoura. Os fragmentos foram colocados em tubos para centrífuga contendo 5 mL de metanol e agitados em vórtex por 2 minutos. Em seguida, foram levados ao homogeneizador Turrax® por 1 minuto, e então, deixados em banho ultrassônico por 30 minutos. Ao final, filtrou-se em membrana de 0,22 µm (Millipore®) e quantificou-se por CLAE a piperina extraída.

4.13. Ensaios biológicos

4.13.1. Ensaio de citotoxicidade

Para o preparo do meio de cultura, foi utilizado meio DMEM, com 3,5 g de glucose e 1,5 g de bicarbonato de sódio, em 900 ml de água Milli®Q. A mistura foi colocada em

agitação, e após a diluição de todos os componentes, o pH da solução foi medido, estando entre valores de 7,2 e 7,4. O meio de cultura foi filtrado à vácuo utilizando membrana de 0,22 μm de poro, e posteriormente, foram adicionados 100 ml de soro bovino fetal (FBS). O meio de cultura foi mantido em refrigerador (6 ± 2 °C) até sua utilização.

A linhagem de fibroblasto L929 foi cultivada a 37 °C em frasco de cultura (75 cm^2) contendo meio DMEM com 10% de soro fetal bovino, em atmosfera de 5% CO_2 . Inicialmente, foi depositado 1 ml de suspensão celular (1×10^6 células. ml^{-1}) em um frasco de cultura Corning, 75 cm^2 , juntamente com 10 ml de meio de cultura e encubado conforme as condições mencionadas anteriormente. Os ensaios celulares foram realizados somente quando o crescimento celular atingiu entre 75-80% de confluência na superfície do frasco. Quando a confluência desejada foi atingida, realizou-se uma suspensão celular na concentração de 2×10^5 células. ml^{-1} . Posteriormente foram pipetados 4 ml desta suspensão em cada poço (3,5 cm de diâmetro) das placas de 6 poços (Costar[®]), contendo meio DMEM com 5% de FBS. Estas placas permaneceram em estufa a 37 °C com 5% de CO_2 por 48 horas, de modo a permitir a adesão e a confluência da monocamada celular. A viabilidade celular mínima para a realização do ensaio foi de 85%, confirmada através da observação em microscópio invertido.

Após 48 horas, o meio de cultura foi aspirado e realizou-se a lavagem dos poços com 2 ml de tampão fosfato pH 7,4 (PBS). Logo após, o PBS foi aspirado e 1 ml do meio de cobertura foi adicionado em cada poço. O meio de cobertura foi composto por ágar a 1,8%, corante vermelho neutro a 0,01% e DMEM 2X concentrado (1:1 v/v). Tanto o ágar quanto o meio de cultura permaneceram em banho-maria a 40 °C até serem colocados em contato com a monocamada de células. As placas permaneceram na capela de fluxo laminar por 15 minutos, aguardando a solidificação do ágar, à temperatura ambiente. As membranas de AS/HA foram cortadas em discos com diâmetro de 0,5 cm umedecidas em meio de cultura, e foram colocados com pinças cirúrgicas no centro do poço contendo ágar. Para o controle celular, o primeiro poço recebeu apenas o meio de cobertura. Para o controle negativo, foi utilizado disco de papel filtro embebido em meio de cultura DMEM, e para o controle positivo, foi utilizado disco de papel filtro embebido em Triton-X. Todas as membranas foram testadas em triplicata. As placas foram embrulhadas em papel de alumínio, para evitar o dano celular por fotoativação do vermelho neutro e levadas à estufa a 37 °C com 5% de CO_2 por 24 horas. Após a incubação, os poços foram macroscopicamente observados, e a formação de um halo claro ao redor das amostras e dos controles positivos, evidenciou os efeitos relativos à citotoxicidade. A extensão da área descorada foi dividida em 4 quadrantes,

a partir do disco contendo as amostras. Os quadrantes foram mensurados visualmente, através de transparências milimetradas sob as placas e paquímetro, e então registradas.

4.13.2. Atividade anti-inflamatória *in vivo*

Para o estudo *in vivo*, foram utilizados machos de camundongos albinos Swiss (*Mus musculus*) pesando entre 25-30 g. O procedimento experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética para Uso de Animais (Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, UNESP), sob o protocolo CEUA/FCF/CAR nº 08/2021. Os animais foram obtidos do Biotério Central da UNESP, e o experimento ocorreu nas dependências do Biotério do Departamento de Fármacos e Medicamentos da FCFAR/UNESP. Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno em condições ambientais controladas: 23 ± 1 °C, $55 \pm 5\%$ UR, e ciclo de luz de 12 h. O suprimento de água e ração foram *ad libitum* (sem restrições). Os animais foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal de 100 mg/Kg de cloridrato de cetamina (Cetamin Syntec®, São Paulo, Brasil) e 10 mg/Kg de cloridrato de xilazina (Sipeagro®, São Paulo, Brasil). O processo inflamatório foi induzido pela administração de 20 µL de uma solução de óleo de cróton (2,5% v/v) diluído em acetona na parte interna das orelhas direitas dos animais (1 cm² aproximadamente) [MAS *et al.*, 2016]. Seis grupos experimentais com 6 animais cada (n = 36) foram utilizados, incluindo: suspensão de piperina nanoencapsulada (1 µg/mL) com 0,2% (m/v) de lauril sulfato de sódio, amostras das membranas (grupo teste e grupo controle), controle positivo com creme comercial de dexametasona 10 g (1 mg/g), e um controle negativo (sem tratamento). O tratamento consistiu na aplicação de 20 mg de cada formulação na parte interna das orelhas direitas dos animais. Seis horas depois do tratamento, os camundongos foram eutanasiados com inalação dióxido de carbono (CO₂). Após, seções circulares das orelhas foram removidas utilizando um *punch* dermatológico e então pesadas. A atividade anti-inflamatória foi expressa de acordo com a porcentagem na redução do edema comparando-se a diferença de peso em ambas orelhas (BARICEVIC *et al.*, 2001).

4.14. Análises estatísticas

Quando aplicável, as diferenças significativas entre as médias dos valores obtidos foram submetidas à análise de variância (ANOVA) seguida por comparações múltiplas pelo método de Tukey ($p < 0,05$), utilizando-se o software Minitab®19. Nos ensaios de liberação e permeação *in vitro*, foi utilizado o *software* Sigma Plot 14,5 para aplicação dos modelos cinéticos de Ordem 1, Hixon-Crowell, Higushi, e Korsmeyer-Peppas.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização das NPs

A **Tabela 03** apresenta os resultados da caracterização realizada por DLS das nanopartículas placebo – *branco (Bco)* e *branco sonicada (Bco S)* – e das nanopartículas contendo o fármaco – *nanopartículas com piperina (NPPi)* e *nanopartículas com piperina sonicada (NPPi S)*. De modo a verificar a estabilidade do sistema, leituras foram realizadas com 1, 7, 15, 30, 45 e 60 dias. Após esse tempo, os nanossistemas começaram a apresentar instabilidade física, observada pela deposição de precipitado no fundo dos tubos de ensaio e valores de tamanho, PDI e potencial zeta significativamente distintos entre a primeira e a última análise.

As médias dos valores de tamanho encontrados durante os 60 dias foram $96,35 \text{ nm} \pm 3,30$ (Bco), $147,05 \text{ nm} \pm 3,02$ (Bco S), $102,26 \text{ nm} \pm 3,65$ (NPPi) e $148,16 \pm 10,43$ (NPPi S). No geral, a sonicação das dispersões fez com que houvesse um aumento estatisticamente significativo no diâmetro das nanopartículas. Para o grupo de amostras não sonicadas houve um aumento no diâmetro das NPPi em relação ao Bco, enquanto que para o grupo de amostras sonicadas não houve diferenças de tamanho estatisticamente significantes entre NPPi S e Bco S (**Figura 15**).

Em relação ao PDI, todas as amostras apresentaram homogeneidade na distribuição de tamanho, sendo as médias encontradas menores que 0,5 (**Figura 15**), permitindo classificar os sistemas obtidos como monodispersos (GAUMET et al., 2008): $0,224 \pm 0,028$ (Bco), $0,128 \pm 0,011$ (Bco S), $0,227 \pm 0,054$ (NPPi) e $0,212 \pm 0,040$ (NPPi S).

Para o potencial zeta, as nanopartículas com adição da piperina apresentaram elevada densidade de cargas negativas ($-21,83 \text{ mV} \pm 2,60$ e $-28,4 \text{ mV} \pm 3,29$ para NPPi e NPPi S, respectivamente). Quando se comparam individualmente os placebos entre si, a amostra sonicada teve um aumento na densidade de cargas negativas em relação à amostra não sonicada ($-24,08 \text{ mV} \pm 3,17$ e $-9,89 \pm 3,17$, respectivamente).

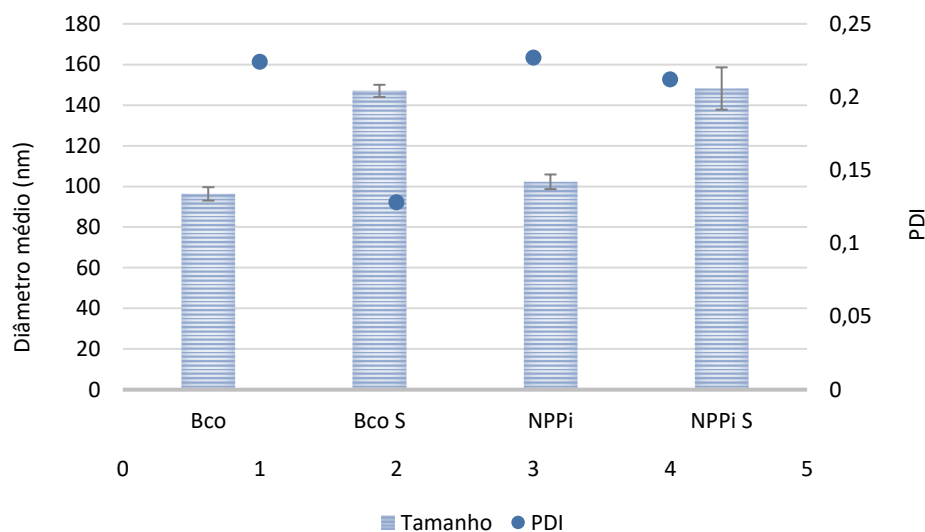
Tabela 03. Caracterização das nanopartículas com e sem incorporação da piperina segundo os parâmetros tamanho (nm), índice de polidispersividade (PDI) e potencial zeta (mV).

Amostra	Tamanho (nm)					
	Dia 1	Dia 7	Dia 15	Dia 30	Dia 45	Dia 60
Bco	$94,23^{C,c,d}$	$95,65^{C,b,c,d}$	$97,84^{C,b}$	$92,43^{C,d}$	$96,00^{B,b,c}$	$102,0^{C,a}$

	(± 0,990)	(± 0,825)	(± 0,280)	(± 0,779)	(± 0,421)	(± 2,760)
Bco S	148,8 ^{A,a}	146,5 ^{A,a,b}	150,5 ^{A,a}	141,9 ^{A,b}	145,9 ^{A,a,b}	148,7 ^{B,a}
	(± 1,457)	(± 3,897)	(± 1,365)	(± 1,429)	(± 0,700)	(± 0,723)
NPPi	104,8 ^{B,a,b}	106,6 ^{B,a}	104,1 ^{B,a,b}	101,3 ^{B,a,b,c}	96,47 ^{B,c}	100,3 ^{C,b,c}
	(± 2,307)	(± 1,595)	(± 2,501)	(± 3,484)	(± 0,176)	(± 2,061)
NPPi S	146,2 ^{A,b,c}	141,4 ^{A,c,d}	150,2 ^{A,b}	139,3 ^{A,d}	143,9 ^{A,b,c,d}	168,0 ^{A,a}
	(± 1,986)	(± 2,101)	(± 0,873)	(± 2,136)	(± 1,950)	(± 4,200)
PDI						
Amostra	Dia 1	Dia 7	Dia 15	Dia 30	Dia 45	Dia 60
Bco	0,210 ^{A,B,b,c}	0,223 ^{B,b,c}	0,238 ^{A,b}	0,203 ^{B,b,c}	0,199 ^{A,c}	0,274 ^{A,a}
	(± 0,012)	(± 0,017)	(± 0,014)	(± 0,004)	(± 0,013)	(± 0,016)
Bco S	0,130 ^{C,a}	0,144 ^{C,a}	0,136 ^{B,a}	0,115 ^{C,a}	0,114 ^{C,a}	0,131 ^{C,a}
	(± 0,034)	(± 0,017)	(± 0,011)	(± 0,015)	(± 0,010)	(± 0,011)
NPPi	0,266 ^{A,a,b}	0,302 ^{A,a}	0,227 ^{A,b,c}	0,241 ^{A,a,b}	0,161 ^{B,c}	0,169 ^{B,a,b}
	(± 0,044)	(± 0,019)	(± 0,028)	(± 0,024)	(± 0,018)	(± 0,004)
NPPi S	0,179 ^{B,C,c}	0,187 ^{B,c}	0,233 ^{A,b}	0,195 ^{B,b,c}	0,195 ^{A,B,b,c}	0,286 ^{A,a}
	(± 0,020)	(± 0,008)	(± 0,025)	(± 0,004)	(± 0,009)	(± 0,013)
Zeta (mV)						
Amostra	Dia 1	Dia 7	Dia 15	Dia 30	Dia 45	Dia 60
Bco	-9,28 ^{B,b,c}	-13,7 ^{C,b}	-13,3 ^{C,b,c}	-9,48 ^{C,b,c}	-8,30 ^{D,c}	-5,28 ^{C,a}
	(± 1,50)	(± 3,50)	(± 2,45)	(± 0,552)	(± 1,21)	(± 0,153)
Bco S	-24,6 ^{A,c}	-25,6 ^{B,b,c}	-21,2 ^{B,d}	-27,9 ^{A,a}	-25,8 ^{B,b}	-19,4 ^{B,e}
	(± 0,115)	(± 0,252)	(± 0,361)	(± 0,208)	(± 0,611)	(± 0,500)
NPPi	-25,3 ^{A,a}	-24,1 ^{B,a}	-18,7 ^{B,C,a}	-21,6 ^{B,a}	-22,1 ^{C,a}	-19,2 ^{B,a}
	(± 4,20)	(± 3,03)	(± 3,26)	(± 1,49)	(± 1,07)	(± 0,306)
NPPi S	-23,4 ^{A,d}	-33,5 ^{A,a}	-28,1 ^{A,c}	-27,9 ^{A,c}	-29,9 ^{A,b}	-27,6 ^{A,c}
	(± 0,208)	(± 0,854)	(± 0,681)	(± 0,723)	(± 0,115)	(± 0,503)

Bco S = nanopartícula placebo preparada com etapa de sonicação; NPPi S = nanopartícula com piperina preparada com etapa de sonicação. Médias que não compartilham letras maiúsculas sobrescritas iguais nas mesmas colunas ou médias que não compartilham letras minúsculas sobrescritas iguais nas mesmas linhas são significativamente diferentes pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$).

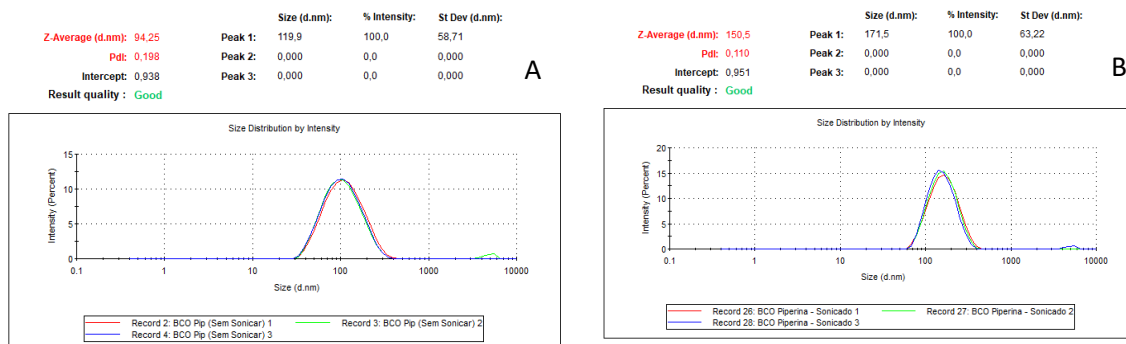
Figura 15. Diâmetro médio (nm) – representado pelas barras – e índice de polidispersão – representado pelos pontos – das nanopartículas com e sem sonicação.

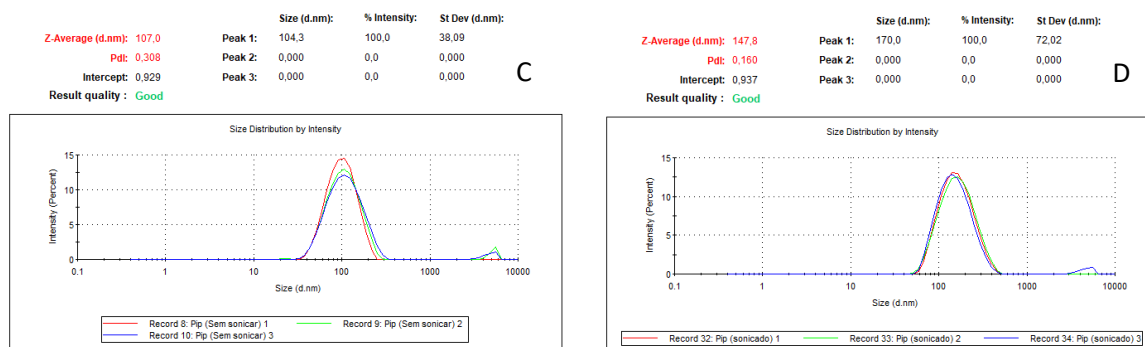


A

Figura 16 apresenta os gráficos de intensidade em função da distribuição de tamanho obtidos com *software* Zetasizer 7.13 (Malvern Panalytical, UK) para as amostras Bco, Bco S, NPPi e NPPi S. Todas as leituras forneceram resultados dentro dos padrões de qualidade esperados para amostras estáveis, utilizando valores de atenuação entre 5 e 6. A intensidade da luz espalhada dentro da célula deve estar dentro de um intervalo específico para o detector medi-la com sucesso. Se muita luz é detectada, o detector fica sobrecarregado. Para contornar isso, o atenuador é usado para reduzir a intensidade do laser e, assim, reduzir a intensidade do espalhamento.

Figura 16. Gráfico de intensidade em função da distribuição de tamanho. (A) Bco; (B) Bco S; (C) NPPi; (D) NPPi S.

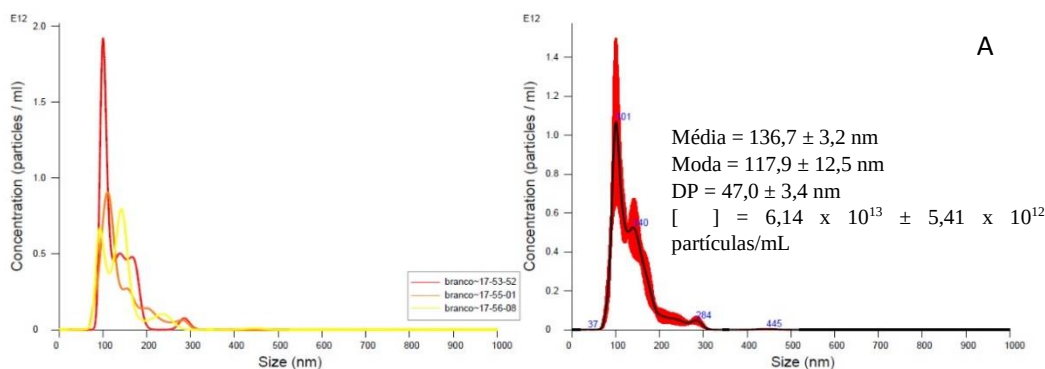


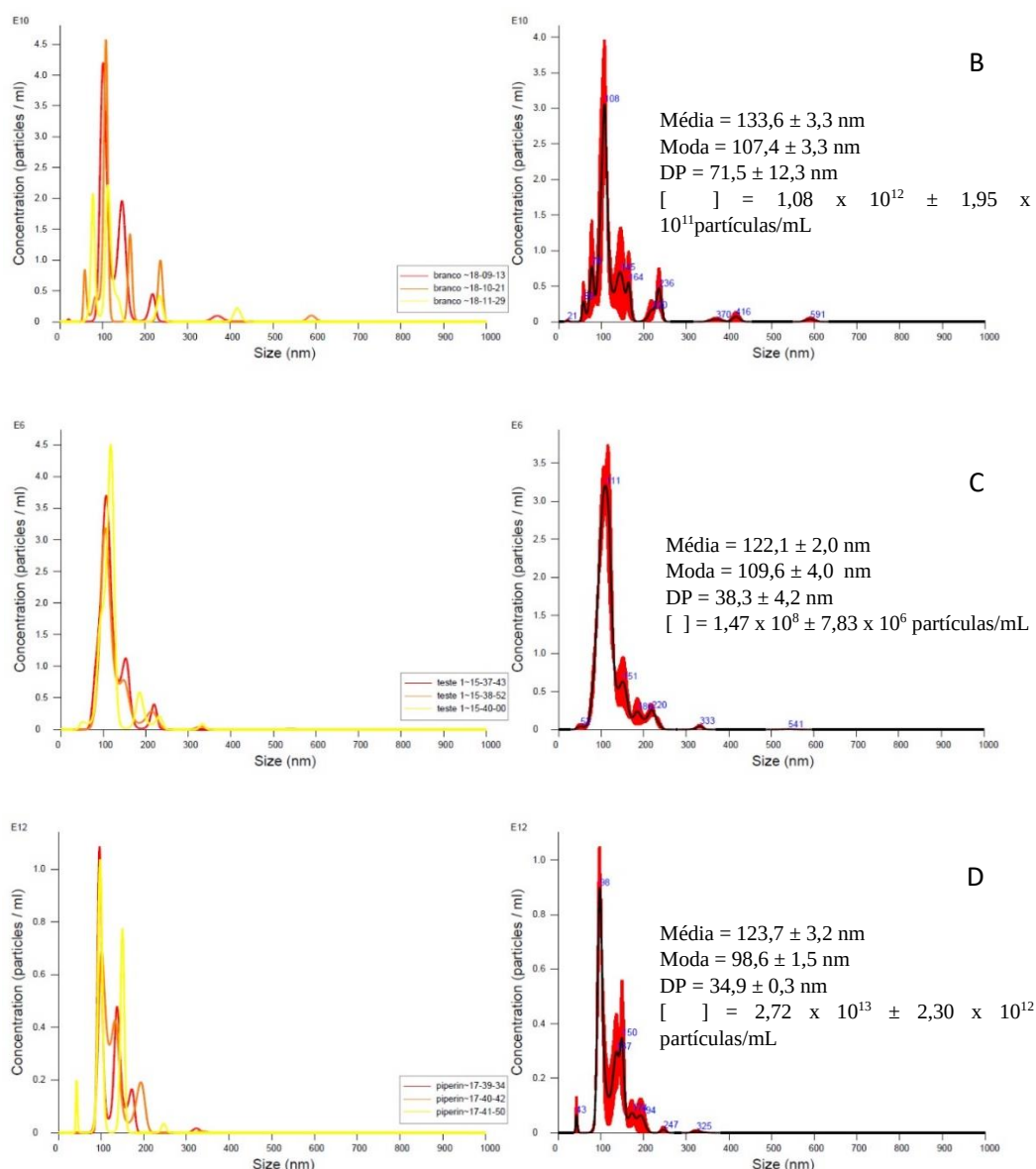


5.2. Análise de rastreamento de nanopartículas (NTA)

A **Figura 17** apresenta os gráficos obtidos a partir das análises de rastreamento das nanopartículas (NPs). Além da observação *in loco* – no qual foi possível visualizar seu formato esférico homogêneo – foi possível performar cálculos através do *software* NTA *Build* 3.4.003, os quais forneceram o tamanho médio, moda, desvio-padrão e a concentração (medida como número de partículas por mililitro de amostra diluída a 1×10^5 v/v) das NPs. Os dados obtidos através do NTA para o tamanho das NPs corroboram os já verificados pela técnica de DLS.

Figura 17. Gráficos da concentração em relação ao tamanho, obtidos por análise de rastreamento de nanopartículas (NTA). **(A)** Bco; **(B)** Bco S; **(C)** NPPi; **(D)** NPPi S. As barras de erro em vermelho indicam ± 1 desvio padrão.



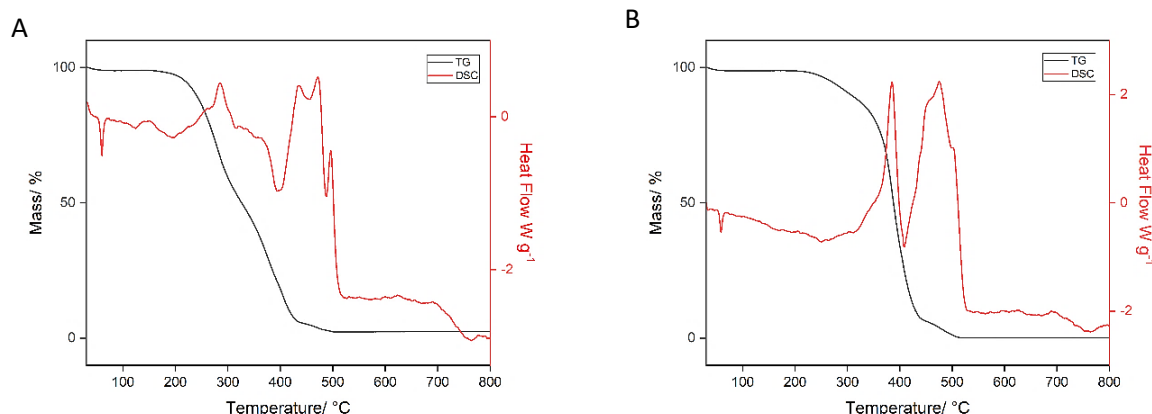


5.3. Análises de TG-DTA e DSC.

As curvas simultâneas TG-DSC de 30 °C a 800 °C do nano branco (Bco) e nano piperina (NPPi) são apresentadas na **Figura 18**. Pode-se observar que o perfil de decomposição térmica das amostras é diferente nas temperaturas abaixo de 450 °C. Ambas amostras apresentam uma pequena perda de massa inicial na curva TG até 50 °C, seguida por um evento endotérmico próximo a 53 °C na curva DSC. Este evento foi avaliado em um instrumento de ponto de fusão, não tendo sido observado a fusão das mesmas. Sugere-se que a primeira perda de massa esteja relacionada a desidratação/dessolvatação de solventes residuais, seguida de uma transição do material polimérico liofilizado representada pelo pico endotérmico agudo na curva DSC. A amostra Bco é estável até 159 °C e a partir daí perde massa em três etapas consecutivas e/ou sobrepostas, com eventos exotérmicos na curva DSC

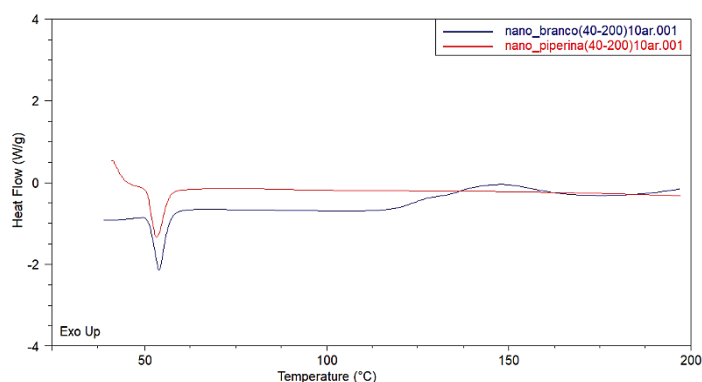
atribuídos a decomposição da matéria orgânica. A amostra NPPI apresentou estabilidade térmica ligeiramente maior (216 °C), e um perfil de decomposição de matéria orgânica diferente. Assim, pode-se concluir que a adição da piperina causa uma proteção no material, representada pelo aumento da estabilidade térmica.

Figura 18. Curvas de TG-DSC a 800 °C. **(A)** Amostras liofilizadas de nano branco (Bco); **(B)** Amostras liofilizadas de nano piperina (NPPI).



A **Figura 19** mostra as curvas DSC até 200 °C das amostras Bco e NPPI. Ambas as curvas apresentam um pico endotérmico em 53 °C atribuído à transição do material polimérico liofilizado. A análise de DSC confirma o que foi observado nas curvas TG, pois o evento exotérmico na região de 150 °C na curva azul (Bco) está relacionado ao início da decomposição térmica do material, o que não ocorre após adição da piperina (curva vermelha), uma vez que a amostra é estável até o final da temperatura de análise.

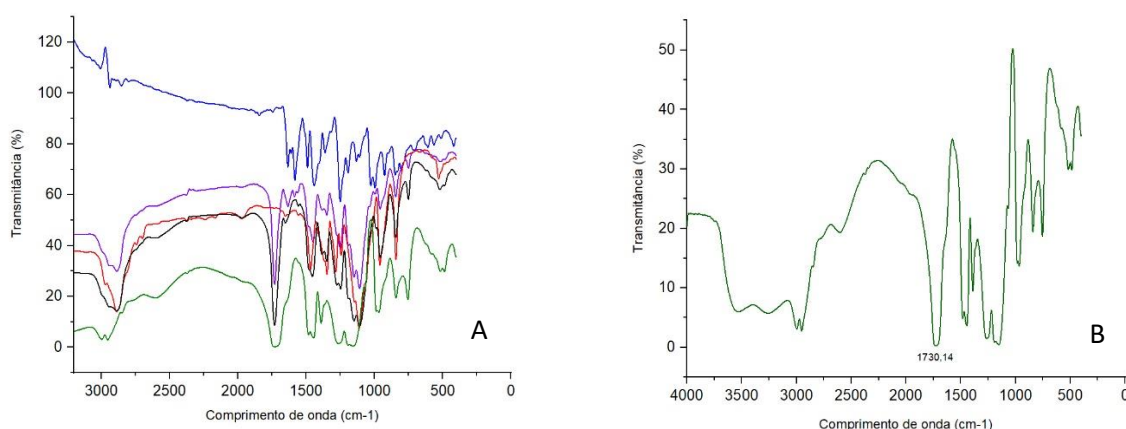
Figura 19. Curvas DSC das amostras Bco e NPPI.

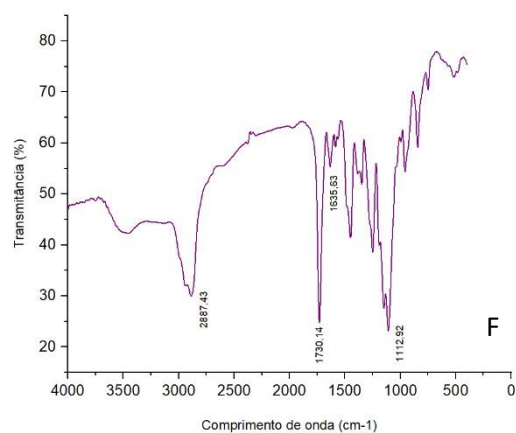
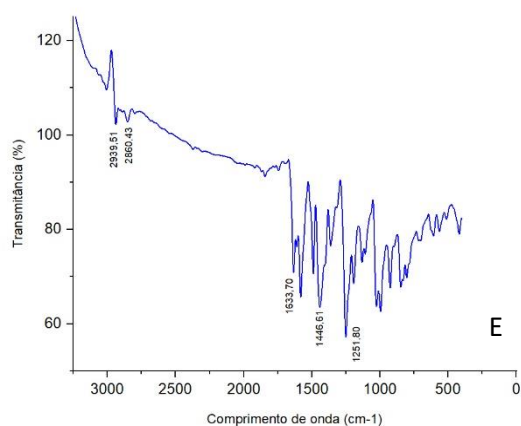
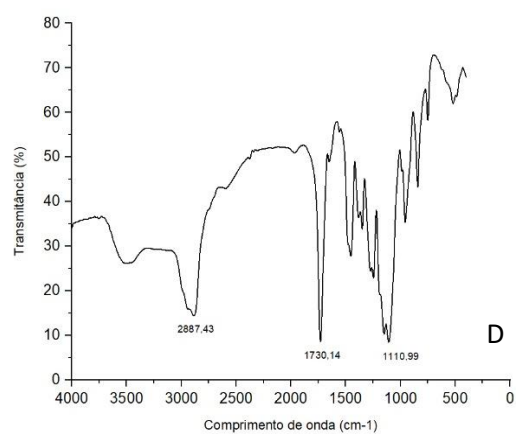
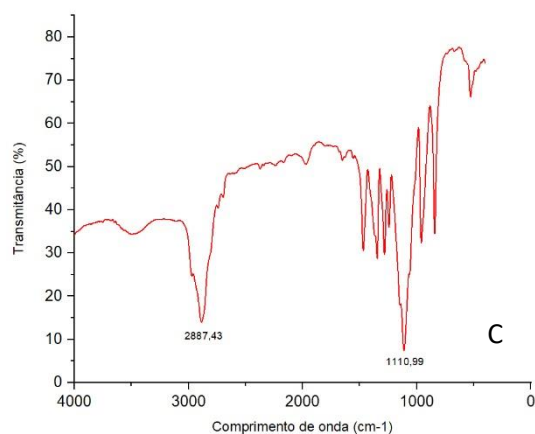


5.4. Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR).

O espectro FTIR das nanopartículas de piperina (NPPi) e também das nanopartículas sem o fármaco (Bco) foram obtidos e comparados com o da piperina, Eudragit® S100 e poloxamer 188 para ver a interação físico-química potencial após a nanoprecipitação. Conforme apresentado na **Figura 20**, a banda característica de piperina pode ser observada incluindo picos em $2939,51\text{ cm}^{-1}$ (estiramento C-H no anel aromático), $2860,43\text{ cm}^{-1}$ (estiramento C-H alifático em grupo metilenodioxi), $1633,70\text{ cm}^{-1}$ (estiramento C=O), $1446,61\text{ cm}^{-1}$ (estiramento aromático de C=C no anel de benzeno), e em $1251,80\text{ cm}^{-1}$ [estiramento assimétrico C-O-C] (SHING, 1999). O estiramento C=O da piperina também foi observada na amostra NPPi ($1635,63\text{ cm}^{-1}$). O pico caracterizado de Eudragit® S100 em $1730,14\text{ cm}^{-1}$ foi resultado da ligação C=O do estiramento, que também foram observados nas NPPi e NP Bco [$1730,14\text{ cm}^{-1}$] (EL MAGHRABY *et al.*, 2014). O espectro FTIR do poloxamer 188 mostrou picos característicos em $2887,43\text{ cm}^{-1}$ (estiramento C-H alifático) e $1110,99\text{ cm}^{-1}$ (estiramento C-O), o que está de acordo com dados da literatura (GARALA *et al.*, 2013). Esses picos também foram identificados nas NPPi ($2887,43\text{ cm}^{-1}$ e $1112,92\text{ cm}^{-1}$) e nas NP Bco ($2887,43\text{ cm}^{-1}$ e $110,99\text{ cm}^{-1}$). Nenhuma mudança significativa foi encontrada em números de onda de picos característicos em amostras de nanopartículas, indicando a ausência de interação físico-química que pudessem sugerir uma incompatibilidade para a piperina nas nanopartículas.

Figura 20. Espectros de FTIR. **(A)** Sobreposição das 5 amostras; **(B)** Eudragit® S100; **(C)** Poloxamer 188; **(D)** NP Bco; **(E)** Piperina; **(F)** NPPi.





5.5. Validação do método cromatográfico

5.5.1. Adequabilidade do sistema

Antes de realizar os experimentos de validação ou mesmo análises de amostras, é necessário avaliar se o sistema utilizado é capaz de fornecer dados de qualidade confiáveis. Esta avaliação é alcançada com os experimentos de adequabilidade do sistema, os quais podem ser definidos como um conjunto de testes executados para garantir que o equipamento utilizado está apto a gerar resultados com exatidão e precisão aceitáveis. A **Tabela 04** apresenta os resultados obtidos para esse conjunto de ensaios. No geral, os valores para cada um dos parâmetros analisados estão em acordo com as recomendações do guia revisado para validação de métodos cromatográficos do *Center for Drug Evaluation and Research (CDER)* veiculado ao *U.S. Food and Drug Administration (FDA, 2004)*.

Tabela 04. Parâmetros avaliados para adequabilidade do sistema cromatográfico.

Análise	tR	Área (UA)	k'	FC	N
1	7,29	3792943	3,314	0,97	2655

2	7,30	3796976	3,325	1,00	2598
3	7,30	3791302	3,321	1,00	2663
4	7,30	3789481	3,324	1,12	2667
5	7,30	3798100	3,324	1,00	2667
6	7,29	3784129	3,314	1,02	2655
Média	7,30	3792155	3,320	1,01	2651
DP	± 0,01	± 5128	± 0,005	± 0,05	± 26
DPR%	0,1	0,1	0,2	5,1	1,0
FDA*	NA	DPR% ≤ 1	Média > 2	Média ≤ 2	Média > 2000

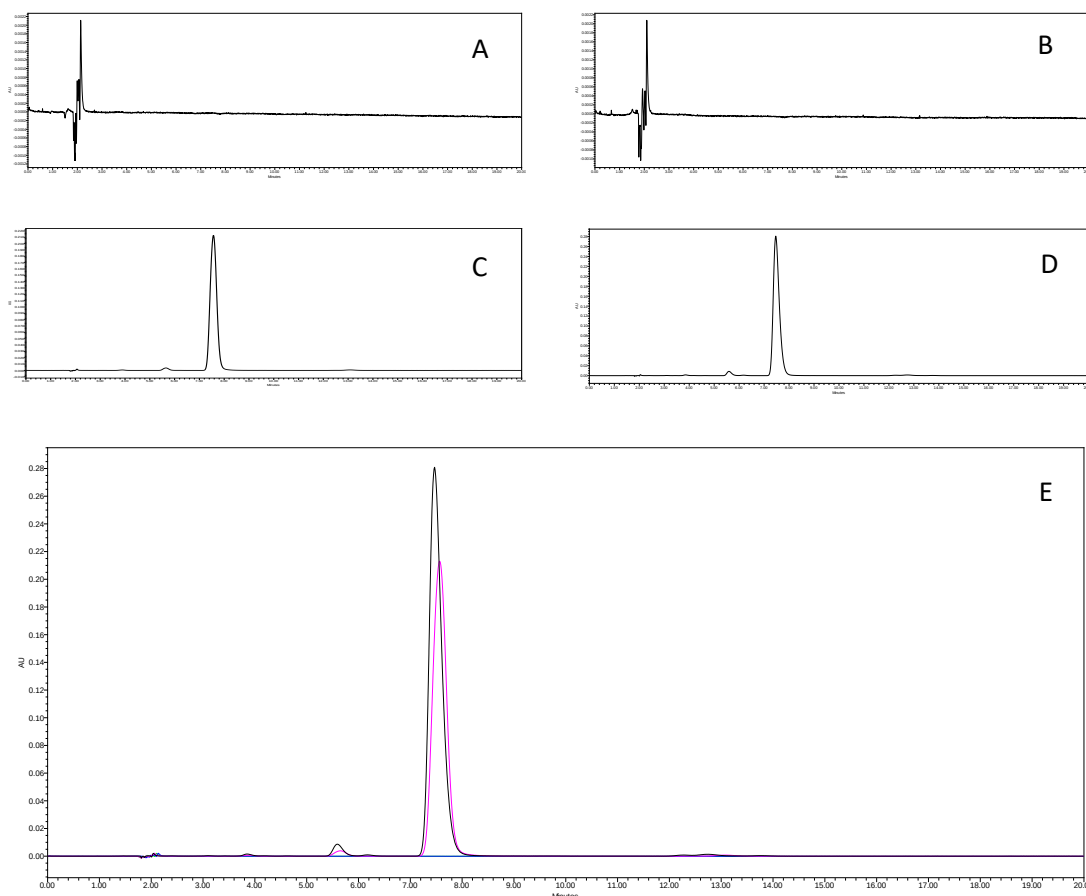
*FDA = critério de aceitação segundo recomendações do guia revisado do *Food and Drug Administration*. tR = tempo de retenção (min); k' = fator de retenção; FC = fator de cauda; N = número de pratos teóricos; NA = não aplicável.

5.5.2. Especificidade/seletividade

O parâmetro especificidade/seletividade expressa a capacidade que o método possui de quantificar com exatidão uma substância em presença de outros componentes (*e.g.* impurezas, produtos de degradação ou componentes da matriz), sem que estes interfiram no resultado da análise. Através de métodos cromatográficos, a especificidade/seletividade pode ser avaliada por meio da comparação dos resultados obtidos de amostras e dos possíveis interferentes, tais como os excipientes das nanopartículas e os meios dissolutores.

A partir da análise dos cromatogramas apresentados na **Figura 21**, pode-se afirmar que o método foi seletivo e específico, desde que não houve sobreposição de picos ou qualquer interferência do diluente ou dos polímeros no tR do fármaco. Os cromatogramas da solução padrão de piperina (97,5% pureza) e da solução de NPPi apresentaram perfil cromatográfico semelhante (**Figura 21 C e D**), com tR de máxima absorção entre 7-8 minutos (aproximadamente 7 minutos e 30 segundos).

Figura 21. Cromatogramas obtidos para o ensaio de seletividade/especificidade utilizando coluna de fase reversa C18 XSelect HSS 5 μ m 4,6 x 150 mm (Waters, USA). **(A)** Cromatograma do diluente (metanol). **(B)** Cromatograma da amostra placebo. **(C)** Cromatograma da amostra NPPi. **(D)** Cromatograma do padrão de piperina (97,5% pureza). **(E)** Sobreposição dos cromatogramas A-D (azul: metanol; verde: amostra placebo; preto: amostra NPPi; rosa: piperina).



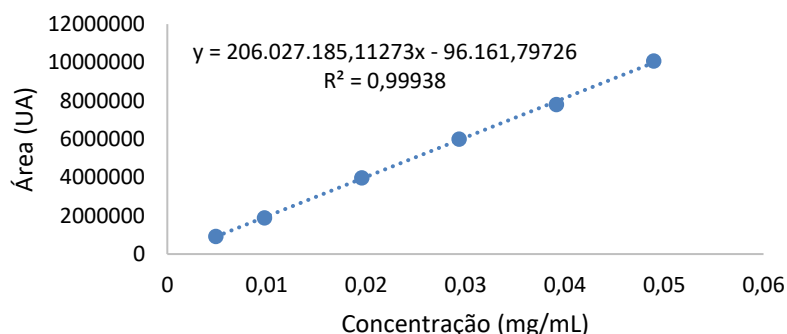
5.5.3. Linearidade, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

A linearidade representa a capacidade que o método analítico apresenta em demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do fármaco, dentro de um intervalo de concentrações definido (ICH, 2005; USP, 2011). Muitas vezes este parâmetro é erroneamente determinado através dos coeficientes de correlação (R) e determinação (R^2), porém, esses coeficientes por si só não são suficientes para garantir o ajuste da curva ao modelo linear, pois modelos com resíduos elevados ou pontos mal distribuídos (*outliers*) também podem fornecer bons coeficientes de correlação e determinação (RIBEIRO *et al.*, 2008). O método dos mínimos quadrados ordinários (MQO) é uma técnica de otimização matemática que procura encontrar o melhor ajustamento para um

conjunto de dados, minimizando os resíduos. Para que um modelo de regressão linear seja estatisticamente significativo é esperado que os resíduos gerados pelo ajuste da reta sigam distribuição normal, que a variância de y seja constante para todos os valores de x (homoscedasticidade), que não exista estrutura de dependência entre os dados (de modo que os resíduos sejam independentes e identicamente distribuídos), e também, que não haja a ocorrência de valores discrepantes (*outliers*) (BUSSAB; MORETTIN, 2010).

A **Figura 22** apresenta a curva analítica obtida pelo método MQO, sendo resultante da regressão linear dos valores das áreas em função das concentrações de piperina (0,005 mg.mL⁻¹ a 0,05 mg.mL⁻¹, $\lambda = 343$ nm), a partir da média de 3 determinações. O coeficiente de correlação $R = 0,9996$ obtido a partir da curva analítica $y = 206027185,11273x - 96161,79726$ está em conformidade com o critério de aceitação estipulado pela RDC n° 166/17, o qual determina que o valor de R deve ser maior que 0,990 (BRASIL, 2017). Esse parâmetro permite uma estimativa da qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo de 1, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza a respeito dos coeficientes de regressão estimados.

Figura 22. Curva padrão da piperina obtida pelo método cromatográfico proposto.



Através do teste F da análise de variância (ANOVA), provou-se que a regressão é estatisticamente significativa a um nível de 95% de confiança, tendo apresentado um valor de $F_{\text{calculado}} > F_{\text{crítico}}$ e $p\text{-valor} = 0$, rejeitando-se a hipótese nula de falta de ajuste do modelo linear. Em relação ao coeficiente angular, como o p -valor associado ao teste ($p = 1,51 \cdot 10^{-21}$) é menor que 0,05, a hipótese nula é rejeitada, concluindo-se que seu valor é diferente de zero (**Tabela 05**).

Tabela 05. Análise de variância da regressão linear da curva analítica de piperina.

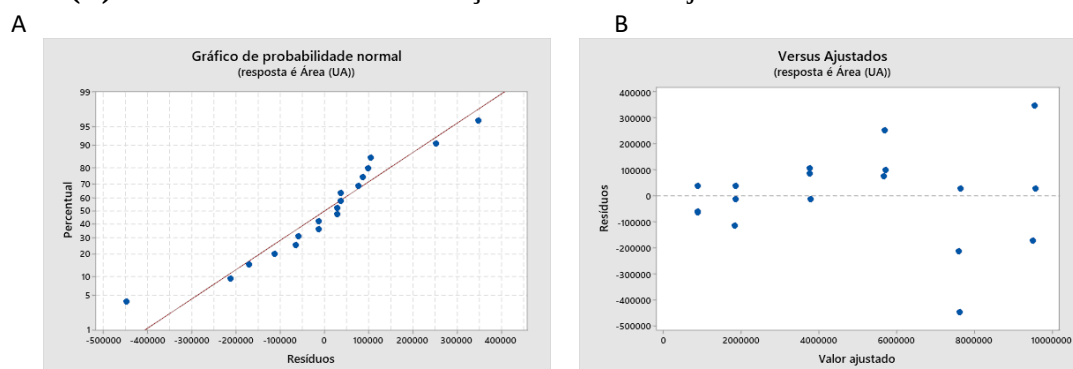
Estatística de Regressão				
R múltiplo	R^2	R^2 ajustado	DP	Observações

0,998468	0,996939	0,996748	180303,45	18		
	<i>GL</i>	<i>SQ ajustados</i>	<i>MQ ajustados</i>	<i>F calculado</i>	<i>F crítico</i>	<i>p-valor</i>
Regressão	1	1,69.10 ¹⁴	1,69.10 ¹⁴	5212,017	1,51.10 ⁻²¹	0
Resíduo	16	5,20.10 ¹¹	3,25.10 ¹⁰	-	-	-
Total	17	1,69.10 ¹⁴	-	-	-	-
	<i>Coeficientes</i>	<i>EP coeficientes</i>	<i>t-valor</i>	<i>p-valor</i>		
Interseção	-84645,8477	81001,03179	-1,044997	0,3115561		
Inclinação	196315315	2719263,102	72,19430	1,51.10 ⁻²¹		

Através da análise da **Figura 23 A**, é possível observar pelo gráfico que os resíduos são distribuídos normalmente. Em relação à **Figura 23 B**, a análise gráfica nos revela que: i) não há valores discrepantes (*outliers*); ii) a variância dos resíduos é constante; iii) há uma distribuição aleatória dos pontos, os quais encontram-se localizados em ambos os lados da linha zero, sem padrões reconhecíveis, dando indícios de que a variância dos erros experimentais é homoscedástica.

A sensibilidade do método para o composto piperina ficou evidenciada pelos valores de $LD = 0,003031 \text{ mg.mL}^{-1}$ ($3,03 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$) e $LQ = 0,009184 \text{ mg.mL}^{-1}$ ($9,18 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$), os quais demonstram a capacidade de se detectar e quantificar baixas concentrações do fármaco.

Figura 23. Gráficos de resíduos tendo a área como resposta. **(A)** Gráfico de probabilidade normal. **(B)** Gráfico de resíduos em função dos valores ajustados.



5.5.4. Precisão

O parâmetro precisão é definido como a estimativa da dispersão de resultados entre ensaios independentes repetidos a partir de uma mesma amostra, preparada conforme descrito

no método analítico a ser validado. A precisão deve ser expressa por meio da repetibilidade, da precisão intermediária ou da reprodutibilidade (INMETRO, 2020; BRASIL, 2017). A repetibilidade ou precisão intra-ensaio permite verificar a variabilidade a ser esperada quando um método é executado por um único analista, em um único laboratório, utilizando a mesma instrumentação. A precisão intermediária, ou precisão inter-ensaio, mostra a variabilidade da precisão de experimentos conduzidos em um mesmo laboratório por diferentes analistas, seja em dias ou equipamentos diferentes. Por fim, a reprodutibilidade avalia a precisão dos resultados obtidos para uma determinada análise seguindo a mesma metodologia, porém em laboratórios diferentes (EURACHEM, 2014; RIBEIRO *et al.* 2008). Neste trabalho, foram executados os dois primeiros métodos, cujos resultados podem ser observados nas **Tabela 06**.

Em relação à repetibilidade, pode-se observar que para as concentrações avaliadas, os valores encontrados estão em conformidade com os critérios de aceitação segundo descrito no *Guidelines for Standard Method Performance Requirements* da AOAC International (AOAC, 2016), a qual estipula DPR% com valores entre 5,3 e 7,3 para concentrações de analito variando entre 10 ppm e 100 ppm, e DPR% com valores entre 5,3 e 11 para concentrações de analito variando entre 1 ppm e 10 ppm. Quanto à precisão intermediária, os valores também se enquadram nos critérios do mesmo órgão, ou seja, o $DPR\%_{1/2}$ deve variar entre 8 e 11 para concentrações de analito variando entre 10 ppm e 100 ppm, e $DPR\%_{1/2}$ com valores entre 11 e 16 para concentrações de analito variando entre 1 ppm e 10 ppm.

Tabela 06. Repetibilidade (intra-ensaio) e precisão intermediária (inter-ensaio).

Analista 1			Analista 2			PI		
Nível	C _R	Área	DPR ₁	Nível	C _R	Área	DPR ₂	DPR _{1/2}
Baixo	0,005301	995967	7,3	Baixo	0,005254	986435	1,4	4,0
	0,004584	848333			0,005173	969630		
	0,005054	945101			0,005107	956190		
Média	0,004979	929800	Média	0,005178	970751			
DP (±)	0,000364	74996,8	DP (±)	0,000073	15153,6			
Médio	0,016974	3401013	6,7	Médio	0,020376	4101919	3,8	1,8
	0,019155	3850193			0,019037	3826131		
	0,019103	3839474			0,019124	3843934		
Média	0,018410	3696893	Média	0,019512	3923994			
DP (±)	0,001244	256295,9	DP (±)	0,000749	154343,8			
Alto	0,049097	10019127	1,1	Alto	0,049674	10138151	1,7	0,4
	0,048159	9825985			0,048023	9798049		

	0,04815	9824121		0,049132	10026490
Média	0,048468	9889744	Média	0,048943	9987563
DP ($\pm$)	0,000544	112052,5	DP ($\pm$)	0,000841	173360,3

Nível = nível teórico da concentração definido a partir da solução de concentração $0,02 \text{ mg.mL}^{-1}$. C_R = concentração real calculada a partir da curva analítica (mg.mL^{-1}). DPR_1 = desvio-padrão relativo (%) referente ao ensaio do analista 1. DPR_2 = desvio-padrão relativo (%) referente ao ensaio do analista 2. PI = precisão intermediária dada pelo $\text{DPR}_{1/2}$ (%) entre os ensaios executados pelos analistas 1 e 2.

5.5.5. Exatidão

A exatidão de um método analítico está definida como grau de concordância entre os resultados individuais, obtidos pelo método em estudo, em relação a um valor de referência aceito como verdadeiro. Há quatro métodos principais propostos para o estudo da exatidão: uso de material de referência certificado (MRC), comparação do método proposto com um método de referência, uso de ensaios de recuperação na matriz, e estudos colaborativos (ICH, 2005). No presente trabalho, optou-se por utilizar o método de recuperação na matriz, o mais utilizado para validação de processos analíticos. Nesse caso, a exatidão deve ser expressa pela relação percentual de recuperação do analito de concentração conhecida adicionado à amostra (**Tabela 07**). Pode-se observar que para as concentrações avaliadas, os valores encontrados estão em conformidade com os critérios de aceitação segundo descrito no *Guidelines for Standard Method Performance Requirements* da AOAC International (AOAC, 2016), a qual estipula porcentagens de recuperação com valores entre 80 e 110 para concentrações de analito variando entre 1 ppm e 10 ppm, e porcentagens de recuperação com valores entre 90 e 110 para concentrações de analito na ordem de 100 ppm.

Tabela 07. Valores de porcentagem de recuperação (média $\pm$ DP) obtidos no ensaio de determinação da exatidão do método analítico proposto.

Nível	$C_T (\text{mg.mL}^{-1})$	$C_{Exp} (\text{mg.mL}^{-1})$	Recuperação (%)	DPR%
Baixo	0,004880	0,004970	101,85	7,3
	($\pm 0,000007$)	($\pm 0,000364$)	($\pm 7,45$)	
Médio	0,019550	0,018740	95,86	3,6
	($\pm 0,000029$)	($\pm 0,000660$)	($\pm 3,46$)	
Alto	0,048890	0,048460	99,13	1,0
	($\pm 0,000073$)	($\pm 0,000543$)	($\pm 1,03$)	

C_T = concentração teórica. C_{Exp} = concentração real calculada a partir da curva analítica. DPR% = desvio-padrão relativo (%).

5.6. Eficiência de incorporação (EI%)

A eficiência de incorporação representa a porcentagem de fármaco incorporado às NPs em relação à quantidade total adicionada durante a síntese do sistema. A **Tabela 08** apresenta os valores de eficiência de incorporação para as amostras NPPi e NPPi S. Da sua análise, pode-se observar que o nanossistema preparado sem a etapa de sonicação na incorporação do fármaco apresentou uma eficiência significativamente superior em relação à amostra sonicada (76,2% e 60,7%, respectivamente). Apesar de ambos serem resultados bons, optou-se pela amostra NPPi para as etapas de incorporação destas nanopartículas em filmes poliméricos,.

Tabela 08. Eficiência de incorporação do fármaco piperina.

Amostra	CT_{Pip} (mg.mL ⁻¹)	CL_{Pip} (mg.mL ⁻¹) ± DP	EI (%) ± DP
NPPi	1,0023	0,2385 (± 0,001)	76,2015 ^a (± 0,102)
NPPi S	1,0018	0,3930 (± 0,043)	60,7702 ^b (± 4,367)

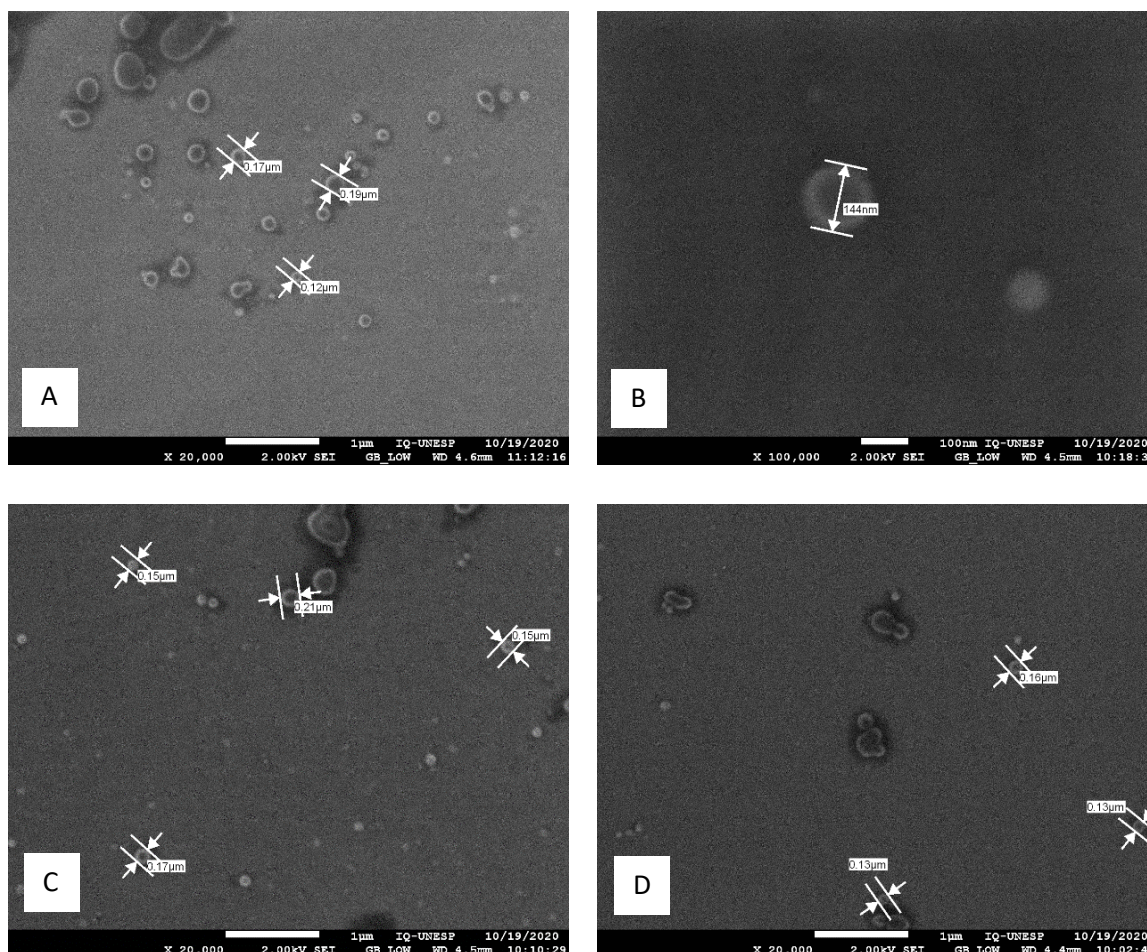
CT_{Pip} = concentração teórica da piperina; CL_{Pip} = concentração livre da piperina; A equação do método analítico utilizada foi: $y = 196.315.315,04763x - 84.645,84779$. Médias que não compartilham letras sobrescritas iguais nas colunas são significativamente diferentes pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$).

5.7. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) é usualmente considerada a mais apropriada técnica de imagem para a caracterização de nanopartículas dos mais variados tamanhos, formas, arranjo e grau de aglomeração. Um feixe de elétrons acelerados entre 5-30 keV é focalizado sobre a amostra, e as cargas refletidas (parte espalhada) são coletadas para formar uma imagem (YAO & WANG, 2005). Uma das razões para a técnica ser tão empregada é sua capacidade de resolução (menor que 1-2 nm), fornecendo imagens com aparências tridimensionais com ótimo contraste de fundo. No presente estudo, foram observados o tamanho, a morfologia e o grau de agregação das amostras branco, branco S, NPPi e NPPi S (**Figura 24**). No geral, verificou-se que tanto as NPs dos grupos placebo, quanto as NPs com o fármaco incorporado, apresentaram-se esféricas e homogeneamente distribuídas no campo de observação. As amostras sonicadas apresentaram-se mais aglomeradas em comparação às amostra não sonicadas. A sonicação, em um primeiro momento, diminui o tamanho das NPs, aumentando a razão área superficial/volume. Num

segundo momento, a energia vibracional fornecida ao sistema favorece o aumento da frequência de colisões das NPs, justificando a formação de agregados (a adesão de partículas, especialmente devido às forças de Van der Waals, aumenta quando o tamanho das partículas diminui). Tal fato poderia explicar o porquê de terem sido observados diâmetros maiores nas NPs sonicadas em relação às NPs não sonicadas quando medidos por DLS, pois ao serem analisadas individualmente por MEV, constata-se que as primeiras são ligeiramente menores ($\varnothing_{\text{Médio NPPi S}} = 140 \text{ nm}$ e $\varnothing_{\text{Médio NPPi}} = 170 \text{ nm}$). Há de se mencionar que a MEV não é uma forma apropriada de medição do diâmetro das partículas, uma vez que durante o preparo das amostras para observação no equipamento ocorrem fusões e derretimentos poliméricos.

Figura 24. Microscopia eletrônica de varredura das nanopartículas preparadas pelo método de nanoprecipitação. **(A)** Branco, aumento $\times 20.000$; **(B)** Branco S, aumento $\times 100.000$; **(C)** NPPi, aumento $\times 20.000$; **(D)** NPPi S, aumento $\times 20.000$.



5.8. Preparo e caracterização dos filmes poliméricos de AH/AS

Muitas características físico-químicas e mecânicas devem ser levadas em consideração no delineamento de membranas visando a aplicação em doenças inflamatórias na pele.

Membranas finas ou espessas, propriedades semipermeáveis ou permeáveis, com capacidade ou não de absorver exsudatos, além de capacidade adesiva ou não adesiva. Um parâmetro importante a ser considerado no preparo de membranas bioativas para aplicação em doenças inflamatórias é o seu comportamento frente aos exsudatos, pois isso será responsável por determinar o sucesso da adesão da membrana, tempo de permanência no local de ação, liberação do ativo, resistência mecânica e reepitelização. Nesse sentido, a ação farmacológica de membranas bioativas depende de sua hidrofiliabilidade, espessura, absorção de líquido e permeabilidade ao vapor de água (COSTA *et al.*, 2020; DUTRA *et al.*, 2017).

A partir de um universo inicial com mais de 40 amostras, foram selecionados 3 filmes (A4, D3 e G4), um para cada grupo, empregando-se como critério de escolha os que apresentaram espessuras mais finas, além de porcentagem de alongamento durante a perfuração (%AP) e resistência a perfuração (Rp) maiores (**Tabela 09** e **Figura 25**).

Tabela 09. Parâmetros analisados na caracterização mecânica dos filmes de ácido hialurônico (AH)/alginate de sódio (AS). Os resultados são expressos como a média $\pm$ desvio padrão.

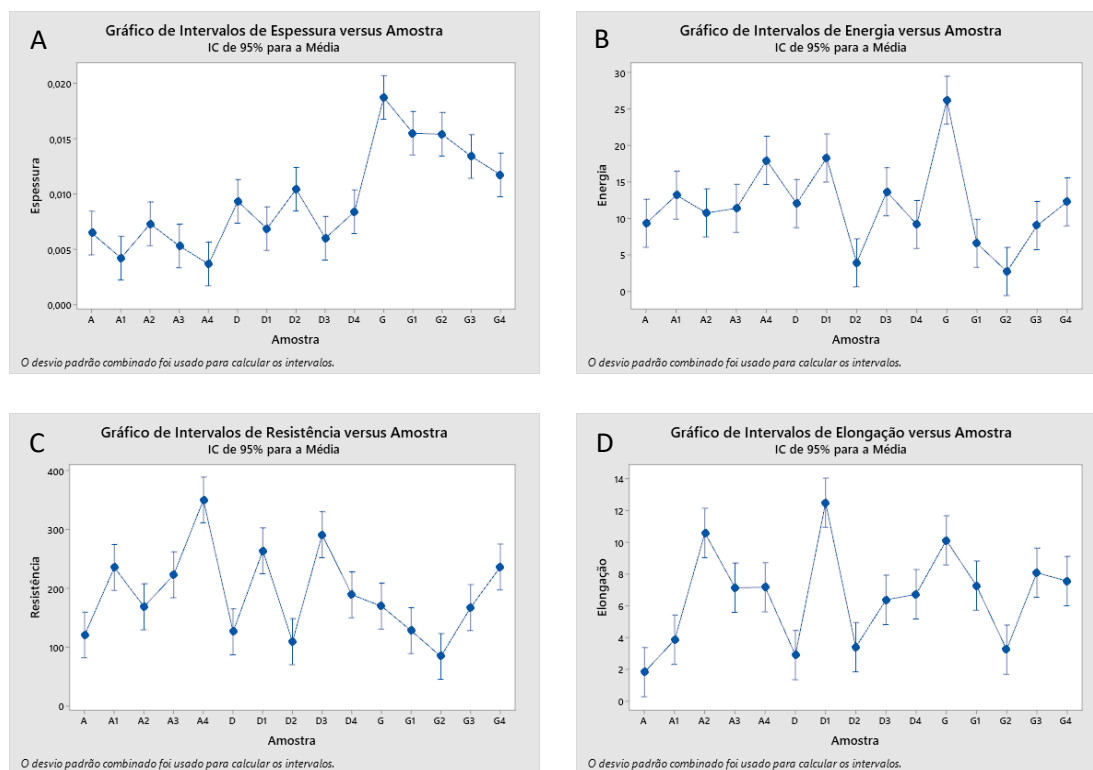
Amostra	Espessura (mm)	AP (%)	Rp (MPa)	EP (N.s ⁻¹ /mm ³)
A	0,006 ^{f,g,h}	1,822 ^h	120,643 ^{e,f}	9,326 ^{c,d,e}
	($\pm$ 0,001)	($\pm$ 0,075)	($\pm$ 17,531)	($\pm$ 1,231)
A1	0,004 ^h	3,868 ^{d,e,f,g,h}	235,506 ^{b,c}	13,192 ^{b,c}
	($\pm$ 0,001)	($\pm$ 1,569)	($\pm$ 35,349)	($\pm$ 5,236)
A2	0,007 ^{e,f,g,h}	10,591 ^{a,b}	168,683 ^{c,d,e,f}	10,752 ^{b,c,d,e}
	($\pm$ 0,001)	($\pm$ 1,465)	($\pm$ 6,473)	($\pm$ 1,201)
A3	0,005 ^{g,h}	7,142 ^{b,c,d,e,f}	223,046 ^{b,c,d}	11,383 ^{b,c,d}
	($\pm$ 0,001)	($\pm$ 2,025)	($\pm$ 42,998)	($\pm$ 3,893)
A4	0,004 ^h	7,166 ^{b,c,d,e,f}	350,394 ^a	17,962 ^{a,b}
	($\pm$ 0,001)	($\pm$ 1,277)	($\pm$ 36,630)	($\pm$ 3,546)
D	0,009 ^{d,e,f,g}	2,898 ^{g,h}	126,034 ^{d,e,f}	12,035 ^{b,c,d}
	($\pm$ 0,001)	($\pm$ 1,012)	($\pm$ 39,164)	($\pm$ 5,072)
D1	0,007 ^{e,f,g,h}	12,501 ^a	263,938 ^{a,b,c}	18,280 ^{a,b}
	($\pm$ 0,002)	($\pm$ 1,388)	($\pm$ 33,033)	($\pm$ 2,665)
D2	0,010 ^{c,d,e,f}	3,394 ^{e,f,g,h}	109,338 ^{e,f}	3,909 ^{d,e}
	($\pm$ 0,001)	($\pm$ 1,587)	($\pm$ 45,279)	($\pm$ 2,187)
D3	0,006 ^{f,g,h}	6,376 ^{c,d,e,f,g}	291,371 ^{a,b}	13,654 ^{b,c}
	($\pm$ 0,001)	($\pm$ 0,648)	($\pm$ 59,637)	($\pm$ 2,238)
D4	0,008 ^{d,e,f,g,h}	6,731 ^{b,c,d,e,f,g}	189,024 ^{c,d,e}	9,162 ^{c,d,e}
	($\pm$ 0,001)	($\pm$ 0,912)	($\pm$ 16,054)	($\pm$ 0,888)

G	0,019 ^a (± 0,005)	10,129 ^{a,b,c} (± 0,793)	169,666 ^{c,d,e,f} (± 36,735)	26,209 ^a (± 2,527)
G1	0,016 ^{a,b} (± 0,001)	7,273 ^{b,c,d,e} (± 2,399)	127,925 ^{d,e,f} (± 21,368)	6,581 ^{c,d,e} (± 1,960)
G2	0,015 ^{a,b,c} (± 0,001)	3,238 ^{f,g,h} (± 0,624)	84,132 ^f (± 8,362)	2,711 ^e (± 0,358)
G3	0,013 ^{b,c,d} (± 0,001)	8,089 ^{b,c} (± 0,231)	167,175 ^{c,d,e,f} (± 16,966)	9,007 ^{c,d,e} (± 0,910)
G4	0,012 ^{b,c,d,e} (± 0,002)	7,560 ^{b,c,d} (± 1,451)	236,266 ^{b,c} (± 31,966)	12,272 ^{b,c,d} (± 2,174)

Médias que não compartilham letras sobrescritas iguais nas colunas são significativamente diferentes pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$). AP (%) = porcentagem de alongamento durante a perfuração; Rp = resistência à perfuração; EP = energia de perfuração por unidade de volume.

A espessura pode ser considerada um parâmetro determinante na função de uma barreira e pode influenciar diretamente os resultados das análises de absorção de líquidos, solubilidade e permeabilidade ao vapor de água (COSTA *et al.*, 2020). Entre as 3 membranas analisadas, a membrana G4 apresentou maior espessura quando comparada com as membranas A4 e D3, com uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$), fato associado a maior concentração de polímeros nessas amostras. Em adição, a membrana G4 apresentou-se mais fraca mecanicamente (menores valores de Rp) que as demais membranas, sugerindo ligações mais frouxas, tendo variado de 120,6 MPa (Filme A) a 350,3 MPa (Filme A4). Redução de propriedades mecânicas de membranas relacionadas à maior quantidade de polímeros também foi relatada por outros autores (AL-HASSAN; NORZIAH, 2012; COSTA *et al.*, 2020; MENEGUIN *et al.*, 2014). Os valores de energia (EP) estão de acordo com os demais resultados apresentados, uma vez que as membranas com maiores valores de Rp (mais fortes mecanicamente) exibiram os maiores valores de energia. A porcentagem de alongamento na ruptura (AP%) não apresentou diferença significativa entre as membranas, com valores entre 1,8 (Filme A) e 12,5 (Filme D1).

Figura 25. Gráficos dos parâmetros analisados na caracterização mecânica dos filmes de AH/AS. **(A)** Espessura; **(B)** Energia de perfuração por unidade de volume; **(C)** Resistência a perfuração; **(D)** Porcentagem de elongação antes da ruptura.



A partir destes 3 filmes preliminarmente selecionados, ensaios de caracterização mecânica foram realizados para a escolha da membrana mais adequada para incorporação do nanossistema contendo a piperina, empregando-se como critério, os resultados dos ensaios de porcentagem de intumescimento e permeabilidade ao vapor de água.

A **Figura 26** apresenta os resultados do ensaio de intumescimento empregando-se um dispositivo de Enslin adaptado para os filmes A4, D3 e G4. Visualmente, os 3 filmes apresentam poucas dissimilaridades, sendo o G4 o mais espesso deles. Quando analisamos a cinética de absorção de água, porém, verifica-se que há uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre o G4 e os outros 2 filmes (**Tabela 10**). Outrossim, apesar do filme G4 ser o que menos absorveu água ao longo dos 60 minutos iniciais, ele apresenta os dados melhor ajustados num modelo de regressão linear, com $R^2 = 0,9406$. A membrana D3, por sua vez, apresentou taxa de absorção de líquidos elevada (maior hidrofília) quando comparada as demais, com uma diferença significativa ($p < 0,05$). Em relação a composição das membranas, a D3 apresenta maior concentração de alginato de sódio quando comparado às outras duas. O aumento da concentração de alginato nas membranas aumenta a

molhabilidade e hidrofiliçidade das mesmas e pode ser atribuído ao aumento de grupos hidrofílicos livres. Tais achados estão em concordância com outros estudos (DUTRA *et al.*, 2017; SUN *et al.*, 2013).

Figura 26. Perfil de intumescimento dos filmes poliméricos de AS/AH. **(A)** Filme A4 e sua curva de regressão linear; **(B)** Filme D3 e sua curva de regressão linear; **(C)** Filme G4 e sua curva de regressão linear.

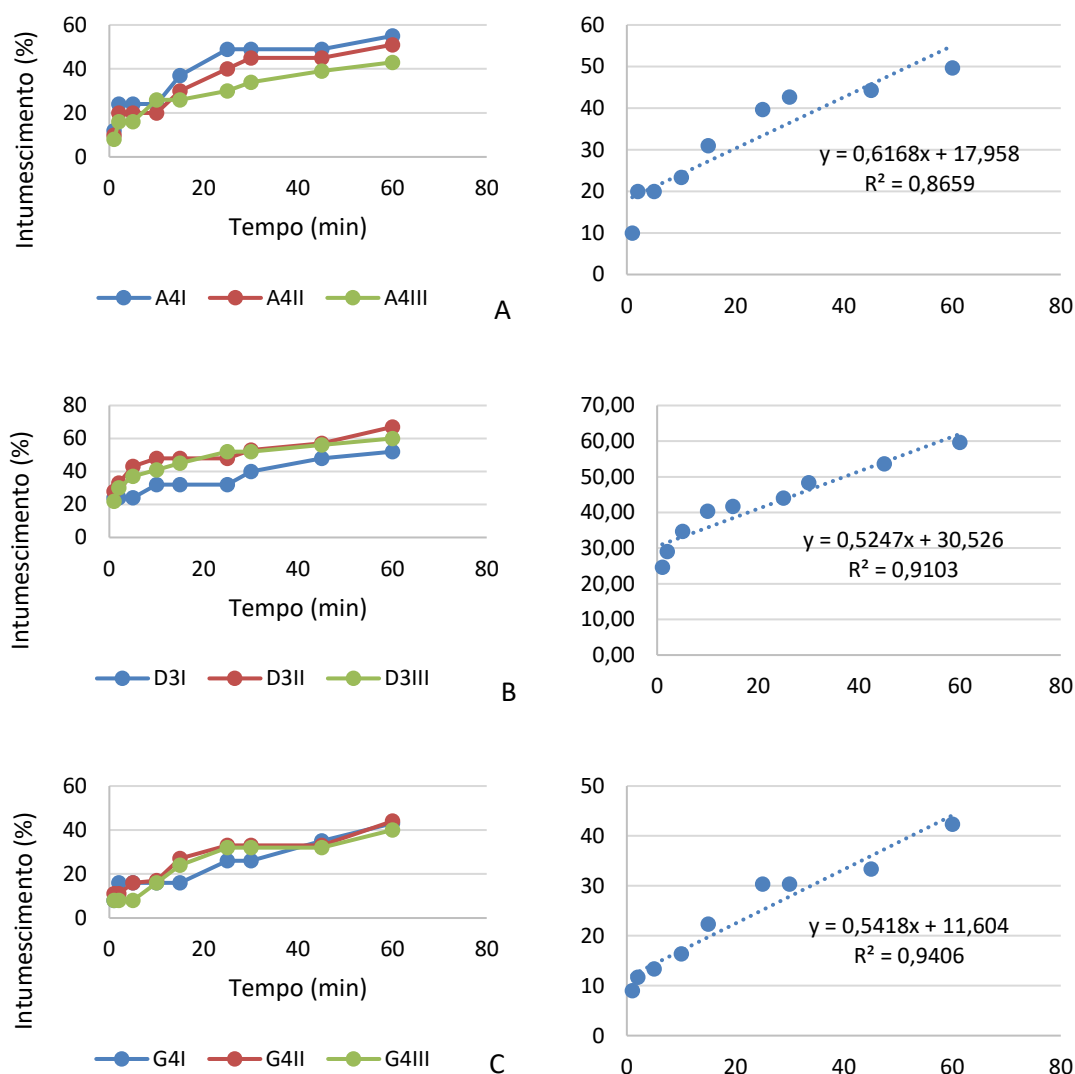


Tabela 10. Perfil de intumescimento dos filmes A4, D3 e G4.

Tempo	Média ± DP		
	A4 (%)	D3 (%)	G4 (%)
1	10,00 ^b ± (2,00)	24,67 ^a ± (3,06)	9,00 ^b ± (1,73)

2	20,00 ^{a,b} ± (4,00)	29,00 ^a ± (4,58)	11,67 ^b ± (4,04)
5	20,00 ^{a,b} ± (4,00)	34,67 ^a ± (9,71)	13,33 ^b ± (4,62)
10	23,33 ^b ± (3,06)	40,33 ^a ± (8,02)	16,33 ^b ± (0,58)
15	31,00 ^{a,b} ± (5,57)	41,67 ^a ± (8,50)	22,33 ^b ± (5,69)
25	39,67 ^a ± (9,50)	44,00 ^a ± (10,58)	30,33 ^a ± (3,79)
30	42,67 ^{a,b} ± (7,77)	48,33 ^a ± (7,23)	30,33 ^b ± (3,79)
45	44,33 ^a ± (5,03)	53,67 ^a ± (4,93)	33,33 ^b ± (1,53)
60	49,67 ^{a,b} ± (6,11)	59,67 ^a ± (7,51)	42,33 ^b ± (2,08)

Médias que não compartilham letras sobrescritas iguais nas mesmas linhas são significativamente diferentes pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$).

O processo de cicatrização de doenças inflamatórias da pele envolve o desenvolvimento de fibroblastos e tecidos no local da inflamação, além de capilares. O tecido desenvolvido pode responder a fatores externos distintos, entre eles, traumas mecânicos que podem ser originados durante o desenvolvimento do novo tecido. Para que esses traumas sejam evitados o ideal é que as membranas não induzam a formação de coágulos no local de ação. Além disso, a capacidade de manter a umidade do local inflamado também define o sucesso do tratamento com membranas. Além de ser hidrofílica, a membrana deve ser capaz de adsorver os exsudatos e manter o local úmido e ao mesmo tempo manter sua integridade. Dessa forma, a determinação do perfil de absorção de líquidos, é uma medida que pode prever o sucesso das biomembranas (DUTRA *et al.*, 2017).

Existem 2 classificações de intumescimento: o ilimitado e o limitado. O primeiro culmina espontaneamente na dissolução total. As moléculas do solvente possuem maior mobilidade do que as moléculas do polímero. Desta maneira, as moléculas do polímero necessitam de um certo tempo para se integrar na fase do solvente. Como consequência, antes de se dissolver, o polímero absorve grande parte do solvente, ou seja, intumescce. Quando a interação do polímero com o solvente é limitada ao estágio de sorção do líquido pelo polímero, a dissolução espontânea não ocorre, ou seja, as cadeias poliméricas não se separam completamente umas das outras. Ocorre a formação de 2 fases: a solução do líquido no polímero e uma outra do solvente puro ou de uma solução bem diluída de polímero. Se o polímero é composto por uma rede tridimensional formada através de ligações químicas entre as cadeias poliméricas, estas cadeias não se separam a qualquer temperatura (abaixo da decomposição do polímero). Eles não se dissolvem e o processo de dissolução é limitado ao

estágio de intumescimento, sendo este o caso dos filmes de alginato de cálcio (ZACTITI; KIECKBUSCH, 2006).

Em relação doenças inflamatórias da pele, a perda de líquido em excesso e a retenção são parâmetros que influenciam diretamente para uma má cicatrização. Um equilíbrio de umidade é fundamental no processo de cicatrização, dessa forma membranas semipermeáveis são desejáveis (COSTA *et al.*, 2020). Relatos na literatura apontam que membranas semipermeáveis apresentam resultados mais rápidos em processos inflamatórios que membranas totalmente oclusivas (VISSCHER *et al.*, 2001). A qualificação de filmes em relação a suas propriedades de barreira ao vapor de água pode ser estabelecida através da comparação com algum material já existente no mercado. Uma forma apresentada por KROCHTA; MULDER-JOHNSTON (1997) é a definição de faixas de valores que corresponderão a filmes com boas, moderadas ou pobres propriedades de barreira, conforme mostrado na **Tabela 11**.

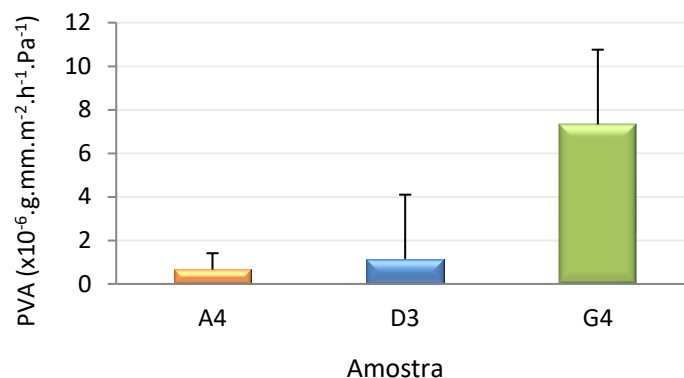
Tabela 11. Classificação da permeabilidade ao vapor de água (PVA).

Propriedades	PVA (g.mm.m ⁻² .h ⁻¹ .Pa ⁻¹)
Pobre	10 - 100
Moderada	0,10 - 10
Boa	0,01 – 0,10

Os resultados obtidos neste trabalho indicam a membrana G4 com maior taxa de permeabilidade quando comparada as demais membranas analisadas, com diferença significativa ($p < 0.05$), e tais achados podem sugerir que membranas com ligação mais frouxas apresentam maior facilidade na difusão de moléculas de água através da membrana (

Figura 27). De acordo com a **Tabela 11**, as membranas A4 e D3 foram classificadas como boas e a membrana G4 como moderada (semi-permeável).

Figura 27. Permeabilidade ao vapor de água dos filmes de AS/AH.



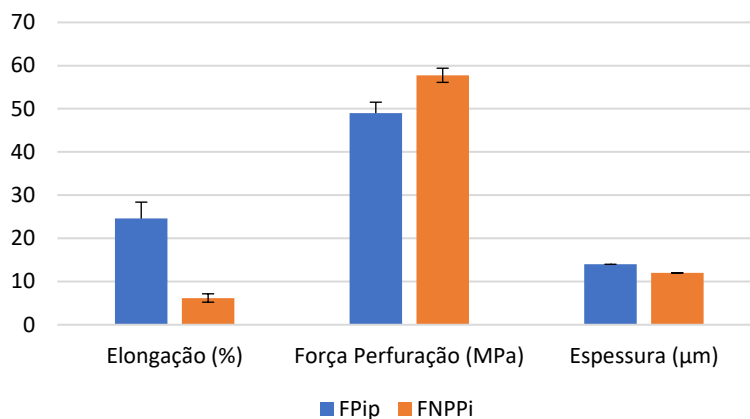
Informações de agrupamento usando método de Tukey e 95% de confiança.

Considerando-se os 2 ensaios (intumescimento e PVA), o filme selecionado para a incorporação do fármaco e do nanossistema (F_{Pip} e F_{NPPi} , respectivamente) foi o G4, por apresentar um perfil de intumescimento mais preditivo e ser classificado como semipermeável ao vapor d'água (permeabilidade moderada). Além disso, sua translucidez, maleabilidade, adesividade, boa resistência mecânica e espessura adequada corroboram a escolha.

A

Figura 28 apresenta os resultados de caracterização mecânica dos filmes G4 preparados apenas com o fármaco (F_{Pip}) e preparados com o nanossistema (F_{NPPi}). Com exceção da porcentagem de alongação, a qual varia significativamente entre F_{Pip} e F_{NPPi} , os demais parâmetros analisados não apresentam diferenças significativas com $p < 0,05$. A adição da matriz polimérica contendo o nanossistema tornou a estrutura do filme G4 mais rígida, sendo menos susceptível à alongação antes de sua ruptura, diminuindo praticamente pela metade sua capacidade de resistir ao rompimento.

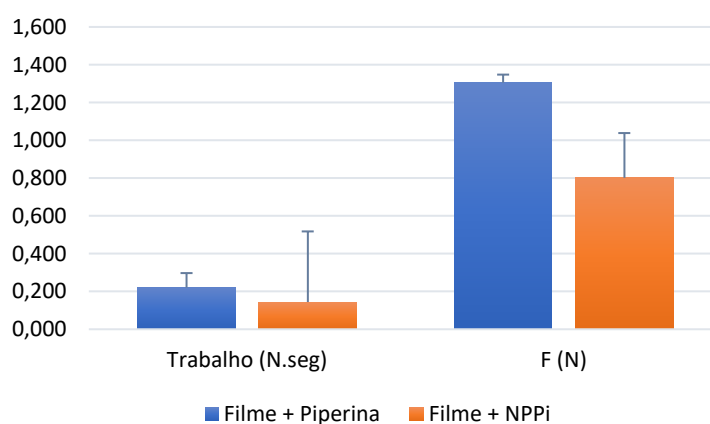
Figura 28. Propriedades mecânicas do filme G4 com a piperina (F_{Pip}) e o nanossistema incorporados (F_{NPPi}).



Informações de agrupamento usando método de Tukey e 95% de confiança.

A **Figura 29** apresenta os resultados do ensaio de bioadesão das membranas poliméricas de AS/AH. A bioadesão refere-se à capacidade de macromoléculas sintéticas, biológicas ou hidrocoloidais de aderirem a tecidos biológicos (MATHIOWITZ *et al.*, 1999). As vantagens do uso de sistemas bioadesivos como carreadores de drogas incluem prolongamento do tempo de permanência da droga no local de absorção, contato intensificado com a barreira epitelial, frequência diminuída de aplicação de doses e melhor adesão do paciente à terapia (CARVALHO *et al.*, 2010).

Figura 29. Força de bioadesão e trabalho de bioadesão do filme de G4 contendo o fármaco (F_{PIP}) e do filme G4 contendo o nanossistema (F_{NPPi}), empregando-se peles de orelhas de porco dermatomizadas.



Informações de agrupamento usando método de Tukey e 95% de confiança.

Embora os valores encontrados para o trabalho ($0,22 \pm 0,07$ N.sec e $0,14 \pm 0,80$ N.sec para F_{PIP} e F_{NPPi} , respectivamente) e para força de bioadesão ($1,30 \pm 0,37$ N e $0,80 \pm 0,23$ N

para F_{Pip} e F_{NPPI} , respectivamente) em ambos os filmes não difiram estatisticamente entre si a um nível de 95% de significância, observa-se que os filmes contendo o nanossistema incorporado apresentam adesividade ligeiramente inferior à pele de porco quando comparados com os filmes contendo apenas o fármaco. A força de bioadesão, ou pico de força de adesão, refere-se à altura do pico da curva de tensão-deformação, que representa a força exigida para separar o corpo de prova do substrato. Já o trabalho de bioadesão é a área sobre a curva de tensão-deformação e refere-se à energia necessária para romper a ponte adesiva (PHARMACEUTICAL BULLETINS, 2008).

5.9. Avaliação do perfil de liberação e de permeação *in vitro* da piperina.

A liberação de fármacos a partir de nanossistemas incorporados em sistemas poliméricos pode ser governada por diversos mecanismos tais como a desorção do fármaco associado à superfície da partícula, o relaxamento das cadeias poliméricas seguido da difusão do fármaco através da matriz intumescida, a difusão através de uma membrana controladora das taxas de liberação, a erosão da matriz ou, como em muitos casos, pela combinação de vários desses mecanismos (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). A interpretação dos valores obtidos no ensaio de liberação *in vitro* foi realizada empregando-se diferentes modelos matemáticos (Ordem 1, Higuchi, Korsmeyer-Peppas e Hixon-Crowell) às curvas obtidas a partir das porcentagens de liberação da piperina em função do tempo (

Figura 30), utilizando o *software* Sigma Plot 14.5 para a avaliação do que melhor representasse a cinética de dissolução das NPs e o mecanismo de liberação do ativo (COSTA; SOUZA-LOBO, 2001).

Para o F_{Pip} foi observado um aumento da concentração para aproximadamente $9 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ em torno de 12 horas, mantendo-se uma taxa de liberação constante após esse tempo (

Figura 30). De acordo com os valores dos coeficientes de correlação R^2 calculados, o modelo que apresentou melhor correlação com os dados de liberação da piperina foi o de Korsmeyer-Peppas (**Tabela 12**).

Para o F_{NPPI} , foram testadas duas condições: *i*) utilizando-se membrana filtrante de poliéterssulfona (PES) de $0,45 \mu\text{m}$ de diâmetro; *ii*) utilizando-se membrana filtrante de celulose de $0,45 \mu\text{m}$ de diâmetro. A quantidade de piperina liberada no segundo caso foi muito maior, atingindo no pico cerca de 3 vezes a quantidade liberada no ensaio com o filtro

de PES (0,0040 µg/mL e 0,0014 µg/mL, respectivamente). Em ambos os casos, após 9 horas começou haver um decaimento na taxa de liberação do fármaco (

Figura 30). Também pôde-se verificar que nas duas situações o modelo cinético mais ajustado foi novamente o de Korsmeyer-Peppas, com valores de $R^2 = 0,34$ e $0,43$, respectivamente (**Tabela 12**).

O modelo de Korsmeyer-Peppas baseia-se na Lei das Potências e estabelece uma relação exponencial entre a liberação do fármaco com o tempo:

$$\frac{Mt}{M_{\infty}} = a.t^n \quad (\text{Equação 13})$$

Onde: a = constante cinética que incorpora as características estruturais e geométricas da forma de liberação controlada; n = expoente de liberação; Mt/M_{∞} = fração do fármaco liberada ao longo do tempo t . PEPPAS (1985) usou o valor de n de modo a caracterizar os diferentes mecanismos de liberação, tendo concluído que valores de $n = 0,5$ descrevem o modelo de difusão Fickiano, valores de n entre $0,5$ e $1,0$ descrevem um modelo de transporte não-Fickiano ou anômalo, $n = 1,0$ descrevem um modelo de transporte caso II, e n maior que $1,0$ descrevem um modelo de transporte de super caso II (**Tabela 13**). No caso de sistemas esféricos, n será $0,45$ e $0,89$ em vez de $0,5$ e $1,0$, respectivamente. Este modelo é geralmente usado para analisar a liberação de formas farmacêuticas poliméricas quando o mecanismo de liberação não é bem conhecido ou quando pode estar envolvido mais de um tipo de liberação.

Para o F_{Pip} , o valor de $n = 0,55$ sugere que a liberação da piperina foi controlada pelas taxas de relaxamento das cadeias poliméricas e de difusão do fármaco na estrutura intumescida, caracterizando transporte não-Fickiano ou anômalo (**Tabela 12** e **Tabela 13**). No transporte não-Fickiano ou anômalo, as cadeias poliméricas não apresentam mobilidade suficiente para permitir uma penetração rápida do solvente para o interior da matriz polimérica, sendo que as velocidades de difusão do solvente e do relaxamento do polímero são da mesma ordem de magnitude.

Para o F_{NPPi} (PES) e para o F_{NPPi} (Cel), os valores de $n < 0,45$ ($0,34$ e $0,43$, respectivamente) não nos permitem assegurar que a liberação de fato respeite o modelo teórico, impossibilitando prever o tipo de transporte que está ocorrendo na liberação da piperina das nanopartículas (**Tabela 12** e **Tabela 13**). Essa deficiência no ajuste dos dados experimentais pode ser atribuída a inadequação do modelo e/ou a uma certa dispersão dos resultados experimentais.

Figura 30. Perfil de liberação de piperina do filme G4 em meio contendo tampão PBS (pH 7,4), etanol (20%, v/v) e surfactante (Tween® 20, 2% v/v). Os resultados são apresentados como a média $\pm$ desvio padrão de 3 replicatas.

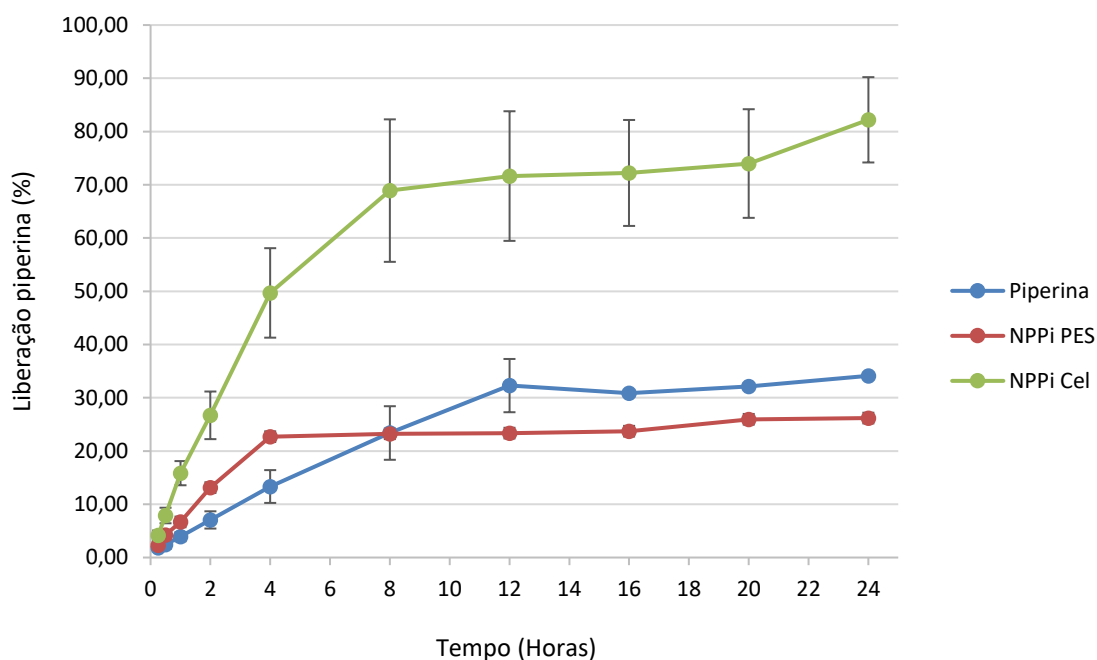


Tabela 12. Coeficiente de correlação e parâmetros dos modelos matemáticos de cinética de liberação do fármaco.

Amostra	Modelo								
	Higushi		Korsmeyer-Peppas			Ordem 1		Hixon-Crowell	
	R ²	k	R ²	k	n	R ²	k	R ²	k
F _{Pip} (PES)	0,9530	2,14	0,9563	1,87	0,55	0,8390	0,005	0,8337	0,001
F _{NPPi} (PES)	0,8342	1,47	0,9007	2,23	0,34	0,3872	0,003	0,3809	0,001
F _{NPPi} (Cel)	0,9328	4,75	0,9420	5,70	0,43	0,6940	0,012	0,6773	0,004

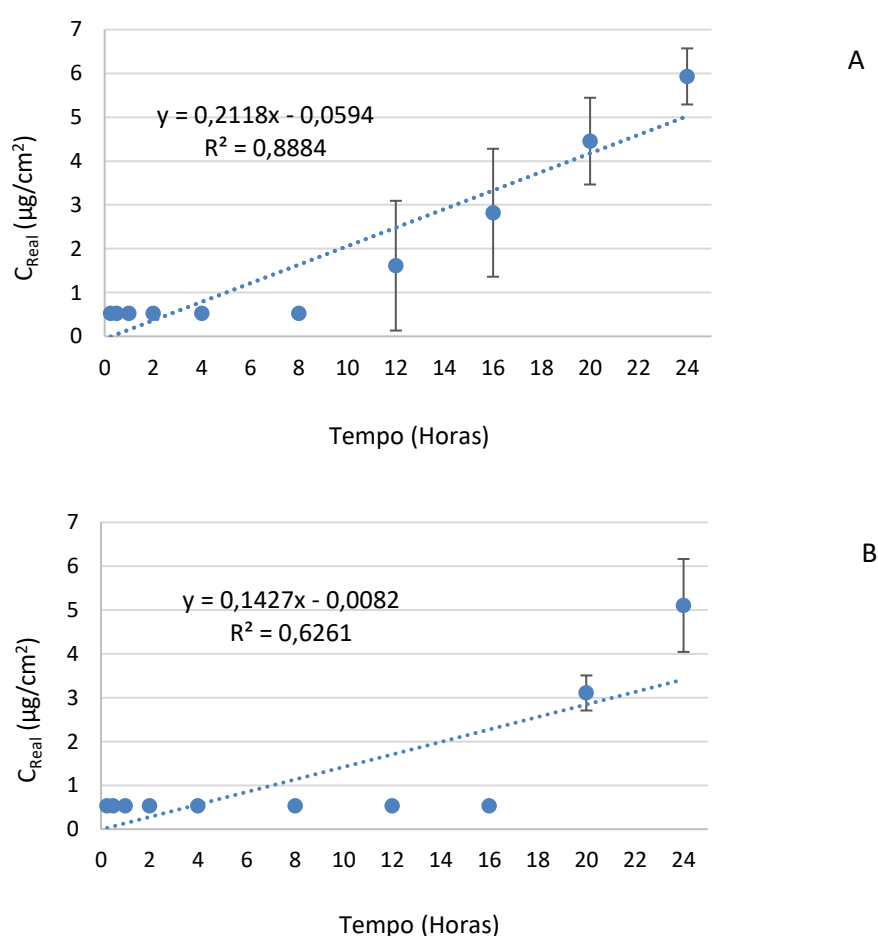
Tabela 13. Interpretação dos mecanismos de liberação a partir dos filmes poliméricos para sistemas esféricos.

Expoente de liberação (n)	Mecanismo de transporte do fármaco	Velocidade como função do tempo
0,45	Difusão (conforme Lei de Fick)	$t^{-0,5}$
Entre 0,5 e 0,89	Transporte Anômalo	t^{n-1}
0,89	Transporte Caso-II	Ordem zero

Fonte: PEPPAS (1985).

Quanto à permeação, os resultados são apresentados na **Figura 31**. Em ambas situações, seja no F_{Pip} quanto no F_{NPPi} , observou-se uma taxa de passagem lenta até 14 horas, quando então começou a haver um aumento exponencial na concentração recuperada do fármaco. Este fato é bastante positivo quando pensamos numa aplicação anti-inflamatória local do ativo, uma vez que sua taxa de penetração nas camadas da pele é bastante lenta, evitando uma ação sistêmica.

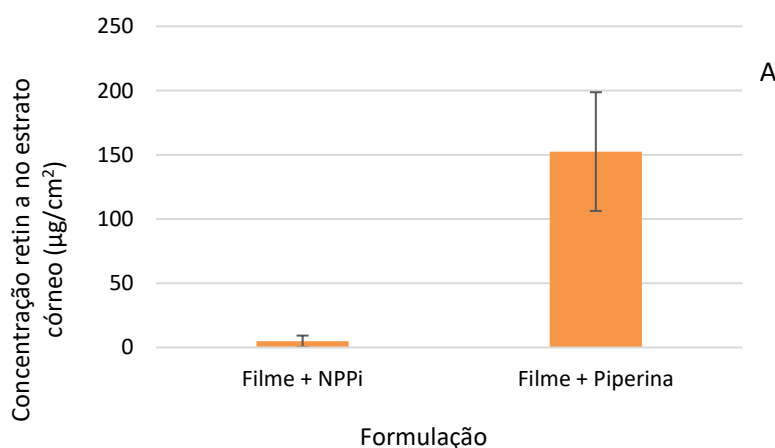
Figura 31. Piperina recuperada da pele de porco dermatomizada após 24 horas de experimento de permeação *in vitro*. **(A)** Perfil de recuperação de piperina a partir do filme G4 (F_{Pip}); **(B)** Perfil de recuperação de piperina contida no nanossistema incorporado no filme G4 (F_{NPPi}).

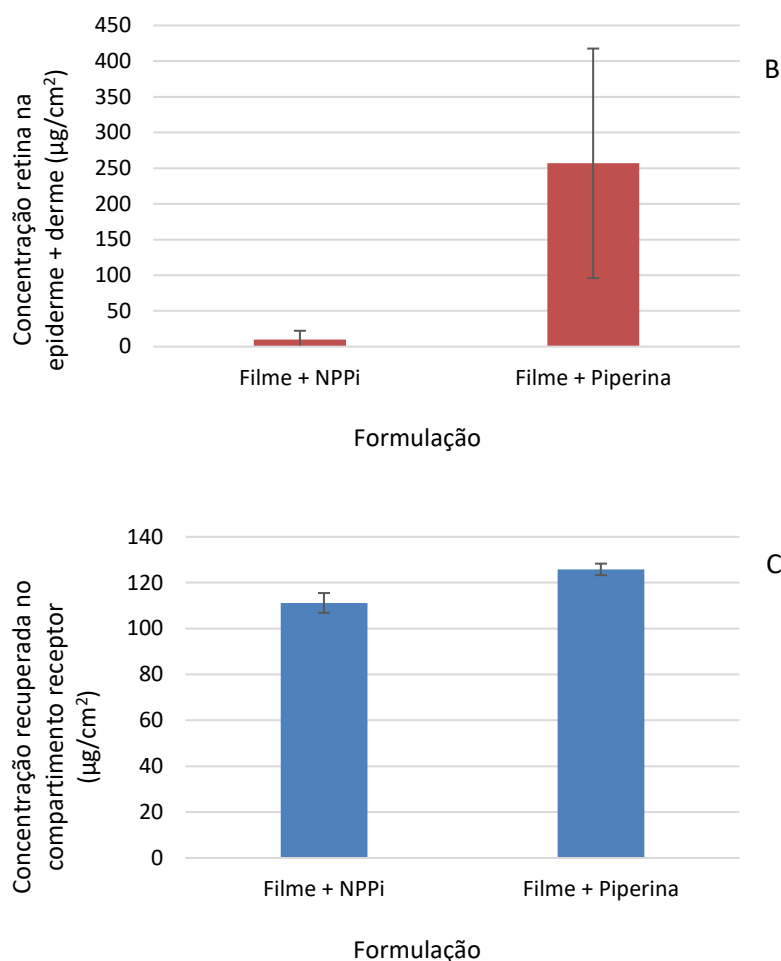


5.10. Avaliação do ensaio de retenção cutânea *in vitro*

Para entender o comportamento das formulações após a administração cutânea, o estudo da retenção da piperina foi realizado utilizando a técnica de *tape-stripping*. Esta técnica, quando padronizada, mostra-se adequada para determinar a dermatocinética de formulações tópicas, medida a partir da concentração do fármaco retido nas camadas da pele (ESCOBAR-CHÁVEZ *et al.*, 2008). No presente estudo, após 24 horas de ensaio, foi observada no compartimento receptor uma recuperação de 17.85% para as membranas contendo apenas o fármaco (F_{Pip}) e 15.77% para as membranas contendo o nanossistema (F_{NPPI}). Partindo de uma massa inicial de 705 μg , a quantidade recuperada de fármaco aplicada nas formulações foi menor nas camadas do estrato córneo (4.80 μg para o F_{NPPI} e 152.5 μg para o F_{Pip}) quando comparada à quantidade recuperada na derme + epiderme (10.0 μg para o F_{NPPI} e 256.8 μg para o F_{Pip}) (**Figura 32**). O acúmulo preferencial de piperina na derme pode favorecer um transporte através dos folículos pilosos (PRAÇA *et al.*, 2017).

Figura 32. Quantidade retida *in vitro* de piperina. **(A)** Concentração de piperina retida no estrato córneo ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$); **(B)** Concentração de piperina retida na derme + epiderme ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$); **(C)** Concentração de piperina recuperada no compartimento receptor ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$).





5.11. Ensaio de citotoxicidade

Já é bem estabelecido na literatura que experimentos com linhagens celulares facilitam a reprodutibilidade dos resultados, e são comumente utilizados em ensaios de citotoxicidade (ROGERO *et al.*, 2003). Os ensaios celulares aqui apresentados foram realizados com fibroblasto de rato (L-929). Esta linhagem é recomendada pela ISO 10993-5, sendo comumente utilizada em estudos de biocompatibilidade (MENESES *et al.*, 2020). Considerando toda a discussão dentro da sociedade científica em relação à utilização de animais para testes de substâncias, os testes *in vitro* comumente precedem os testes *in vivo*. Os métodos para avaliação de citotoxicidade são reprodutíveis e de baixo custo e, apesar de ser conhecido que os resultados *in vitro* não são exatamente os mesmos que *in vivo*, é verdade que um material que apresente alta citotoxicidade celular provavelmente será tóxico aos tecidos (OSORIO *et al.*, 1998).

Antes de iniciar o experimento propriamente dito, a viabilidade celular foi avaliada verificando-se a presença de mais de 90% de células viáveis. A citotoxicidade dos materiais

foi avaliada pela formação de halo ao redor do disco de membrana testado. Os halos foram medidos com grade milimétrica e paquímetro. O halo formado foi dividido em 4 quadrantes ao redor de sua circunferência e sua extensão foi mensurada. A extensão das áreas descoloradas por quadrante (Q) é apresentada na **Tabela 14**.

Tabela 14. Medidas da extensão (mm) das áreas descoloridas por quadrante relativas ao ensaio de citotoxicidade (método de difusão em ágar).

Sistema	Área descolorida	Poço 1				Poço 2				Poço 3			
Piperina livre	Quadrante	Q1	Q2	Q3	Q4	Q1	Q2	Q3	Q4	Q1	Q2	Q3	Q4
	Extensão (cm)	0,9	0,8	0,9	1,0	0,9	1,0	1,2	1,3	1,3	1,2	1,2	1,3
	Média	0,9				1,1				1,2			
	Média final	1,0											
Controle positivo	Quadrante	Q1	Q2	Q3	Q4	Q1	Q2	Q3	Q4	Q1	Q2	Q3	Q4
	Extensão (cm)	1,1	1,0	1,0	1,2	1,2	1,0	1,2	1,0	1,0	1,2	1,2	1,0
	Média	1,1				1,2				1,1			
	Média final	1,1											
Controle negativo	Quadrante	Q1	Q2	Q3	Q4	Q1	Q2	Q3	Q4	Q1	Q2	Q3	Q4
	Extensão (cm)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Média	0				0				0			
	Média final	0											
Filme + branco	Quadrante	Q1	Q2	Q3	Q4	Q1	Q2	Q3	Q4	Q1	Q2	Q3	Q4
	Extensão (cm)	0,5	0,4	0,3	0,4	0,3	0,3	0,5	0,4	0,4	0,3	0,4	0,3
	Média	0,4				0,4				0,3			
	Média final	0,4											
Filme + piperina	Quadrante	Q1	Q2	Q3	Q4	Q1	Q2	Q3	Q4	Q1	Q2	Q3	Q4
	Extensão (cm)	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Média	0				0				0			
	Média final	0											
Filme + NPPi	Quadrante	Q1	Q2	Q3	Q4	Q1	Q2	Q3	Q4	Q1	Q2	Q3	Q4
	Extensão (cm)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Média	0				0				0			
	Média final	0											
Filme	Quadrante	Q1	Q2	Q3	Q4	Q1	Q2	Q3	Q4	Q1	Q2	Q3	Q4
	Extensão (cm)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Média	0				0				0			
	Média final	0											

As médias quantitativas de citotoxicidade obtidas para cada sistema foram aplicadas à tabela de grau de citotoxicidade (**Tabela 15**) para obtenção dos resultados qualitativos. Da sua observação, nota-se que tanto as membranas contendo o fármaco livre quanto as membranas contendo o fármaco nanoencapsulado não conferem riscos de lesão celular direta na área que serão aplicados na pele.

Tabela 15. Resultados qualitativos de citotoxicidade.

Sistema	Média final do halo (cm)	Citotoxicidade
Piperina livre	1,0	Severa
Controle positivo	1,1	Severa
Controle negativo	0	Ausência
Filme + branco	0,4	Moderada
Filme + piperina	0	Ausência
Filme + NPPi	0	Ausência
Filme	0	Ausência

5.12. Atividade anti-inflamatória *in vivo*

A **Tabela 16** mostra as porcentagens de inflamação e os valores de redução na inflamação obtidos no ensaio *in vivo*. O fármaco nanoencapsulado (NPPi) e o filme contendo apenas a piperina não apresentaram redução na atividade anti-inflamatória significativa. Por outro lado, o filme contendo a piperina nanoencapsulada apresentou a maior atividade anti-inflamatória, com uma porcentagem de redução da inflamação apenas 20% inferior à dexametasona, demonstrando o potencial deste sistema. Além disso, pode-se notar que o grupo tratado com a NPPi e o grupo tratado apenas com a membrana (sem droga) apresentaram valores de redução semelhantes entre si, indicando que o ação anti-inflamatória é devido à composição do sistema (fármaco nanoencapsulado + filme).

Tabela 16. Resultados de inflamação e redução da inflamação (média $\pm$ DP).

Grupos	Inflamação (%)	Redução na inflamação (%)
NPPi	89,46 $\pm$ 14,86	10,54 ^{a,b}
Filme + piperina	84,80 $\pm$ 26,49	15,20 ^{a,b}
Filme + NPPi	56,42 $\pm$ 31,83	43,58 ^{a,b}
Filme	89,14 $\pm$ 46,64	10,86 ^{a,b}
Dexametasone (1 mg/g)	36,97 $\pm$ 30,19	63,03 ^b
Control - (sem tratamento)	100,65 $\pm$ 25,37	0 ^a

Médias que não compartilham letras sobrescritas iguais na mesma coluna são significativamente diferentes pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$).

6. CONCLUSÕES

A piperina é um composto hidrofílico. Assim, a estratégia de nanoencapsulação pode ser aplicada para aumentar sua solubilidade em água para evitar a toxicidade introduzida pelos excipientes ou solventes orgânicos utilizados na formulação, e também garantir sua dose terapêutica. Neste sentido, o nanossistema sintetizado para a incorporação da piperina em biomembranas mostrou bons resultados, com redução de 43,6% na inflamação da orelha dos camundongos tratados e ausência de toxicidade contra fibroblastos, garantindo sua segurança. As nanopartículas contendo o fármaco piperina (NPPI), obtidas através da técnica de nanoprecipitação, apresentaram tamanho, PDI e potencial zeta altamente satisfatórios, mantendo-se estáveis por, no mínimo, 60 dias. O emprego de uma blenda de ácido hialurônico e alginato de sódio em proporções adequadas resultou na síntese de membranas finas e transparentes com boa resistência e maleabilidade, ideais para a incorporação do nanossistema, o qual apresentou uma eficiência de encapsulamento de 76,2%. Considerando as dificuldades práticas de aplicação dos dispositivos no modelo experimental escolhido, os resultados são bastante promissores, abrindo caminho para futuras investigações com vistas à aplicação deste sistema em modelos de doenças inflamatórias de pele.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOU-OKEIL, A.; FAHMY, H.M.; EL-BISI, M.K.; AHMED-FARID; O.A. Hyaluronic acid/Na-alginate films as topical bioactive wound dressings. **European Polymer Journal**, v. 109, p. 101-109, 2018.
- AKHAGARI, A.; FARAHMAND, F.; GAREKANI, H.A.; SADEGHI, F.; VANDAMME, T.F. Permeability and swelling studies on free films containing insulin in combination with different polymethacrylates aimed for colonic drug delivery. **European Journal of Pharmaceutical Science**. v. 28, p. 307-314, 2006.
- AL-HASSAN, A.A.; NORZIAH, M.H. Starch–gelatin edible films: Water vapor permeability and mechanical properties as affected by plasticizers. *Food Hydrocol.* v.26, n.1, p. 108-117, 2012.
- ALI, M.E.; LAMPRECHT, A. Polyethylene glycol as an alternative polymer solvent for nanoparticle preparation. **Int J Pharm.** v. 456, p. 135-142, 2013.
- ANTI, L.M.A.; GIORGI, R.D.N.; CHAHADE, W.H. Anti-inflamatórios hormonais: glicocorticoides. **Einstein**. v. 6, n. 1, p. S159-S65, 2008.

- AOAC. Association of Official Analytical Chemists, Official Methods of Analysis of AOAC International. 20th. ed. In: LATIMER-JR, George W. (Editor), Rockville, 2016.
- ATAL, N.; BEDI, K.L. Bioenhancers: Revolutionary concept to Market. **J Ayurveda Integr Med.** v.1, n.2, p. 96-9, 2010.
- AVADI, M.R.; SADEGHI, A.M.M.; MOHAMMADPOUR, N.; ABEDIN, S. Preparation and characterization of insulin nanoparticles using chitosan and Arabic gum with ionic gelation method. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine.** v.6, n.1, p. 58-63, 2010.
- BADMAEV, V.; MAJEED, M.; PRAKASH, L. Piperine derived from black pepper increases the plasma levels of coenzyme Q10 following oral supplementation. **J Nutr Biochem.** v.11, n. 2, p. 109-113, 2000.
- BAE, G. S.; KIM, M. S.; JEONG, J.; LEE, H. Y.; et al. Piperine ameliorates the severity of cerulein-induced acute pancreatitis by inhibiting the activation of mitogen activated protein kinases. **Biochem Biophys Res Commun.** v. 410, n.3, p. 382-388, 2011.
- BAI, Y.F.; XU, H. Protective action of piperine against experimental gastric ulcer. **Acta Pharmacol Sin.** v. 21, n.4, p.357-359, 2000.
- BANG, J.S.; OH, D.H.; CHOI, H.M.; SUR, B.J.; et al. Anti-inflammatory and antiarthritic effects of piperine in human interleukin 1 β -stimulated fibroblast-like synoviocytes and in rat arthritis models. **Arthritis Res Ther.** v. 11, n. 2, p. R49, 2009.
- BANO, G.; RAINA, R.K.; ZUTSHI, U.; BEDI, K.L.; JOHRI, R.K.; SHARMA, S.C. Effect of piperine on bioavailability and pharmacokinetics of propranolol and theophylline in healthy volunteers. **Eur. J. Clin. Pharmacol.** v. 41, n. 6, p. 615-617, 1991.
- BARICEVIC, D.; SOSA, S.; DELLA LOGGIA, R.; TUBARO, A.; SIMONOVSKA, B.; KRASNA, A.; ZUPANCIC, A. Topical anti-inflammatory activity of *Salvia officinalis* L. leaves: the relevance of ursolic acid. **J Ethnopharmacol.** v. 75, n. 2-3, p. 125-132, 2001.
- BARNES, P.J.; KARIN, M. Nuclear factor- κ B: a pivotal transcription factor in chronic inflammation. **N. Engl. J. Med.** v. 336, p. 1066-1071, 1997.
- BASPINAR, Y.; ÜSTÜNDAŞ, M.; BAYRAKTAR, O.; SEZGIN, C. Curcumin and piperine loaded zein-chitosan nanoparticles: Development and *in-vitro* characterisation. **Saudi Pharmaceutical Journal.** V. 26, n. 3, p. 323-334, 2018.
- BECK-BROICHSITTER, M.; RYTTING, E.; LEBHARDT, T.; WANG, X.; KISSEL, T. Preparation of nanoparticles by solvent displacement for drug delivery: A shift in the “ouzo region” upon drug loading. **European Journal of Pharmaceutical Sciences.** v 41, n. 2, p. 244-253, 2010.

BERTUZZI, M.A.; VIDAURRE, E.F.C.; ARMADA, M.; GOTTIFREDI, J.C. Water vapor permeability of edible starch-based films. **Journal of Food Engineering**. v.80, p. 972-978, 2007.

BHAGWAT, S.S.; MANNING, A.M.; HOEKSTRA, M.F.; LEWIS, A. Gene-regulating protein kinases as important anti-inflammatory targets. **Drug Discov Today**. V.4 n. 10, p. 472-479, 1999.

BHARDWAJ, R.K.; GLAESER, H.; BECQUEMONT, L.; KLOTZ, U.; GUPTA, S.K.; FROMM, M.F. Piperine, a major constituent of black pepper, inhibits human P-glycoprotein and CYP3A4. **J Pharmacol Exp Ther**. V. 302, n. 2, p. 645-650, 2002.

BILATI, U.; ALLEMANN, E.; DOELKER, E. Development of a nanoprecipitation method intended for the entrapment of hydrophilic drugs into nanoparticles. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, .v. 24, p. 67-75, 2005.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Resolução RDC nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Resolução RDC nº166, de 24 de julho de 2017. Validação de métodos analíticos.

BUCKLE, D.R.; HEDGECOCK, C.J.R. Drug targets in inflammation and immunomodulation. **Drug Discov Today**.v 2, p. 325-332, 1997.

BUKHARI, F.A.; RIZWAN, M.; LIAQUAT, K.; ASHRAF, R.; ALI, S.M.; AZEEM, S.R.; ALI, M.A. An Investigation of Customers to Explain the Purchase Intentions of Expensive Mobile Phone. **Journal of Basic and Applied Scientific Research**. v3, n. 11, p. 87-96, 2013.

BUSSAB, W.O.; MORETTIN, P.A. **Estatística básica**. 6a. ed. São Paulo: Saraiva, 2010.

CALVO, P.; REMUÑÁN-LÓPEZ, C.; VILA-JATO, J.L.; ALONSO, M.J.. Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers **J. Appl. Polym. Sci**. v.63, n. 1, p. 125-132, 1997.

CARVALHO, F.C.; BRUSCHI, M.L.; EVANGELISTA, R.C.; GREMIÃO, M.P.D. Mucoadhesive drug delivery systems. **Braz J Pharma Sci**. v.46, p. 1-17, 2010.

CASTRO, K.C.; COSTA, J.M.; CAMPOS, M.G.N. Drug-loaded polymeric nanoparticles: a review. **International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials**. v.71, n. 1, p. 1-13, 2020.

CHEN, W.Y.; ABATANGELO, G. Functions of hyaluronan in wound repair. **Wound Repair Regen**. v.7, n. 2, p. 79-89, 1999.

- CHONG, B.F.; BLANK, L.M.; MCLAUGHLIN, R.; NIELSEN, L.K. Microbial Hyaluronic acid production, **Applied Microbiology and Biotechnology**. v.66n. 4, p. 341-351, 2005.
- CHOURASIYA, V.; BOHREY, S.; PANDEY, A. Formulation, optimization, characterization and in-vitro drug release kinetics of atenolol loaded PLGA nanoparticles using 3³ factorial design for oral delivery. **Materials Discovery**, v.5, p. 1-13, 2016.
- COSTA, P.; SOUSA-LOBO, J.M. Modeling and comparison of dissolution profiles. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v 13, n. 2, p. 123-133, 2001.
- COSTA, N.N.; LOPES, L.F.; FERREIRA, D.F.; et al. Polymeric films containing pomegranate peel extract based on PVA/starch/PAA blends for use as wound dressing: *In vitro* analysis and physicochemical evaluation. **Mater Sci Eng C Mater Biol Appl**. v.109, p. 110643, 2020.
- DARSHAN, S.; DORESWANY, R. Patented anti-inflammatory plant drug development from traditional medicine. **Phytotherapy Research**. v.18, n. 5, p.343-357, 2004.
- DESAI, S.K.; GAWALI, V.S.; NAIK, A.B.; D'SOUZA, L.L. Potentiating effect of piperine on hepatoprotective activity of *Boerhaavia diffusa* to combat oxidative stress. **International Journal of Pharmacology**. v.4, n.5, p.393-397, 2008.
- DICK, I.P.; SCOTT, R.C. Pig ear skin as an in-vitro model for human skin permeability. **J Pharm Pharmacol**. v.44, p. 640-645, 1992.
- DUTRA, J.A.P.; CARVALHO, S.G.; ZAMPIROLI, A.C.D.; et al. Papain wound dressings obtained from poly(vinyl alcohol)/calcium alginate blends as new pharmaceutical dosage form: Preparation and preliminary evaluation. **Eur J Pharm Biopharm**. v.113, p. 11-23, 2017.
- EL KAMEL, A.H.; SOKAR, M.S.; GAMAL, S.S.A; NAGGAR, V.F. Preparation and evaluation of ketoprofen floating oral delivery system. **Int J Pharm**. v220, p. 13-21, 2001.
- EL MAGHRABY, G.M.; ELZAYAT, E.M.; ALANAZI, F.K. Investigation of *in situ* gelling alginate formulations as a sustained release vehicle for co-precipitates of dextromethrophan and Eudragit S 100. **Acta Pharma**. v64, p. 29-44, 2014.
- EL GHAZALY, M.A.; FADEL, N.; RASHED, E.; EL-BATAL, A.; KENAWY, S.A. Anti-inflammatory effect of selenium nanoparticles on the inflammation induced in irradiated rats. **Can J Physiol Pharmacol**. v.95, n. 2, p. 101-110, 2017.
- ELKADY, A.A.; TAWFIK, S.S. Anti-inflammatory role of piperine against rat lung tissue damage induced by gamma-rays **Int J Radiat Res**. v 16, n. 1, p.75-84, 2018.

- ELNAGGAR, Y.S.R.; ETMAN, S.M.; ABDELMONSIF, D.A. Intranasal piperine-loaded chitosan nanoparticles as brain-targeted therapy in Alzheimer's disease: optimization, biological efficacy, and potential toxicity. **J Pharm Sci.** v.104, n.10, p. 3544-3556, 2015.
- EOUANI, C.; PICCERELLE, P.; PRINDERRE, P.; BOURRET, E.; JOACHIM, J. *In-vitro* comparative study of buccal mucoadhesive performance of different polymeric films **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.** v52, n.1, p.45-55, 2001.
- ESCOBAR-CHÁVEZ, J.J.; MERINO-SANJUÁN, V.; LÓPEZ-CERVANTES, M.; et al. The tape-stripping technique as a method for drug quantification in skin. **J Pharm Sci.** v11, n. 1, p. 104-130, 2008.
- EURACHEM. The Fitness for Purpose of Analytical Methods. A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, 2nd ed. UK, 2014.
- FDA. Food and Drug Administration. **Validation of Chromatographic Methods.** Washington: Center for Drug and Evaluation and Research, 2004.
- FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J.P.; AMMOURY, N.; BENITA, S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutics.** v55, n.1, p. R1-R4, 1989.
- GAMAL M.; MAGHRABY, E.; AHMED, A.A.; OSMAN, M.A. Penetration enhancers in proniosomes as a new strategy for enhanced transdermal drug delivery. **Saudi Pharm J.** v.23 n.1, p. 67–74, 2015.
- GARALA, K.; JOSHI, P.; SHAH, M.; RAMKISHAN, A. Formulation and evaluation of periodontal in situ gel. **International Journal of Pharmaceutical Investigation.** v.3, n. 1, p. 29-41, 2013.
- GARG, H.G.; HALES, C.A. **Chemistry and biology of Hyaluronan.** Boston: Elsevier Science, 2004.
- GAUMET M., VARGAS A., GURNY R., DELIE F. Nanoparticles for drug delivery: The need for precision in reporting particle size parameters. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.** v.69, n. 1, p. 1-9, 2008.
- GOVENDER, T.; STOLNIK, S.; GARNETT, M.C.; ILLUM, L.; DAVIS, S.S. PLGA nanoparticles prepared by nanoprecipitation: drug loading and release studies of a water soluble drug. **J Control Release.** v.57, n. 2, p. 171-185, 1999.
- GUPTA, S.K.; BANSAL, P.; BHARDWAJ, R.K.; VELPANDIAN, T. Comparative anti-nociceptive, anti-inflammatory and toxicity profile of nimesulide vs nimesulide and piperine combination. **Pharmacol Res.** v. 41, n. 6, p. 657-662, 2000.

- GUTTMAN-YASSKY, E.; Michelle A LOWES, M.A.; FUENTES-DUCULAN, J.; WHYNOT, J.; et al. Major differences in inflammatory dendritic cells and their products distinguish atopic dermatitis from psoriasis. **J Allergy Clin Immunol.** v.119, n. 5, p. 1210-1217, 2007.
- ICH, 2005. **Validation of analytical methods:** definitions and methodology. London: European Medicines Agency, 2005.
- INMETRO, 2020. Orientação sobre validação de métodos analíticos. DOQ CGCRE 008, Revisão 08, Coordenação Geral de Acreditação, 2020.
- JARAMILLO, M.A.; MANOS, P.S. Phylogeny and patterns of floral diversity in the genus *Piper* (Piperaceae). **American Journal of Botany.** v.88, n. 4, p. 706-716, 2001.
- JOHRI, R.K.; THUSU, N.; KHAJURIA, A.; ZUTSHI, U. Piperine-mediated changes in the permeability of rat intestinal epithelial cells. The status of gamma-glutamyl transpeptidase activity, uptake of amino acids and lipid peroxidation **Biochem Pharmacol.** v.43, n. 7, p. p. 1401-1407, 1992.
- KABANOV, A.V.; BATRAKOVA, E.V.; ALAKHOV, V.Y. Pluronic block copolymers as novel polymer therapeutics for drug and gene delivery. **J Control Release.** v.82, n. 2-3, p. 189-212, 2002.
- KATIYAR, D.; HEMANTARANJAN, A.; SINGH, B. Chitosan as a promising natural compound to enhance potential physiological responses in plant: a review. **Indian Journal of Plant Physiology.** v.20, n. 1, p. 1-9, 2015.
- KROCHTA, J.M.; MULDER-JOHNSTON, C.D. Edible and biodegradable polymer films: Challenges and opportunities. **Food Technology,** v.51, p. 61-73, 1997.
- KRUEGER, J.G.; BAWCOCK, A. Psoriasis pathophysiology: current concepts of pathogenesis. **Ann Rheum.** v.64, n. 2, p. 30-36, 2005.
- KUMAR, D.H.L.; SARKAR, P. Encapsulation of bioactive compounds using nanoemulsions. **Environmental Chemistry Letters.** v.16, p. 59-70, 2018.
- LABOURET, A.; THIOUNE, O.; FESSI, H.; DEVISSAGUET, J.P.; PUISIEUX, F. Application of an Original process for Obtaining Colloidal Dispersions of Some Coating Polymers. Preparation, Characterization, Industrial Scale-Up. **Drug Development and Industrial Pharmacy.** v.21, n. 2, p. 229-241, 1995.
- LEE, J.S.; FEIJEN, J. Polymersomes for drug delivery: design, formation and characterization **J Control Release.** v.161, n. 2, p. 473-483, 2012.

- LEE, S.A.; HONG, S.S.; HAN, X.H.; HWANG, J.S.; et al. Piperine from the fruits of *Piper longum* with inhibitory effect on monoamine oxidase and antidepressant-like activity. **Chem Pharm Bull.** v.53, n. 7, p. 832-835, 2005.
- LEGRAND, P.; LESIEUR, S.; BOCHOT, A.; GREF, R.; RAATJES, W.; BARRATT, G.; VAUTHIER, C. Influence of polymer behavior in organic solution on the production of polylactide nanoparticles by nanoprecipitation. **Int J Pharm.** v.344, n.1-2, p. 33-43, 2007.
- LEUNG, D.Y.M.; BOGUNIEWICZ, M.; HOWELL, M.D.; NOMURA, I.; HAMID, O.A. New insights into atopic dermatitis. **J Clin Invest.** v.113, n. 5, p. 651-657, 2004.
- LI, S.; WANG, C.; WANG, M.; LI, W.; MATSUMOTO, K.; TANG, Y. Antidepressant like effects of piperine in chronic mild stress treated mice and its possible mechanisms. **Life Sci.** v.80, n. 15, p. 1373-1381, 2007.
- LI, Y.; LI, K.; HU, Y.; XU, B.; ZHAO, J. Piperine mediates LPS induced inflammatory and catabolic effects in rat intervertebral disc. *Int J Clin Exp Pathol.* v8, n. 6, p. 6203-6213, 2015.
- LIU, N.; CHEN, X.G.; PARK, H.J.; LIU, C.G.; LIU, C.S.; MENG, X.H.; YU, L.J. Effect of MW and concentration of chitosan on antibacterial activity of *Escherichia coli*. **Carbohydrate polymers.** v.64, n.1, p. 60-65, 2006.
- MANOHARAN, S.; BALAKRISHNAN, S.; MENON, V.P.; ALIAS, L.M.; REENA, A.R. Chemopreventive and efficacy of curcumin and piperine during 7,12-dimethylbenz [a]anthracene-induced hamster buccal pouch carcinogenesis. **Singapore Medical Journal.** v.50, n. 2, p. 139-146, 2009.
- MAS, J.D.; ZERMIANI, T.; THIESEN, L.C.; et al. Nanoemulsion as a carrier to improve the topical anti-inflammatory activity of stem bark extract of *Rapanea ferruginea*. **Int J Nanomedicine.** v.11, p 4495-4507, 2016.
- MATHIOWITZ, E.; CHICKERING, D.E.; LEHR, C.M. Bioadhesive drug delivery systems: fundamentals, novel approaches, and development. New York, NY: CRC Press, 1999.
- MEGHWAL, M.; DEVU, S.; SINGH, H.; GOSWAMI, T.K. A centum of valuable plant bioactives. Chapter 26 - Piperine and curcumin. Academic Press, p. 589-612, 2021.
- MENEGUIN, A.B.; CURY, B.S.F.; EVANGELISTA, R.C. Films from resistant starch-pectin dispersions intended for colonic drug delivery. **Carbohydrate Polymers.** v.99, p. 140-149, 2014.
- MENESES, J.; SILVA, J.C.; FERNANDES, S.R.; et al. A multimodal stimulation cell culture bioreactor for tissue engineering. **Polymers.** v.12, p. 240, 2020.

- MILADI, K.; SFAR, S.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Nanoprecipitation process: From particle preparation to *in vivo* applications. In: VAUTHIER C.; PONCHEL, G. (eds). *Polymer Nanoparticles for Nanomedicines*. Springer, Cham, 2016.
- MITTAL, R.; GUPTA, R.L. *In vitro* antioxidant activity of piperine. **Methods Find Exp Clin Pharmacol**. v.22, n. 5, p. 271-274, 2000.
- MOLPECERES, J.; GUZMAN, M.; ABERTURAS, M.R.; CHACON, M.; BERGES, L. Application of central composite designs to the preparation of polycaprolactone nanoparticles by solvent displacement. **J Pharm Sci**. v.85, n. 2, p. 206-213, 1996.
- MOORTHY, C.; KRISHNAN, K.; MANAVALAN, R.; KATHIRESAN, K. Preparation and characterization of curcumin-piperine dual drug loaded nanoparticles. **Asian Pac J Trop Biomed**. v.2, n. 11, p. 841-848, 2012.
- MORA-HUERTAS, C.E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Influence of process and formulation parameters on the formation of submicron particles by solvent displacement and emulsification–diffusion methods: Critical comparison. **Advances in Colloid and Interface Science**. v.163, n. 2, p. 90-122, 2011.
- MORT, J.R.; APARASU, R.R.; BAER, R.K. Interaction between selective serotonin reuptake inhibitors and nonsteroidal anti-inflammatory drugs: review of the literature. **Pharmacotherapy**. v.26, n. 9, p. 1307-1313, 2006.
- MOTTA, M.H.; SCNHEIDER, A.C.; CODEVILLA, C.F.; MENEZES, C.R.; SILVA, C.B. 2018. Analytical method by liquid chromatography to assay piperine associated in Nanoemulsions. **Drug Anal Res**. v.2, n. 1, p. 1-7, 2018.
- NAGAVARMA, B.V.N.; YADAV, H.; AYAZ, A.; VASUDHA, L.S. Different techniques for preparation of polymeric nanoparticles- A review. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**. v.5, n.3, p. 16-23, 2012.
- NAVICKIENE, H.M.D.; ALÉCIO, A.C., KATO, M.J., BOLZANI, V.S., YOUNG, M.C.M., CAVALHEIRO, A.J., FURLAN, M. Antifungal amides from *Piper hispidum* and *Piper tuberculatum*. **Phytochemistry**. v.55, p. 621-626, 2000.
- NICKOLOFF, B.J.; NESTLE, F.O. Recent insights into the immunopathogenesis of psoriasis provide new therapeutic opportunities. **J Clin Invest**. v.113, n. 12, p. 1664-1675, 2004.
- OLIVEIRA, M.L.B.; FRANÇA, T.A.R.; CAVALCANTE, F.S.; LIMA, R.A. O gênero *Piper* no brasil: o estado da arte da pesquisa. **Biodiversidade**. v.19, n.3, p. 198-210, 2020.
- OLIVEIRA, P.A.; ALMEIDA, T.B.; OLIVEIRA, R.G.; GONÇALVES, G.M. et al. Evaluation of the antinociceptive and anti-inflammatory activities of piperic acid:

Involvement of the cholinergic and vanilloid systems. **Eur J Pharmacol.** v.834, p. 54-64, 2018.

OLIVEIRA, R.G.; ALENCAR-FILHO, E.B.; VASCONCELLOS, M.L.A.A. A influência da piperina na biodisponibilidade de fármacos: uma abordagem molecular. **Química Nova** v.37, n. 1, p. 69-73, 2014.

OSORIO, R.M.; HEFTI, A.; VERTUCCI, F.J.; SHAWLEY, A.L. Cytotoxicity of endodontic materials. **J Endod.** v.24, n.2, p. 91-96, 1998.

PADULA, C.; COLOMBO, G.; NICOLI, S.; CATELLANI, P.L.; MASSIMO, G.; SANTI, P. Bioadhesive film for the transdermal delivery of lidocaine: in vitro and in vivo behavior. **J Control Release.** v.88, n.2, p. 277-285, 2003.

PARMAR, V.S.; JAIN, S.C.; BISHT, K.S.; JAIN, R. Phytochemistry of genus *Piper*. **Phytochemistry** v.46, n. 4, p. 597-673, 1997.

PATIL, R.; SANADA, K.; JIANG, X.; HARIMA, Y.; MASAOKA, K.; YAMASAKI, S.; YANO, J. Microspheres of Conducting Poly(N-methylaniline). **Polymer Journal.** v.36, p. 549-555, 2004.

PECORA, R. Dynamic Light Scattering Measurement of Nanometer Particles in Liquids. **Journal of Nanoparticle Research.** v.2, p. 123-131, 2000.

PELTONEN, L.; AITTA, J.; HYVÖNEN, S.; KARJALAINEN, M.; HIRVONEN, J. Improved entrapment efficiency of hydrophilic drug substance during nanoprecipitation of poly(l)lactide nanoparticles. **AAPS Pharm Sci Tech.** v.5, n. 1, p. E16, 2004.

PEPPAS, N.A. Analysis of Fickian and non-Fickian drug release albumin microcapsules of nitrofurantoin from polymers. **Pharm. Acta Helv.** v. 60, p. 110–111, 1985.

PHARMACEUTICAL BULLETINS. Bulletin 23 - Bioadhesion, Lubrizol, 2008.

PRAÇA, F.S.G.; MEDINA, W.S.G.; ELOY, J.E. Evaluation of critical parameters for *in vitro* skin permeation and penetration studies using animal skin models. **Eur. J. Pharmac. Sci.** v.11, p. 121-132, 2018.

PRADEEP, C.R.; KUTTAN, G. Piperine is a potent inhibitor of nuclear factor- κ B (NF- κ B), c-FOS, CREB, ATF-2 and proinflammatory cytokine gene expression in B16F-10 melanoma cells **Int. Immunopharmacology.** v.4, n. 14, p. 1795-1803, 2004.

PRAKASH, K.; RAJU, P.N.; KUMARI, K.S.; NARASU, M.L. Solubility and dissolution rate determination of different antiretroviral drugs in different pH media using UV visible spectrophotometer. **E-J. Chem.** v.5, n.S2, p. 1159-1164, 2008.

- PREZOTTI, F.G.; MENEGUIN, A.B.; EVANGELISTA, R.C.; CURY, B.S.F. Preparation and characterization of free films of high amylose/pectin mixtures cross-linked with sodium trimetaphosphate. **Drug Development and Industrial Pharmacy**. v.38, p. 1-6, 2012.
- PRICE, R.D.; BERRY, M.G.; NAVSARIA, H.A. Hyaluronic acid: the scientific and clinical evidence. **J Plast Reconstr Aesthet Surg**. v.60, n. 10, p. 1110-1119, 2007.
- PRIMO, F. L.; SIQUEIRA-MOURA, M. P.; SIMIONI, A. R.; PETI, A. P. F.; TEDESCO, A.C. Preparation, characterization and citotoxicity assays of choroaluminum phthalocyanine photosensitizer drug loaded in PLGA-nanocapsules. **Drugs of the Future**. v.32, p. 73-74, 2007.
- RANG, H.P.; RITTER, J.M.; FLOWER, R.J.; HENDERSON, G. **Farmacologia**. 8a. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016. 760 p.
- RAO, J.P.; GECKELER, K.E. Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. *Progress in Polymer Science*. v.36, n.7, p. 887-913, 2011.
- RATHER, R.A.; BHAGAT, M. Cancer Chemoprevention and Piperine: Molecular Mechanisms and Therapeutic Opportunities. **Front Cell Dev Biol**. v.6, 10, 2018. Doi: <https://doi.org/10.3389/fcell.2018.00010>.
- REN, T.; HU, M.; CHENG, Y.; et al. Piperine-loaded nanoparticles with enhanced dissolution and oral bioavailability for epilepsy control. **Eur J Pharm Sci**. v.137, 104988, 2019.
- RIBEIRO, F.A.L.; FERREIRA, M.M.C.; MORANO, S.C.; SILVA, L.R.; SCHNEIDER, R.P. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Química nova**. v.31, n.1, p. 164-171, 2008.
- RIBEIRO, T.S.; FREIRE-DE-LIMA, L.; PREVIATO, J.O.; MENDONÇA-PREVIATO L.; HEISE, N.; LIMA, M.E.F. Toxic effects of natural piperine and its derivatives on epimastigotes and amastigotes of *Trypanosoma cruzi*. **Bioorg Med Chem Lett** v.14, p. 3555-3558, 2004.
- ROGERO, S.O.; LUGÃO, A.B.; IKEDA, T.I.; CRUZ, A.S. Teste in vitro de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Mat Res**. v.6, n.3, p. 317-320, 2003.
- RUSSEL-JONES, R.; POWELL, A.M.; ACLAND, K.; CALONJE, E.; O'DOHERTY, M.; HEALY, C. The chances of a patient with melanoma developing in transit disease are doubled by undergoing sentinel lymph node biopsy (SLNB). **European Journal of Surgery Oncology**. v.31, p. 210-211, 2005.

SABINA, E.P.; NAGAR, S.; RASOOL, M. A Role of piperine on monosodium urate crystal-induced inflammation – An experimental model of gouty arthritis. **Inflammation**. v.34, n.3, p. 184-192, 2011.

SAMYKUTTY, A.; SHETTY, A.V.; DAKSHINAMOORTHY, G.; BARTIK, M.M.; et al. Piperine, a Bioactive Component of Pepper Spice Exerts Therapeutic Effects on Androgen Dependent and Androgen Independent Prostate Cancer Cells. **PLoS One**. v.8, n. 6, e65889, 2013.

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. **Quím. Nova** v.26, n.5, p. 726-737, 2003.

SCHUBERT, H.K.; Michael S. TAYLOR, M.S.; James F. SMITH, J.F.; BORNSTEIN, A.J. A Systematic revision of the genus *Manekia* (Piperaceae). **Systematic Botany**. v.37, n. 3, p. 587-598, 2012

SELVENDIRAN, K.; BANU, S. M.; SAKTHISEKARAN, D. Protective effect of piperine on benzo(a)pyrene-induced lung carcinogenesis in Swiss albino mice. **Clínica Chimica Acta**. v.350, p. 73-78, 2004.

SELVENDIRAN, K.; THIRUNAVUKKARASU, C.; SINGH, J. P.; PADMAVATHI, R.; SAKTHISEKARAN, D. Chemopreventive effect of piperine on mitochondrial TCA cycles and phase-I and GSH-metabolizing enzymes in benzo(a)pyrene induced lung carcinogenesis in Swiss albino mice. **Molecular and Cellular Biochemistry**. v.271, n.1-2, p. 101-106, 2005.

SENGUPTA, S.; RAY, A.B. 1987. The chemistry of *Piper* species: a review. **Fitoterapia** v.58, p. 147-166.

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. **Química Nova**, v.26, n.5, p. 726-737, 2003.

SILVA, M. C.; GUIMARÃES, E. F.; PEREIRA, L. A.; SARNAGLIA-JUNIOR, V. B. Two new species of *Piper* section *Ottonia* (Piperaceae) from southeastern Brazil. **Phytotaxa**. v. 212, n.4, p. 293-299, 2015.

SILVA, S.; COCENZA, D.S.; GRILLO, R.; et al. Paraquat-loaded alginate/chitosan nanoparticles: preparation, characterization and soil sorption studies. **Journal of hazardous materials**, v.190, n. 1-3), p. 366-374, 2011.

- SIMPSON, N.E.; STABLER, C.L.; SIMPSON, C.P.; SAMBANIS, A.; CONSTANTINIDIS, I. The role of the CaCl_2 -guluronic acid interaction on alginate encapsulated betaTC3 cells. **Biomaterials**. v.25, n.13, p. 2603-2610, 2004.
- SIONKOWSKA, A. Current research on the blends of natural and synthetic polymers as new biomaterials: Review. **Progress in Polymer Science**.v. 36, n.9, p. 1254-1276, 2011.
- SKJK-BRÆK, G.; GRASDALEN, H.; LARSEN, B. Monomer sequence and acetylation pattern in some bacterial alginates. **Carbohydrate Research**. v.154, n.1, 239-250, 1986.
- SLEVIN, M.; KRUPINSKI, J.; GAFFNEY, J.; MATOU, S.; WEST, D.; DELISSER, H.; SAVANI, R.C.; KUMAR, S. Hyaluronan-mediated angiogenesis in vascular diseasep. uncovering RHAMM and CD44 receptor signaling pathways. **Matrix Biol**. v.26, n.1, p. 58-68, 2007.
- SOUTO, E.B.; SEVERINO, P.; SANTANA, M.H. Preparation of Polymeric Nanoparticles by Polymerization of Monomers - Part I. **Polímeros**. v.22, n.1, p.96-100, 2011.
- SOUZA, V.C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática**: guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG III. 3a ed. Instituto Plantarum, Nova Odessa, 2012. 768 p.
- SUN, X.; UYAMA, H. A poly(vinyl alcohol)/sodium alginate blend monolith with nanoscale porous structure. **Nanosc Res Letters**. v.8, p. 411, 2013.
- SUNILA, E.S.; KUTTAN, G. Immunomodulatory and antitumor activity of Piper longum Linn. and piperine. **J Ethnopharmacol**. v.90, n. 2-3, p. 339-346, 2004.
- TASLEEM, F.; AZHAR, I.; ALI, S.N.; PERVEEN, S.; MAHMOOD, Z.A. Analgesic and anti-inflammatory activities of *Piper nigrum* L. **Asian Pac J Trop Med**. S1, S461-468, 2014.
- THIEL, A.; BUSKENS, C.; WOEHRLE, T.; ETHEVE, S.; SCHOENMAKERS, A.; FEHR, M.; BEILSTEIN, P. Black pepper constituent piperine: genotoxicity studies in vitro and in vivo. **Food Chem Toxicol**. v.66, p. 350-357, 2014.
- TONNESEN, H.H.; KARLSEN, J. Alginate in drug delivery systems. **Drug Dev Ind Pharm**. v.28, n.6, p. 621-630, 2002.
- TORCHILIN, V.P. Structure and design of polymeric surfactant-based drug delivery systems. **J Control Release**. v.73, n.2-3, p. 137-172, 2001.
- UMAR, S.; SARWAR, A.H.M.G.; UMAR, K.; AHMAD, N.; et al. Piperine ameliorates oxidative stress, inflammation and histological outcome in collagen induced arthritis. **Cell Immunol**. v.284, n. 1-2, p. 51-59, 2013.
- USP, 2011. The United States Pharmacopeia, 34th ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2011.

- VIJAYAKUMAR, R.S.; SURYA, D.; NALINI, N. Antioxidant efficacy of black pepper (*Piper nigrum* L.) and piperine in rats with high fat diet induced oxidative stress. **Redox Rep.** v.9, n.2, p. 105-110, 2004.
- VISSCHER, M.O.; HOATH, S.B.; CONROY, E.; WICKETT, R.R. Effect of semipermeable membranes on skin barrier repair following tape stripping. **Arch Dermatol Res.** v.293, p. 491-499, 2001.
- VOIGT, R. Pharmazeutische technologie: für Studium und Beruf. 9th ed. Stuttgart: Apotheker, 2000.
- WANG, X.; VENKATRAMAN, S.; BOEY, F.; LOO, J.; TAN, L.P. Controlled release of *Sirolimus* from a multilayered PLGA stent matrix. **Biomaterials.** v.27, p. 5588-5595, 2006.
- WEIDINGER, S.; BECK, L.A.; BIEBER, T.; KABASHIMA, K.; IRVINE, A.D. Atopic dermatitis. **Nature Reviews Disease Primers.** v.4, n.1, 2018.
- WONGPA, S.; HIMAKOUN, L.; SOONTORNCHAI, S.; TEMCHAROEN, P. 2007. Antimutagenic effects of piperine on cyclophosphamide induced chromosome aberrations in rat bone marrow cells. **Asian Pacif J Cancer Prev.** v.8, p. 623-627, 2007.
- YANG, Y.C.; LEE, S.G.; LEE, H.K.; KIM, M.K.; LEE, S.H.; LEE, H.S. 2002. A piperidine amide extracted from *Piper longum* L. fruit shows activity against *Aedes aegypti* mosquito larvae. **J Agric Food Chem.** v.50, p. 3765-3767, 2002.
- YAO N., WANG Z.L. Handbook of Microscopy for Nanotechnology. Springer, USA, 2005. 731 p.
- YING, X.; CHEN, X.; CHENG, S.; SHEN, Y.; PENG, L.; XU, H.Z. Piperine inhibits IL- β induced expression of inflammatory mediators in human osteoarthritis chondrocyte. **Int Immunopharmacol.** v.17, n. 2, p. 293-299, 2013.
- YUNCKER, T.G. The Piperaceae of Brazil. **Hoehnea** v. 2, p. 19-366, 1972.
- ZACTITI, E.M.; KIECKBUSCH, T.G. Potassium sorbate permeability in biodegradable alginate films: Effect of the antimicrobial agent concentration and crosslinking degree. **Journal of Food Engineering** v.77, n.3, p. 462-467, 2006.
- ZHAI, W.J.; ZHANG, Z.B.; XU, N.N.; GUO, Y.F.; QIU, C.; Li, C.Y.; DENG, G.Z.; GUO, M.Y. Piperine Plays an anti-inflammatory role in *Staphylococcus aureus* endometritis by inhibiting activation of NF- κ B and MAPK pathways in mice. **Evid Based Complement Alternat Med.** 2016, 8597208, 2016.
- ZIELIŃSKA, A.; CARREIRÓ, F.; OLIVEIRA, A.M.; NEVES, A., et al. Polymeric Nanoparticles: Production, Characterization, Toxicology and Ecotoxicology. **Molecules.** v.25, n.16, 3731, 2020.