

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

**DESENVOLVIMENTO DE NANOEMULSÕES E
NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS CONTENDO
TIOCONAZOL E INCORPORAÇÃO EM HIDROGÉIS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Andréia Pisching Garcia Härter

**Santa Maria, RS, Brasil
2013**

**DESENVOLVIMENTO DE NANOEMULSÕES E
NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS CONTENDO
TIOCONAZOL E INCORPORAÇÃO EM HIDROGÉIS**

Andréia Pisching Garcia Härter

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Controle e Avaliação de Insumos e Produtos Farmacêuticos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Farmacêuticas.**

Orientadora: Profa. Dra. Cristiane de Bona da Silva

**Santa Maria, RS, Brasil
2013**

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**DESENVOLVIMENTO DE NANOEMULSÕES E NANOCÁPSULAS
POLIMÉRICAS CONTENDO TIOCONAZOL E INCORPORAÇÃO EM
HIDROGÉIS**

elaborada por
Andréia Pisching Garcia Härter

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Farmacêuticas

COMISSÃO EXAMINADORA:

Cristiane de Bona da Silva, Dra.
(Presidente/Orientadora)

Valéria Weiss Angeli, Dra. (UCS)

Clarice Madalena Bueno Rolim, Dra. (UFSM)

Santa Maria, 21 de junho de 2013.

*Aos meus pais e ao meu esposo,
pelo amor, apoio e incentivo
a mim sempre dedicados.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que pela Sua graça e Seu imensurável amor me abençoou com oportunidades, sabedoria e discernimento, estando comigo em todos os momentos, me conduzindo e capacitando para que eu chegasse até aqui. Certamente sem Ele nada seria possível. A Ele seja toda a glória, honra e todo meu louvor;

Aos meus pais, Jorge e Dóris, pelo amor incondicional, constante incentivo, pelas orações, por sofrerem comigo, vibrarem com minhas conquistas e vitórias e por não medirem esforços, fazendo sempre o possível para que meus sonhos sejam realizados;

Ao meu esposo, Lucas, pelo amor, cuidado, carinho, paciência, por compreender minha ausência, por ser incansável em me ajudar, pelos mimos, por ouvir meus desabafos, pelo apoio e incentivo constantes;

Ao Fernando, meu maninho amado, por sempre se preocupar comigo e por aguentar minhas provocações;

Aos meus avôs José e Terezinha, a oma Sirlei, tia Mara, Franci, Fabi, tio Marcos e os demais familiares, pelo incentivo, preocupação e orações;

Aos meus sogros, Rubem e Marlen, pela preocupação, carinho, incentivo e orações;

À professora Cristiane de Bona da Silva pela oportunidade, orientação, paciência, exigência, por confiar no meu trabalho, pelo conhecimento transmitido e pelo exemplo de profissional;

À minha IC, Júlia Barros, por toda ajuda, por dispor de finais de semana e feriados para me ajudar, pelo cuidado com que sempre desempenhou suas atividades, pelas conversas e por ter contribuído com o meu crescimento pessoal e profissional;

À todas as meninas do Laboratório de Desenvolvimento Farmacotécnico (Rô, Mari, Ana Luiza, Juh W, Ju Lima, Jú B, Fê, Andréia, Thami e Daiane), com as quais tive o privilégio de conviver durante todo o desenvolvimento deste trabalho, pela amizade, pelas risadas, pela ajuda, pelas conversas, pelas trocas de conhecimento e agradáveis momentos de descontração. Agradeço em especial a Rô e a Mari por toda ajuda (e que ajuda, hein), por não medirem esforços, por estarem sempre dispostas e também por abdicarem dos seus dias de folga e descanso pra contribuírem com a realização deste trabalho; à Juh W pela ajuda com os hidrogéis e a Fê pelo auxílio com os ensaios microbiológicos;

À Rose pelo carinho e pela disponibilidade em ajudar;

As amigas e colegas de mestrado, Sara, Jana, Ana C. e Pri pelas conversas, auxílios, aprendizagem e pelos bons momentos;

As amigas de Ijuí, em especial a Carol (cunhadinha), Luisa e Maria, pela amizade sincera e verdadeira, pelas conversas e por sempre me ouvirem e motivarem;

À Profa. Dra. Sílvia S. Guterres, a Profa. Dra. Adriana R. Pohlmann e ao Prof. Dr. Ruy C.R. Beck da UFRGS pelas análises no mastersizer;

Ao Prof. Dr. Sydney Alves pela doação das cepas de *C. glabrata* e isolado clínico de *C. albicans*;

Aos professores do PPGCF pelo conhecimento transmitido;

À Universidade Federal de Santa Maria pelo espaço físico e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade.

A todos vocês minha sincera gratidão!

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Universidade Federal de Santa Maria

DESENVOLVIMENTO DE NANOEMULSÕES E NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS CONTENDO TIOCONAZOL E INCORPORAÇÃO EM HIDROGÉIS

AUTORA: ANDRÉIA PISCHING GARCIA HÄRTER

ORIENTADORA: CRISTIANE DE BONA DA SILVA

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 21 de junho de 2013.

Este trabalho objetivou o desenvolvimento de nanoemulsões e nanocápsulas poliméricas contendo tioconazol para o tratamento tópico de micoses superficiais. Inicialmente, foi validado um método por cromatografia líquida com detecção UV para quantificação do tioconazol nas formulações nanoestruturadas. O método apresentou-se específico, linear, preciso, exato e robusto. As nanoemulsões e nanocápsulas de PCL contendo o tioconazol (1,0 mg/mL) foram preparadas pelos métodos de emulsificação espontânea e deposição interfacial do polímero pré-formado, respectivamente, utilizando como núcleo oleoso os triglicerídeos de cadeia média ou o óleo de café verde. Os parâmetros físico-químicos avaliados foram tamanho de partículas, índice de polidispersão, pH, potencial zeta, teor e eficiência de encapsulamento. As formulações apresentaram tamanho nanométrico (150 - 200 nm), índice de polidispersão abaixo de 0,15, pH ácido (5,5 a 6,3), potencial zeta negativo (-3,5 a -11,3 mV), teor de fármaco próximo ao teórico e eficiência de encapsulamento próximo a 100%. Com exceção do pH, todos esses parâmetros mantiveram-se iguais após os 30 dias de armazenamento a temperatura ambiente, comprovando a estabilidade dos sistemas. O estudo de fotodegradação do tioconazol frente à luz UVC demonstrou a importância dos sistemas nanoestruturados na fotoproteção do fármaco e uma maior proteção foi verificada para as nanocápsulas contendo óleo de café verde. A atividade antifúngica das nanoestruturas foi avaliada pelo método de difusão em ágar e os resultados demonstraram que as formulações apresentaram ação frente à *C. albicans*, *C. glabrata* e isolado clínico de *C. albicans*. As nanoestruturas foram incorporadas em hidrogéis de Aristoflex[®] AVC e estes caracterizados quanto ao tamanho de partículas após dispersão em água, índice de polidispersão, teor, espalhabilidade, propriedades reológicas e estabilidade frente ao armazenamento. Os hidrogéis apresentaram tamanho nanométrico (196 - 203 nm), índice de polidispersão abaixo de 0,25, pH de 6,3 a 6,5, teor de tioconazol próximo ao teórico (0,99 a 1,01 mg/g), comportamento plástico (modelo de Casson) e perfis de espalhabilidade semelhantes. As formulações mantiveram-se estáveis por 30 dias à temperatura ambiente, sendo evidenciada a importância da parede polimérica nas nanocápsulas em preservar as características das formulações. O estudo de liberação *in vitro* do fármaco a partir dos hidrogéis foi realizado empregando célula de difusão do tipo Franz. Os resultados obtidos demonstraram a capacidade das nanoestruturas em controlar a liberação do tioconazol, sendo que um maior controle foi observado para os hidrogéis contendo as nanocápsulas poliméricas.

Palavras-chave: Hidrogéis. Nanocápsulas. Nanoemulsões. Tioconazol.

ABSTRACT

Master Dissertation

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Universidade Federal de Santa Maria

DEVELOPMENT OF NANOEMULSIONS AND POLYMERIC NANOCAPSULES CONTAINING TIOCONAZOLE AND INCORPORATION IN HYDROGELS

AUTHOR: ANDRÉIA PISCHING GARCIA HÄRTER

ADVISOR: CRISTIANE DE BONA DA SILVA

Place and Date of Defense: Santa Maria, June 21, 2013.

This work aimed to develop nanoemulsions and polymeric nanocapsules containing tioconazole for the topical treatment of superficial mycoses. Initially, a method was validated by liquid chromatography with UV detection to quantify the tioconazole in the nanostructured formulations. The method proved to be specific, linear, precise, accurate and robust. The nanoemulsions and tioconazole-loaded PCL nanocapsules (1.0 mg/mL) were prepared by spontaneous emulsification and interfacial deposition of preformed polymer methods, respectively, and using as oily core medium chain triglycerides or green coffee oil. The physicochemical parameters evaluated were: particle size, polydispersity index, pH, zeta potential, drug content and encapsulation efficiency. Formulations presented nanometric mean size (150-200 nm), polydispersity index below 0.15, acid pH (5.5 to 6.3), negative zeta potential (-3.5 to -11.3 mV), drug content close to the theoretical and encapsulation efficiency close to 100%. With the exception of pH, all these parameters remained the same after 30 days of storage, proving the stability of systems. The study of photodegradation of tioconazole against UVC light has shown the importance of nanostructured photoprotection in the drug and the greater protection was observed for the nanocapsules containing green coffee oil. The antifungal activity of the nanostructures was evaluated by agar diffusion and the results showed that the formulations presented antifungal activity against the yeast *C. albicans*, *C. glabrata* and clinical isolate of *C. albicans*. The nanostructures were incorporated into Aristoflex[®] AVC hydrogels and those were characterized by size of particles when dispersed in water, polydispersity index, drug content, spreadability, rheological properties and stability. The hydrogels had nanometer size (196-203 nm), polydispersity index below 0.25, pH 6.3 to 6.5, tioconazole content close to theoretical (0.99 to 1.01 mg/g) plastic behavior (model Casson) and similar spreadability profiles. The formulations were stable for 30 days at room temperature, evidencing the importance of the polymeric wall in the nanocapsules to preserve the characteristics of the formulations. The study of the *in vitro* release of drug from the hydrogel was carried out using diffusion Franz cell. The results demonstrated the ability of nanostructures to control the release of tioconazole, with greater control observed for hydrogels containing polymeric nanocapsules.

Keywords: Hydrogels. Nanocapsules. Nanoemulsions. Tioconazole.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

FIGURA 1 - Estrutura química do anel imidazólico..... 24

CAPÍTULO 1: Validação de metodologia analítica por cromatografia líquida para quantificação do tioconazol associado à nanocápsulas poliméricas.

FIGURA 1 – Estrutura química do tioconazol 37

FIGURA 2 - Cromatogramas obtidos por CLAE para a formulação placebo (NC-B), solução de tioconazol (20,0 µg/mL) e suspensão de nanocápsula polimérica contendo tioconazol (NC-TIO) (20,0 µg/mL)..... 43

CAPÍTULO 2: Nanoemulsões e nanocápsulas poliméricas contendo tioconazol: Desenvolvimento, caracterização, avaliação da fotoestabilidade e atividade antifúngica *in vitro*.

FIGURA 1 – Peso dos filmes poliméricos em intervalos de tempo..... 56

FIGURA 2 - Distribuição do tamanho de partículas das nanoemulsões e nanocápsulas poliméricas contendo tioconazol (1,0 mg/mL), analisadas por espectroscopia de correlação de fótons. (A) NC-TCM-TIO, (B) NE-TCM-TIO, (C) NC-OC-TIO e (D) NE-OC-TIO..... 58

FIGURA 3 - Distribuição do tamanho de partículas das nanoemulsões e nanocápsulas poliméricas contendo tioconazol (1,0 mg/mL), analisadas por difração a laser. (A) NC-TCM-TIO, (B) NE-TCM-TIO, (C) NC-OC-TIO e (D) NE-OC-TIO..... 58

FIGURA 4 - Distribuição do potencial zeta das nanoemulsões e nanocápsulas poliméricas contendo tioconazol (1,0 mg/mL), analisadas através da mobilidade eletroforética. (A) NC-TCM-TIO, (B) NE-TCM-TIO, (C) NC-OC-TIO e (D) NE-OC-TIO..... 59

FIGURA 5 - Tamanho médio das partículas e PDI das nanocápsulas poliméricas e nanoemulsões contendo tioconazol (NC-TCM-TIO; NE-TCM-TIO; NC-OC-TIO e NE-OC-TIO) determinados no estudo de estabilidade a temperatura ambiente..... 61

FIGURA 6 - Potencial zeta das nanocápsulas poliméricas e nanoemulsões contendo tioconazol (NC-TCM-TIO; NE-TCM-TIO; NC-OC-TIO e NE-OC-TIO) determinados no

estudo de estabilidade a temperatura ambiente.....	61
FIGURA 7 - Teor residual de tioconazol em função do tempo após exposição da solução metanólica do fármaco (S-TIO), nanocápsulas poliméricas (NC-TCM-TIO e NC-OC-TIO) e nanoemulsões (NE-TCM-TIO e NC-OC-TIO) à luz UVC.....	63
FIGURA 8 - Cromatograma obtido por CLAE para a solução metanólica de tioconazol (S-TIO) após 5 horas de exposição à luz UVC.....	65

CAPÍTULO 3: Hidrogéis contendo nanocápsulas poliméricas e nanoemulsões de tioconazol: desenvolvimento, caracterização e liberação *in vitro*.

FIGURA 1 - Representação gráfica do diâmetro médio das partículas das suspensões de nanocápsulas poliméricas e nanoemulsões contendo tioconazol com TCM (NC _{TCM} -TIO e NE _{TCM} -TIO) e OC (NC _{OC} -TIO e NE _{OC} -TIO) e os respectivos hidrogéis (HG-NC _{TCM} -TIO, HG-NE _{TCM} -TIO, HG-NC _{OC} -TIO e HG-NE _{OC} -TIO).....	84
FIGURA 2 - Representação gráfica de viscosidade (mPa.s) dos hidrogéis de Aristoflex [®] AVC contendo nanocápsulas e nanoemulsões de tioconazol em função da velocidade de cisalhamento (s ⁻¹).....	85
FIGURA 3 - Reogramas dos hidrogéis de Aristoflex [®] AVC. (1) HG-NC _{TCM} -TIO; (2) HG-NE _{TCM} -TIO; (3) HG-NC _{OC} -TIO; (4) HG-NE _{OC} -TIO e (5) HG-TIO.....	86
FIGURA 4 - Representação gráfica da espalhabilidade dos hidrogéis de Aristoflex [®] AVC em função do peso adicionado (g).....	89
FIGURA 5 - Liberação <i>in vitro</i> do tioconazol a partir dos hidrogéis em função do tempo (h).....	90
FIGURA 6 - Avaliação do tamanho das partículas e do índice de polidispersão (PDI) dos hidrogéis contendo nanocápsulas de tioconazol com TCM (HG-NC _{TCM} -TIO) e OC (HG-NC _{OC} -TIO) e de nanoemulsões de tioconazol com TCM (HG-NE _{TCM} -TIO) e OC (HG-NE _{OC} -TIO) após preparação e 30 dias de armazenamento a temperatura ambiente.....	93

DISCUSSÃO GERAL

FIGURA 1 - Hidrogéis contendo nanocápsulas e nanoemulsões de tioconazol com TCM (A e B, respectivamente), nanocápsulas e nanoemulsões de tioconazol com OC (C e D, respectivamente) e hidrogel contendo tioconazol livre (E), no tempo zero e após 30 dias de armazenamento à temperatura ambiente.....	106
---	-----

APÊNDICES

FIGURA 1 - Cromatogramas obtidos por CL. Hidrogel contendo nanocápsulas de tioconazol e OC (20 µg/mL) e formulação placebo (sem a presença do fármaco).....	126
FIGURA 2 - Cromatogramas obtidos por CL. Solução de tioconazol (5 µg/mL) e meio receptor (etanol:água 40:60).....	127

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1: Validação de metodologia analítica por cromatografia líquida para quantificação do tioconazol associado à nanocápsulas poliméricas

TABELA 1 – Resultados da precisão do método analítico por CLAE (repetibilidade e precisão intermediária) para a quantificação do tioconazol em nanocápsulas poliméricas.....	44
TABELA 2 - Resultados obtidos para o ensaio de exatidão do método analítico por CLAE para a quantificação do tioconazol em nanocápsulas poliméricas (n = 3).....	44
TABELA 3 - Análise da robustez do método analítico por CLAE para a quantificação do tioconazol em nanocápsulas poliméricas.....	45

CAPÍTULO 2: Nanoemulsões e nanocápsulas poliméricas contendo tioconazol: Desenvolvimento, caracterização, avaliação da fotoestabilidade e atividade antifúngica *in vitro*.

TABELA 1 - Características físico-químicas das nanocápsulas poliméricas e nanoemulsões de tioconazol contendo os óleos – TCM (NC-TCM-TIO e NE-TCM-TIO) e OC (NC-OC-TIO e NE-OC-TIO) e suas respectivas formulações sem o fármaco (NC-TCM; NE-TCM; NC-OC e NE-OC) (n = 3, média ± desvio padrão).....	57
TABELA 2 - Valores de pH e teor de tioconazol determinados no estudo de estabilidade das suspensões de nanocápsulas poliméricas (NC-TCM-TIO e NC-OC-TIO) e nanoemulsões (NE-TCM-TIO e NE-OC-TIO) após preparação e 30 dias a temperatura ambiente (n = 3, média ± desvio padrão).....	62
TABELA 3 - Parâmetros de constante de velocidade de degradação (k), tempo de meia vida ($t_{1/2}$) e correlação (r^2) para solução metanólica de tioconazol (S-TIO), suspensão de nanocápsulas e nanoemulsões de tioconazol com TCM e OC (NC-TCM-TIO e NE-TCM-TIO, respectivamente), suspensão de nanocápsulas e nanoemulsão de tioconazol com TCM e OC (NC-OC-TIO e NE-OC-TIO, respectivamente) após o estudo de fotodegradação frente à luz UVC.....	64
TABELA 4 - Diâmetro dos halos de inibição (mm) do tioconazol livre (TIO), suspensão de nanocápsulas e nanoemulsão de tioconazol com TCM e OC (NC-TCM-TIO e NE-TCM-TIO, respectivamente), suspensão de nanocápsulas e nanoemulsão de tioconazol com TCM e OC (NC-OC-TIO e NE-OC-TIO) (n = 3, média ± desvio padrão).....	66

CAPÍTULO 3: Hidrogéis contendo nanocápsulas poliméricas e nanoemulsões de tioconazol: desenvolvimento, caracterização e liberação *in vitro*.

TABELA 1 - Características físico-químicas dos hidrogéis de Aristoflex® AVC contendo nanocápsulas poliméricas e nanoemulsões de tioconazol de tioconazol e os óleos – TCM (HG-NC _{TCM} -TIO, HG-NE _{TCM} -TIO, HG-NC _{OC} -TIO e HG-NE _{OC} -TIO) e com fármaco livre (HG-TIO) (n = 3, média ± desvio padrão).....	83
TABELA 2 - Valores de viscosidade (η), valor de cedência (τ_0) e fator de espalhabilidade (F_e) calculados para os hidrogéis de Aristoflex® AVC contendo nanocápsulas e nanoemulsões de tioconazol e o fármaco livre (n = 3, média ± desvio padrão).....	88
TABELA 3 - Constantes de velocidade (k), coeficientes de correlação (r) e MSC obtidos no estudo de liberação <i>in vitro</i> do tioconazol para os hidrogéis contendo o fármaco livre (HG-TIO), nanocápsulas poliméricas (HG-NC _{TCM} -TIO e HG-NC _{OC} -TIO) e nanoemulsões (HG-NE _{TCM} -TIO e HG-NE _{OC} -TIO) de acordo com o modelo de Higuchi (n = 6, média ± desvio padrão).....	91
TABELA 4 - Determinação do pH e teor de tioconazol dos hidrogéis contendo nanocápsulas de tioconazol com TCM (HG-NC _{TCM} -TIO) e OC (HG-NC _{OC} -TIO), e de nanoemulsões contendo tioconazol com TCM (HG-NE _{TCM} -TIO) e OC (HG-NE _{OC} -TIO) após preparação e 30 dias de armazenamento a temperatura ambiente (n = 3, média ± desvio padrão).....	94

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	16
OBJETIVOS	20
1.1 Objetivo geral	20
1.2 Objetivos específicos	20
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
1.1 Micoses superficiais	22
1.2 Tioconazol	24
1.3 Sistemas nanoestruturados	28
1.3.1 Sistemas nanoestruturados contendo fármacos antifúngicos.....	31
CAPÍTULO 1: Validação de metodologia analítica por cromatografia líquida para quantificação do tioconazol associado à nanocápsulas poliméricas	36
1.1 Apresentação	36
CAPÍTULO 2: Nanoemulsões e nanocápsulas poliméricas contendo tioconazol: Desenvolvimento, caracterização, avaliação da fotoestabilidade e atividade antifúngica <i>in vitro</i>	49
2.1 Apresentação	49
CAPÍTULO 3: Hidrogéis contendo nanocápsulas poliméricas e nanoemulsões de tioconazol: desenvolvimento, caracterização e liberação <i>in vitro</i>	74
3.1 Apresentação	74
DISCUSSÃO GERAL	101
CONCLUSÕES	109
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	111

INTRODUÇÃO

As micoses superficiais são processos fúngicos que afetam 40% da população mundial, acometendo todas as faixas etárias e gerando inúmeras despesas em tratamento todos os anos (ARAÚJO et al., 2003). Essas infecções são causadas por fungos que, ao longo do processo evolutivo, desenvolveram a capacidade de invadir e colonizar tecidos queratinizados do organismo, tais como, estrato córneo, pêlos e unhas, promovendo patologias inflamatórias em decorrência de processos de destruição da queratina. Os dermatófitos que mais frequentemente acometem os seres humanos estão distribuídos em várias espécies pertencentes aos gêneros *Epidermophyton*, *Microsporium* e *Trichophyton*, além de algumas leveduras como *Candida* spp. (RUIZ; ZAITZ, 2001).

Obter um tratamento adequado das micoses superficiais é um grande desafio e algumas vezes, pode ser bastante dificultoso. Em parte, toda essa dificuldade pode estar relacionada com a resistência dos micro-organismos aos medicamentos disponíveis ou ineficácia dos mesmos e, ainda, com a falta de adesão ao tratamento por parte do paciente, devido ao alto custo dos medicamentos, a necessidade de tratamentos prolongados e a manifestação de efeitos colaterais (ALMEIDA et al., 2009a). Essas dificuldades são ainda mais evidentes em casos de onicomicoses (infecções fúngicas que acometem as unhas), uma vez que, na maioria das vezes, são necessárias terapias sistêmicas que exigem um longo período de tratamento, apresentam diversos efeitos colaterais, alto custo e ainda, por atuarem em enzimas do sistema citocromo P-450, são passíveis de apresentarem interação com outros medicamentos (RUIZ; CHIACCHIO, 2005). O uso de antifúngicos tópicos é uma alternativa para casos onde não haja comprometimento da matriz da unha; entretanto, é pouco utilizado devido à dificuldade de se obterem concentrações adequadas do fármaco no local infectado, pela baixa penetração da substância ativa na lâmina ungueal. Outros fatores também podem estar relacionados ao insucesso do tratamento, dentre eles o lento crescimento das unhas, tornando-as vulneráveis a uma reinfecção e a resistência dos microorganismos aos medicamentos (BARAN; KAOUKHOV, 2005).

O tioconazol é um agente antifúngico sintético de amplo espectro de ação, utilizado por via tópica no tratamento da candidíase mucocutânea, dermatofitoses da pele e unhas e pitiríase versicolor (WELSH; CABRERA; WELSH, 2010). Para o tratamento de infecções fúngicas superficiais, o tioconazol é aplicado em concentração de 1%, na forma de creme, loção, spray ou pó, sendo também utilizado no tratamento de onicomicoses (solução tópica a

28%) (SWEETMAN, 2006) e vulvovaginites, em concentração de 6,5%, na forma de creme ou pomada ou, ainda, em óvulos vaginais de 300 mg (BENNET, 1996).

Um dos principais problemas enfrentados na terapêutica tópica com o tioconazol está relacionado à sua reduzida absorção (MUÑOZ et al., 2010), uma vez que a eficácia clínica de um fármaco depende, não só das suas propriedades farmacológicas, mas também da sua disponibilidade no local de ação. A necessidade de elevadas concentrações do fármaco para obtenção do efeito terapêutico desejado pode ser responsável pelo ocasional aparecimento de algumas reações adversas (MUÑOZ et al., 2010), como coceira, descamação da pele, edema, irritação local, ardor, prurido e, relacionados ao uso vaginal, dor durante o ato sexual, dor e queimação vaginal (SWEETMAN, 2006).

Uma forma eficiente de controlar a liberação de substâncias em determinados locais e permitir alterações no tempo de permanência destas no local de ação é através da utilização de sistemas nanoestruturados. Estes sistemas coloidais, por apresentarem tamanho reduzido ($< 1 \mu\text{m}$), melhoram as propriedades físico-químicas dos fármacos, atuando como carreadores que irão distribuí-los em locais específicos (MISCHRA; PATEL; TIWARI, 2010; SCHAFFAZICK et al., 2003). Além disso, podem reduzir possíveis reações de sensibilidade, por diminuírem o contato direto do ativo com a região alvo, bem como pelo uso de concentrações menores do fármaco. Por promoverem um aumento no tempo de permanência e adesividade, a utilização de nanopartículas em formas farmacêuticas semissólidas se mostra muito vantajosa, uma vez que são destinadas à aplicação em regiões suscetíveis à fricção por vestimentas ou por simples atividades cotidianas (GUTERRES; ALVES; POHLMANN, 2007). Nesse sentido, a incorporação do tioconazol em sistemas nanoestruturados poderia promover uma maior permeabilidade, eficácia antifúngica e diminuição da irritação em relação às suas formas farmacêuticas já conhecidas.

Tendo em vista as vantagens apresentadas pelos sistemas nanoestruturados associado aos problemas enfrentados na terapêutica com o tioconazol, este trabalho objetivou o desenvolvimento de nanoemulsões e nanocápsulas poliméricas contendo tioconazol para aplicação tópica. Além disso, com o intuito de se obter uma forma farmacêutica final para os sistemas desenvolvidos, estes foram incorporadas em géis hidrofílicos. Cabe salientar que, até o momento, não há relatos na literatura de sistemas nanoestruturados contendo tioconazol, tão pouco sua associação a géis.

Este trabalho foi dividido em três partes experimentais, sendo que o capítulo 1 se refere à validação de uma metodologia analítica por cromatografia líquida com detecção UV para a quantificação do tioconazol associado às nanoestruturas; no capítulo 2 é apresentado o

desenvolvimento e a caracterização das suspensões de nanoemulsões e nanocápsulas poliméricas contendo o tioconazol, bem como a avaliação da atividade antifúngica *in vitro* e da fotoestabilidade dos sistemas desenvolvidos; e por fim, no capítulo 3 é apresentado o desenvolvimento e a caracterização dos hidrogéis contendo as formulações líquidas nanoestruturadas e a liberação *in vitro* do fármaco a partir dos sistemas semissólidos.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

1.1 Objetivo geral

Desenvolver nanoemulsões e nanocápsulas poliméricas contendo tioconazol, visando sua incorporação em base semissólida do tipo hidrogéis.

1.2 Objetivos específicos

- Validar um método analítico por cromatografia líquida com detecção UV para a determinação do tioconazol em nanoemulsões e nanocápsulas poliméricas;
- Preparar nanoemulsões e suspensões de nanocápsulas de PCL contendo tioconazol (1 mg/mL) com diferentes núcleos oleosos (triglicerídeos de cadeia média e óleo de café verde);
- Caracterizar as formulações quanto ao diâmetro médio de partículas, distribuição de tamanho, potencial zeta, pH, teor de fármaco e eficiência de encapsulamento;
- Avaliar a fotoestabilidade do tioconazol incorporado aos sistemas nanoestruturados frente à radiação UVC;
- Estudar a estabilidade do fármaco associado às suspensões de nanocápsulas poliméricas e nanoemulsões frente ao armazenamento por um período de 30 dias;
- Avaliar a atividade antifúngica *in vitro* do tioconazol associado às suspensões de nanocápsulas poliméricas e nanoemulsões frente à *C. albicans*, *C. glabrata* e isolado clínico de *C. albicans* pelo método de difusão em ágar;
- Preparar géis hidrofílicos de Aristoflex[®] AVC contendo os nanocarreadores;
- Caracterizar os hidrogéis quanto ao diâmetro médio de partículas, distribuição de tamanho, pH, teor de fármaco, espalhabilidade e propriedades reológicas;
- Comparar os perfis de liberação *in vitro* do fármaco a partir dos hidrogéis desenvolvidos, utilizando células de difusão do tipo Franz.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Micoses superficiais

A pele é o órgão responsável em proteger organismo, formando uma barreira biológica contra agentes externos. Este órgão é composto por três camadas: a epiderme, a derme e a hipoderme, sendo que a epiderme é formada por queratinócitos que vão se diferenciando e amadurecendo até formarem o estrato córneo. O estrato córneo é composto por células anucleadas cujo citoplasma é rico em queratina (WYATT et al., 2005; CEVEC; VIERL, 2010). Tecidos queratinizados são altamente susceptíveis ao crescimento de fungos dermatófitos, uma vez que estes, através de enzimas proteolíticas, hidrolisam a queratina liberando substâncias essenciais para o seu desenvolvimento (nitrogênio, carbono e enxofre). Ao colonizarem a pele, unhas e/ou cabelos, esses microrganismos desencadeiam processos inflamatórios locais denominados dermatofitoses ou micoses superficiais. Essas micoses são frequentemente transmitidas por contato direto, sendo que a infecção ocorre pela inoculação de fragmentos de hifas sob uma área geralmente lesada, associada à capacidade do fungo em degradar a queratina (SIDRIM; ROCHA, 2004; MARTINEZ-ROSSI; PERES; ROSSI, 2008). Algumas infecções tendem a cronicidade e as recidivas podem ser por reinfecção ou pelo fato da infecção original não ter sido tratada em sua totalidade (DRAKE et al., 1999).

As micoses superficiais estão entre as doenças infecciosas mais comuns, afetando a qualidade de vida de milhares de pessoas por causarem coceira, desconforto, dor nas regiões afetadas e constrangimentos (GARG et al., 2009; TABORDA, et al., 2010). Além de danos causados aos pacientes, essas enfermidades representam um dos principais problemas sanitários a nível mundial, gerando um custo significativo para os sistemas de saúde de países desenvolvidos e subdesenvolvidos. As principais micoses superficiais são:

a) Tineas: são lesões dermatofíticas que acometem, exclusivamente, o estrato córneo, couro cabeludo e/ou região da barba e bigode. São divididas em: *tinea capitis* e *barbae* (*Trychophyton tonsurans*, *T. mentagrophytes*, *T. schoenleinii* e *Microsporum canis*); *tinea pedis* (*T. rubrum*, *T. tonsurans* *Epidermophyton floccosum*); *tinea cruris* (*T. rubrum*, *E. floccosum*) e *tinea corporis* (*T. rubrum*; *T. mentagrophyte*; *T. verrucosum* e *M. canis*) (SIDRIM; ROCHA, 2004).

b) Pitiríase versicolor: também conhecida como micose de praia ou pano branco, causada pelo agente etiológico *Malassezia furfur*. Neste tipo de infecção, as lesões são caracterizadas por

placas hipo ou hiperpigmentadas, escamosas e de bordas delimitadas que podem se estender por diversas áreas do corpo, dentre elas, região cervical, ombros e tórax (SIDRIM; ROCHA, 2004).

c) Candidíases: são infecções produzidas por espécies do gênero *Candida*, sendo a *C. albicans* a espécie comumente encontrada. A infecção pode ocorrer em qualquer parte do corpo, apresentando maior incidência nas mucosas (orofaríngea, vaginal, retal, entre outras) (PAPPAS et al., 2004).

d) Onicomicoses ou tinea unguium: são infecções fúngicas superficiais de um ou mais componentes da unidade ungueal e representam de 18 a 40% de todas onicopatias (ALBERT; WEIS, 2004). Dentre os fungos que apresentam maior predileção pela queratina das unhas se destacam as espécies dos gêneros *Trychophyton*, *Epidermophyton* e *Candida* (HAY; BARAN, 2011). Ao se alojarem nas unhas, estes fungos causam lesões características, deixando-as mais grossas e com cor amarelada ou esbranquiçada. Essas infecções podem, também, induzir outros sintomas, como o descolamento da unha do seu leito, o aparecimento de linhas transversais e longitudinais e, ainda, a presença de escamas esbranquiçadas depositadas sob as mesmas (REPKA et al., 2002).

De todas as dermatofitoses apresentadas, a maior dificuldade de tratamento está relacionada às onicomicoses, apresentando uma taxa de insucesso terapêutico de 25 a 35% (GARCÍA; PILAR; ERCHIGA, 2007). Os fungos que acometem as unhas são muito difíceis de erradicar, devido ao lento crescimento das unhas (5 a 6 meses para as unhas das mãos e 12 a 18 meses para as unhas dos pés) e, principalmente, pela baixa absorção dos medicamentos por esta via, em função da densa estrutura queratínica da unha, bem como sua baixa vascularização (NAKASHIMA et al., 2002).

O aumento na prevalência das dermatofitoses associado ao uso disseminado de antifúngicos e, por conta disso, o aparecimento de cepas resistentes, torna preocupante o tratamento dessas infecções. Entretanto, o grande desafio é desenvolver formas farmacêuticas que contenham veículos capazes de promover uma alta taxa de difusão do princípio ativo, de modo que se possa atingir a região infectada e na dose adequada.

Nesse sentido, espera-se que um agente tópico para infecções fúngicas superficiais tenha um amplo espectro de ação, seja eficaz em baixas concentrações, possibilite esquemas de dosagem convenientes, possua maior atividade fungicida do que fungistática, apresente alta afinidade pelo estrato córneo, seja bem tolerado, não sensibilizante e apresente baixa incidência de recidivas (MACHADO, 2008).

Em geral, o tratamento das micoses superficiais é realizado pela administração tópica de fármacos antifúngicos, destacando-se os derivados imidazólicos (cetoconazol, miconazol, tioconazol, entre outros), polienos (nistatina) e alilaminas (terbinafina) (BERGOLD; GEORDIADIS, 2004).

1.2 Tioconazol

O surgimento dos derivados imidazólicos, ao fim da década de 60 e durante os anos 70, representou uma importante etapa na terapêutica das micoses superficiais. Esses compostos apresentam estruturas químicas semelhantes, tendo em comum, um anel imidazólico livre (com dois nitrogênios) unido através da ligação C-N a outros anéis aromáticos (Figura 1). A presença desses anéis é o que difere essas moléculas e são responsáveis pelas diferentes propriedades físico-químicas e biológicas apresentadas por estes fármacos (SILVA, 1994).

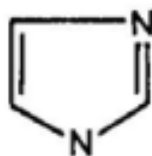


Figura 1: Estrutura química do anel imidazólico.

Os imidazóis possuem mecanismo e espectro de ação semelhantes, sendo ativos contra todos os fungos causadores de infecções superficiais da pele e mucosas. São muito eficazes, possuem baixa toxicidade, baixos níveis de resistência e possuem meia vida sérica suficiente para possibilitar a terapia com uma ou duas aplicações ao dia. Não são observados efeitos colaterais sistêmicos após o uso tópico destes fármacos, uma vez que a absorção sistêmica dos mesmos é insignificante. No entanto, reações locais como ardor, irritação, descamação, eritema, prurido e formação de vesículas são relatados em alguns casos (SIDRIM; ROCHA, 2004).

Os principais derivados imidazólicos utilizados são: bifonazol, cetoconazol, clotrimazol, econazol, isoconazol, miconazol, oxiconazol, sertaconazol, terconazol e

tioconazol. Esses fármacos formam um grupo de compostos sintéticos utilizados, exclusivamente, por via tópica, com exceção do cetoconazol e miconazol que também podem ser administrados por via oral e parenteral, respectivamente (REYNOLDS, 1996; SIDRIM; ROCHA, 2004).

O tioconazol é um derivado imidazólico desenvolvido pela Pfizer[®] (BEGGS, 1984), sendo desde então utilizado no tratamento tópico de infecções cutâneas e de unhas causadas por dermatófitos, candidíases mucocutâneas e pitiríase versicolor (SWEETMAN, 2006). Caracteriza-se como um pó cristalino branco ou quase branco, muito pouco solúvel em água, muito solúvel em clorofórmio e facilmente solúvel em etanol (BRITISH PHARMACOPOEIA, 2010). Sua fórmula molecular é $C_{16}H_{13}Cl_3N_2OS$, apresenta uma massa de 387,71 g/mol (USP, 2009), pKa de 6,5 (FERGUSON; GOODALL; LORAN, 1998) e LogP de 4,29 (VRAKAS; GIAGINIS; TSANTILI-KAKOULIDOU, 2006).

Quanto ao seu espectro de ação, possui atividade frente à *Candida* sp., *Trichophyton* sp., *Epidermophyton* sp., *Microsporum* sp., *Malassezia furfur*, além de atividade antimicrobiana contra vários microrganismos Gram positivos, incluindo *Staphylococcus* sp., *Streptococcus* sp., *Gardnerella vaginalis*, *Bacteroides* sp. e *Trichomonas vaginalis* (MUÑOZ et al., 2010; SWEETMAN, 2006). A concentração inibitória mínima (CIM) do tioconazol relatada na literatura para *C. albicans* e *C. glabrata* é de 4,7 mg/L e 0,06 mg/L, respectivamente (JEVONS et al., 1979).

A ação terapêutica do tioconazol esta relacionada com a inibição da esterol-14-á-desmetilase, um sistema enzimático microsossomal dependente do citocromo P450, prejudicando a síntese do ergosterol na membrana citoplasmática e levando ao acúmulo de precursores (14-á-metilesteróis) que não possuem as mesmas propriedades físicas que o ergosterol. Esses precursores, conseqüentemente, levam à formação da membrana com propriedades alteradas, impedindo que estas desempenhem funções básicas necessárias ao desenvolvimento dos fungos (GEORGOPAPADAKOU, 2001).

No Brasil, o tioconazol é comercializado sob a forma de pomada (6,5%), óvulo vaginal (300 mg), creme dermatológico (1%), spray (1%) e solução para unhas (28%).

No que se refere à eficácia, o tioconazol apresentou atividade antifúngica igual ou superior a outros derivados azólicos como, por exemplo, o miconazol (FROMTLING, 1988; JEVONS et al., 1979) e o fluconazol (JONES, et al., 1993). A ação do tioconazol em casos de candidíase vaginal foi verificada por Henderson e colaboradores (1983). Neste estudo foi relatado que após a administração do fármaco em óvulo vaginal (100 mg) ou creme (2%), por um período de 3, 6 e 14 dias, e após a dose única do óvulo vaginal (300 mg) ou pomada (6%),

a taxa de cura foi de 85 e 96%, respectivamente. Dois anos após, Kashin e colaboradores (1985) compararam diferentes posologias para o tratamento de dermatofitoses. O estudo foi realizado com dois grupos de pacientes, onde o primeiro foi tratado com tioconazol (creme a 1%) duas vezes ao dia e o segundo apenas uma vez ao dia. Os autores concluíram que não houve diferença significativa na eficácia entre os regimes de tratamento e relataram que reações adversas ocorreram em 6 e 4% dos pacientes dos grupos 1 e 2, respectivamente. Em 1997, um estudo foi realizado por Cryer e Robinson, a fim de avaliar o tempo necessário para ocorrer à ação fungicida do tioconazol frente a *C. albicans* e ao *T. rubrum* após aplicação de uma solução do fármaco a 28%. Os resultados obtidos pela técnica de contagem de micro-organismos viáveis demonstraram que após cinco minutos de exposição já era evidente a ação fungicida do tioconazol frente aos dois micro-organismos testados. Mediante a rápida ação fungicida verificada após a utilização da solução de tioconazol, os autores concluíram, por hipótese, que a baixa taxa de cura das onicomicoses é devido à exposição insuficiente do fármaco aos micro-organismos.

Em um estudo realizado por Hay e colaboradores (1985), 27 pacientes com onicomicose foram tratados duas vezes ao dia com solução de tioconazol a 28%, por um período de até 12 meses. Melhoras significativas foram registradas em mais de 11 pacientes, sendo que desses, seis alcançaram remissão clínica completa e estavam livres da infecção após três meses de tratamento. A solução tópica de tioconazol também foi estudada em uso concomitante com um antifúngico sistêmico. Foram acompanhadas durante 12 meses, 70 unhas acometidas com onicomicose bilateral de 10 pacientes, tratados duas vezes ao dia com 200 mg de griseofulvina e solução de tioconazol ou placebo. Das unhas tratadas com tioconazol, 20 foram curadas, enquanto que apenas 12 das tratadas somente com griseofulvina alcançaram remissão total, sugerindo a utilização do tioconazol como um adjuvante no tratamento destas infecções (HAY; CLAYTON; MOORE, 1987). Em 2003 Simonetti e colaboradores associaram o butilhidroxianisol (BHA) ao tioconazol e observaram uma rápida atividade antimicrobiana *in vitro* contra micro-organismos resistentes (*C. albicans* e *Escherichia coli*). O BHA, utilizado em baixas concentrações, possibilitou uma maior penetração do fármaco no micro-organismo, aumentando a atividade do tioconazol.

Houang e Lawrence (1985) estudaram a permanência do tioconazol na cavidade vaginal e a sua absorção sistêmica após aplicação de óvulo vaginal (300 mg) em dose única. Após oito horas, a concentração no plasma foi de 21,2 ng/mL e após 24 horas não foi detectado em 9 de 10 pacientes. A concentração vaginal após 24 horas foi de 21,4 ng/mL e permaneceu detectável após 48 e 72 horas em 7 de 9 e 2 de 9 pacientes, respectivamente.

Estudos farmacocinéticos em ratos demonstraram mínima absorção sistêmica após aplicação cutânea do tioconazol quando incorporado em creme (ENOGAKI, 1985 *apud* SOBUE; SEKIGUCHI, 2004), o que remete a não existência de efeitos sistêmicos indesejados, sendo relatadas apenas reações locais leves. No entanto, em estudo realizado por Soube e colaboradores (2004) foi relatado que a absorção percutânea do tioconazol é superior a de outros fármacos imidazólicos. Neste estudo avaliou-se a absorção percutânea e a distribuição intradérmica da solução e creme de tioconazol (1%), solução de nitrato de miconazol (1%) e solução de bifonazol (1%) após a aplicação tópica na pele abdominal de cobaias. A maior penetração foi observada para a solução de tioconazol, seguida do creme contendo o fármaco e os autores atribuíram os resultados a potente atividade antifúngica do tioconazol.

Apesar dos efeitos favoráveis na terapêutica com o tioconazol, na literatura científica encontram-se relatos de alguns problemas enfrentados com o uso deste fármaco. Esses problemas estão basicamente relacionados à sua baixa absorção, sendo necessária a utilização de elevadas concentrações do mesmo (por exemplo, solução para unhas – 28%) para obtenção do efeito terapêutico desejado. Essas doses elevadas estariam diretamente relacionadas com o eventual aparecimento de efeitos adversos (MUÑOZ et al., 2010).

O tioconazol está entre os derivados imidazólicos com maior potencial alergênico (DOOMS-GOOSSENS et al., 1995). Stevens (1988) relata que a incidência de efeitos indesejados como ardor e prurido é de 7%. Yoneyama (1996), ao analisar 66 indivíduos tratados com derivados imidazólicos, relatou a ocorrência de dermatite de contato em 35 pacientes, sendo que desses, três foram devido ao uso do tioconazol (8,5%). Neste mesmo contexto, Doods-Goossens e colaboradores (1995) ao revisarem casos de alergia de contato decorrente do uso de derivados imidazólicos, relataram que de 48 pacientes tratados com tioconazol, 33 apresentaram reações positivas.

A alta concentração do fármaco também pode ser o fator responsável pelos casos de sensibilidade ao tioconazol. No período de 1991 a 1994 foram detectados 72 casos de alergia de contato decorrente do uso de tioconazol, em estudo realizado na Finlândia. Desde então, este passou a fazer parte dos testes de sensibilidade de rotina no país, mostrando-se como uma importante causa de alergia, com uma incidência de mais de 1% dos pacientes submetidos ao teste. Ainda neste estudo, os autores sugerem a inclusão do tioconazol em testes de sensibilidade de outros países (HEIKKILA; STUBB; REITAMO, 1995).

Em 2011, com o intuito de reduzir os efeitos colaterais provocados pelo tioconazol após aplicação tópica, aumentar a sua biodisponibilidade, reduzir as doses e aumentar a sua atividade antifúngica, Attama e colaboradores desenvolveram microemulsões contendo

tioconazol para administração oral. Os resultados obtidos demonstraram que a administração oral da microemulsão aumentou a atividade antifúngica *in vitro* e a biodisponibilidade *in vivo* do fármaco (ATTAMA et al., 2011).

1.3 Sistemas nanoestruturados

Os sistemas nanoestruturados são sistemas coloidais que apresentam dimensões de até 1 μm , e diferem entre si de acordo com a composição e organização estrutural (COUVREUR et al., 2002). No campo farmacêutico, o grande interesse em torno destes sistemas está associado com a capacidade das nanoestruturas em controlar a liberação e promover um direcionamento do fármaco ao alvo terapêutico, evitando seu acúmulo em tecidos não-específicos, onde poderia apresentar toxicidade, com consequente aumento da sua concentração no local de ação e sua eficácia (KUMARI; YADAV; YADAV, 2010; MISHRA; BHAVESH; TIWARI, 2010). Além disso, estudos demonstram outras vantagens na associação de substâncias ativas aos nanocarreadores, sendo eles: redução de efeitos adversos, como por exemplo, a proteção das mucosas de lesões provocadas pelos anti-inflamatórios não esteróides (RAFFIN et al., 2003; BECK et al., 2006) e diminuição da irritação local após a aplicação tópica de substâncias (SHAH et al., 2007); aumento da biodisponibilidade após administração oral de fármacos (SONAJE et al., 2010); proteção do fármaco frente à degradações enzimáticas (BECK et al., 2006; BECK et al., 2007); químicas (WEISS-ANGELI et al., 2008; OURIQUE et al., 2008; FONTANA et al., 2009) e peroxidação lipídica (SCHAFFAZICK et al., 2005; SCHAFFAZICK et al., 2008); aumento da permeação cutânea (ALVES et al., 2007); alta habilidade em promover o acesso de fármacos pela barreira hemato-encefálica, proporcionando a liberação cerebral (CALVO et al., 2001; FREDDO, 2009), além de protegerem óleos essenciais da volatilidade (FLORES et al., 2011).

A associação de fármacos aos sistemas nanocarreadores não interfere em seu mecanismo de ação; no entanto, esses sistemas se distribuem pelo organismo e alcançam órgãos e tecidos específicos através do sistema imunológico que os reconhece como substâncias estranhas. A partir disso, as células do sistema fagocitário (principalmente as células de Kupffer do fígado e macrófagos do baço e da medula óssea) removem as nanoestruturas da circulação sanguínea e as direcionam para órgãos do sistema retículo endotelial. Por outro lado, a presença de substâncias hidrofílicas (polietilenoglicol, polissorbato 80, entre outras) na superfície das partículas impedem a adsorção de proteínas séricas, dificultando o reconhecimento pelos macrófagos e outras células fagocitárias e,

consequentemente, fazendo com que as partículas permaneçam por um maior tempo na circulação sanguínea. Este fato, aliado ao reduzido tamanho de partícula, permite que estas atravessem o endotélio capilar presente em tecidos inflamados e tumores sólidos (DEVALAPALLY et al., 2007).

Devido à capacidade desses sistemas em permear as barreiras biológicas, estudos estão sendo direcionados para aplicação das nanoestruturas em diferentes vias de administração, como a via tópica (ALVES et al., 2007, FONTANA et al., 2011), parenteral (OURIQUE et al., 2010, JEONG et al., 2010; THOMAS et al., 2011), oftálmica (GUPTA et al., 2010), nasal (ALONSO, 2004) e oral (BECK et al., 2006).

Na área farmacêutica os principais carreadores nanoestruturados estudados são os lipossomas, as nanopartículas lipídicas, as nanopartículas poliméricas (nanoesferas e nanocápsulas) e as nanoemulsões. Os lipossomas representam a primeira geração de carreadores coloidais, sendo constituídos, principalmente, por fosfolipídios organizados em bicamadas concêntricas em torno de um núcleo aquoso central. A grande vantagem dessas estruturas é o fato de possuírem um caráter anfifílico, permitindo o encapsulamento de substâncias hidrofílicas no núcleo aquoso ou substâncias hidrofóbicas nas membranas de fosfolipídios. Porém, algumas desvantagens são observadas na utilização desses sistemas, como a baixa eficiência de encapsulamento, alto custo de produção e baixa estabilidade físico-química (EDWARDS; BAEUMNER, 2006; JOSHI, MÜLLER, 2008). As nanopartículas lipídicas podem ser divididas em nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) e carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN). Essas partículas são constituídas principalmente por lipídios, sendo que as NLS são constituídas por lipídeos sólidos sob temperatura ambiente e corporal e os CLN possuem um núcleo constituído por uma mistura de lipídios sólidos e líquidos, resultando em uma estrutura mais desorganizada e capaz de promover um maior encapsulamento dos fármacos, quando comparado com as NLS. Como vantagens, essas estruturas apresentam a baixa toxicidade, facilidade de transposição de escala, ausência de solventes orgânicos na preparação e boa compatibilidade (MÜLLER; MADER; GOHLA., 2000; PARDEIKE; HOMMOS; MÜLLER, 2009). No entanto, estas estruturas apresentam desvantagens, como o baixo encapsulamento de fármacos, presença simultânea de outras estruturas coloidais (micelas, lipossomas, nanocristais do fármaco) e instabilidade física durante o armazenamento (GUTERRES; ALVES; POHLMANN, 2007).

As nanoemulsões são emulsões submicrométricas, em geral menores que 300 nm, formadas por gotículas de óleo estabilizadas por tensoativos, dispersas na fase aquosa (BOUCHEMAL et al., 2004). São principalmente empregadas para o encapsulamento de

substâncias lipofílicas, como por exemplo, o propionato de clobetasol (FONTANA et al., 2009) e o óleo de melaleuca alternifolia (FLORES et al., 2011), podendo também encapsular moléculas hidrofílicas, como os oligonucleotídeos (SILVA et al., 2006; MARTINI et al., 2007). As nanopartículas poliméricas são partículas sólidas coloidais divididas em nanoesferas e nanocápsulas. As nanocápsulas poliméricas são vesículas carreadoras de fármacos, compostas por um núcleo geralmente oleoso envolto por uma parede polimérica, podendo o fármaco estar adsorvido a esta parede e/ou dissolvido no núcleo. Já as nanoesferas são formadas por uma matriz polimérica (sem a presença do óleo) e o fármaco pode estar retido ou adsorvido na matriz (SHAFFAZICK et al., 2003; MISHRA; BHAVESH; TIWARI, 2010). Estas nanopartículas apresentam vantagens relacionadas à estabilidade *in vivo* e também durante o armazenamento, quando comparadas aos lipossomas. Recentemente, foram desenvolvidas nanocápsulas de núcleo lipídico, as quais possuem um núcleo hidrofóbico (triglicerídeos de cadeia média) contendo uma substância lipídica sólida (monoestearato de sorbitano), o que remete a um núcleo mais viscoso que as nanocápsulas convencionais, podendo aumentar a estabilidade físico-química (JAGER et al., 2009).

As nanopartículas poliméricas são tecnicamente mais atraentes que as nanoesferas por permitirem altos níveis de encapsulamento de fármacos lipofílicos, devido à presença do núcleo oleoso, e por utilizar uma menor concentração de polímero (ANTON; BENOIT; SAULNIER, 2008). Além disso, a parede polimérica é capaz de prevenir alguns inconvenientes relacionados ao fármaco como, por exemplo, protegê-lo frente à degradação causada pela luz ultravioleta (OURIQUE et al., 2008; FONTANA et al., 2009), modular e controlar a liberação dos fármacos (MARCHIORI et al., 2010) e, ainda, impedir o contato direto do fármaco com os tecidos, reduzindo a irritação local (GUTERRES; ALVES; POHLMANN, 2007).

As nanopartículas poliméricas podem ser preparadas por diversos métodos como, por exemplo, a dispersão de polímeros pré-formados, a polimerização de monômeros dispersos ou a deposição interfacial do polímero pré formado (nanoprecipitação) (SHAFFAZICK et al., 2003). A técnica de deposição interfacial do polímero pré formado foi desenvolvida em 1988 por Fessi e colaboradores, sendo o método mais utilizado para a preparação destas estruturas, por permitir altas taxas de associação de fármacos e boa reprodutibilidade (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010). Através deste método, as nanocápsulas poliméricas são obtidas por meio da injeção de uma fase orgânica constituída de um solvente orgânico miscível em água, um tensoativo de baixo EHL, um óleo, o fármaco e o polímero sobre uma fase aquosa constituída por um tensoativo de alto EHL. Enquanto a fase orgânica é vertida

sobre a fase aquosa, o solvente orgânico (contendo o polímero) se difunde no meio aquoso, e na interface óleo/água o polímero precipita ao redor das gotículas de óleo. O solvente é então removido da fase aquosa por pressão reduzida até o ajuste do volume final da formulação. A utilização de polímeros biodegradáveis e biocompatíveis na preparação das nanocápsulas poliméricas é preferível por promoverem a biodegradação *in vivo* das partículas e consequente remoção do organismo (KALLINTERI et al., 2005). A poli(ϵ -caprolactona), um polímero semicristalino, é o mais empregado devido as suas características de biocompatibilidade, biodegradabilidade e propriedades mecânicas (GUTERRES; ALVES; POHLMANN, 2007).

A determinação das características físico-químicas das nanopartículas poliméricas é de grande importância. A combinação de diversas técnicas de análises se faz necessário para a avaliação da estabilidade desses sistemas, sendo as principais: avaliação do diâmetro médio e da distribuição de tamanho das partículas (espectroscopia de correlação de fótons), determinação do potencial zeta (mobilidade eletroforética), pH, análise morfológica (microscopia eletrônica – transmissão ou varredura, associada ou não à criofratura), teor, taxa de associação e forma de associação do fármaco (ultracentrifugação, ultrafiltração-centrifugação, calorimetria exploratória diferencial, espectroscopia no infravermelho) e liberação *in vitro* do fármaco (difusão em saco de diálise, ultracentrifugação, filtração a baixa pressão ou ultrafiltração-centrifugação) (SCHAFFAZICK et al., 2003; GUTERRES; ALVES; POHLMANN, 2007).

1.3.1 Sistemas nanoestruturados contendo fármacos antifúngicos

A incorporação de fármacos antifúngicos em sistemas nanoestruturados tem se mostrado uma boa alternativa para contornar os problemas enfrentados na terapêutica com esses medicamentos. De um modo geral, os benefícios relatados na literatura a partir da associação dos antifúngicos às nanoestruturas estão relacionados com a redução da toxicidade e efeitos indesejados, melhora dos índices terapêuticos e obtenção de um efeito mais prolongado devido à capacidade das nanoestruturas em promover uma liberação controlada de substâncias a elas associadas.

Devido ao tamanho reduzido, estes sistemas permitem que um maior número de partículas se fixe na superfície dos micro-organismos, promovendo um aumento na eficácia do fármaco (PADMAVATHY; VIJAYARAGHAVAN, 2008). Este fato pode justificar os resultados obtidos por Pons Jr. (2011), onde mesmo em concentrações menores que as usuais (0,4; 0,8 e 1,6 $\mu\text{g/mL}$), nanocápsulas de PCL contendo cetoconazol demonstraram possuir

atividade antifúngica frente à *C. albicans*, com uma potencia de 98,15%. Nanopartículas de PLG [poli(ácido glicólico)] contendo os fármacos econazol e moxifloxacino foram desenvolvidas por Ahmad e colaboradores (2008), a fim de avaliar a potência desses sistemas frente ao *Mycobacterium tuberculosis*. Os resultados obtidos demonstraram que oito doses orais administradas em camundongos infectados foram equipotenciais a 112 doses do fármaco livre, administrada duas vezes ao dia. Além disto, uma única dose oral resultou em manutenção das concentrações terapêuticas do econazol por até 5 dias. Gupta e colaboradores (2000) observaram que o fluconazol incorporado a lipossomas teve sua meia vida significativamente aumentada na cavidade vítrea de coelhos em comparação ao fármaco livre. Em 2008, Peng e colaboradores desenvolveram nanopartículas de PLGA contendo voriconazol e a atividade antifúngica das formulações foram testadas através de ensaios *in vivo* e *in vitro*. Os resultados demonstraram que em ambos os ensaios o itraconazol associado às nanopartículas foi mais eficaz contra *C. albicans* que o fármaco livre. No mesmo contexto, Pattel e colaboradores (2010) observaram uma maior eficácia do itraconazol associado à nanopartículas de PLGA do que a solução do fármaco livre. Os autores atribuíram os resultados obtidos ao tamanho reduzido das partículas, que possibilitou que essas se acumulassem na superfície da parede celular e se internalizassem com maior facilidade.

Zili e colaboradores (2005) desenvolveram nanocápsulas e nanoesferas de PCL contendo griseofulvina pelo método de nanoprecipitação. Uma alta eficiência de encapsulamento foi obtida para ambos os sistemas e o tamanho de partícula foi de 250 a 326 nm para as nanoesferas e de 390 a 400 nm para nanocápsulas. A taxa de dissolução das nanopartículas foi maior do que a da griseofulvina micronizada, segundo os autores, como consequência ocorrerá um aumento na biodisponibilidade do fármaco e possivelmente um aumento na sua eficácia para o tratamento de dermatofitoses.

A liberação controlada de fármacos antifúngicos é bastante almejada, tendo em vista que uma das principais causas de recidivas e falhas na cura de doenças fúngicas se deve ao fato da não adesão do paciente ao tratamento devido à necessidade de freqüentes aplicações do medicamento para obtenção de níveis terapêuticos desejáveis. Nanopartículas lipídicas sólidas contendo clotrimazol foram desenvolvidas por Souto e colaboradores (2004) a fim de avaliar seu perfil de liberação *in vitro*. As formulações apresentaram uma taxa de encapsulamento superior a 50% e um tamanho de partícula em torno de 300 nm. Os resultados obtidos demonstraram que essas formulações propiciaram uma liberação modificada do fármaco por um período de 10 horas. Pandey e colaboradores (2005) desenvolveram nanocápsulas de PLG e alginato estabilizado com quitosana, a fim de

melhorar a biodisponibilidade oral dos antifúngicos econazol e clotrimazol. As nanopartículas foram preparadas pelo método de emulsificação e evaporação do solvente, obtendo um tamanho médio de partículas de 217 nm e 235 nm, e uma eficiência de encapsulamento de 90% e 50% para as formulações com PLG e alginato, respectivamente. Dados farmacocinéticos em ratos demonstraram que houve uma liberação controlada dos fármacos encapsulados por 5-6 dias, enquanto que os fármacos livres foram metabolizados 4-5 horas após administração oral e endovenosa. Em outro estudo, o fluconazol radiomarcado encapsulado em nanocápsulas estericamente estabilizadas foi detectado por maior tempo *in vivo* em infecções induzidas por *C. albicans* que o fluconazol livre (ASSIS, 2008).

Como citado anteriormente, outra vantagem a cerca da associação de antifúngicos a sistemas nanoestruturados é a redução da toxicidade e efeitos indesejados. Estudos realizados em ratos com candidíase sistêmica mostraram que a incorporação da anfotericina B em lipossomas reduziu a sua toxicidade e permitiu o uso de doses mais elevadas, aumentando a eficácia terapêutica (LOPEZ-BERESTEIN et al., 1983). No mesmo contexto, ensaios *in vivo* demonstraram que a toxicidade da anfotericina B foi reduzida após a sua incorporação em nanoesferas de PCL (ESPUELAS et al., 1997). Em outro estudo, foi relado que lipossomas contendo nistatina protegeram os eritrócitos da toxicidade do fármaco livre. Além disso, a dose máxima tolerada de nistatina livre não apresentou efeito no tratamento de camundongos infectados; entretanto, a nistatina associada aos lipossomas aumentou a sobrevivência dos animais (MEHTA et al., 1987). Anos mais tarde, Amaral e colaboradores (2009) associaram a anfotericina B em nanopartículas de PLGA promovendo a isenção de toxicidade renal e hepática em comparação a sua forma livre. Em 2006, Velpandian e colaboradores desenvolveram lipossomas contendo fluconazol com o objetivo de avaliar a toxicidade na retina de coelhos albinos, após a administração do fármaco livre e associado. Os autores concluíram que, mesmo em concentrações menores (100 µg), o fluconazol livre ocasionou mudanças na retina dos coelhos, enquanto que os lipossomas não desenvolveram nenhuma alteração significativa até uma concentração de 200 µg.

Variadas vias têm sido destinadas para a administração de sistemas nanoestruturados contendo fármacos antifúngicos. Chasteingner e colaboradores (1996) associaram o itraconazol a diferentes tipos de nanocarreadores (lipossomas, nanoesferas e complexos de colesterol), objetivando a aplicação intravenosa. Neste estudo, foi avaliada a diferença nas taxas de associação do fármaco aos nanocarreadores. Ambos os carreadores lipídicos propiciaram uma baixa taxa de associação (< 0,6%), sendo que a maior associação do itraconazol foi às nanoesferas (4,1 %). Nanopartículas de Eudragit® RL 100 contendo

anfotericina B foram desenvolvidas com o objetivo de proporcionar uma liberação controlada do fármaco na via ocular. Para a realização do ensaio de liberação foi utilizada célula de difusão, onde o meio receptor foi constituído por uma solução simulando o fluído lacrimal e com barreira de difusão foi utilizada membrana de diálise. As nanopartículas promoveram uma liberação mais rápida na fase inicial (efeito *burst*), seguida por uma etapa sustentada (DAS; SURESH; DESMUKH, 2010). Agarwal e Katare (2002) desenvolveram lipossomas contendo miconazol para aplicação tópica, com o intuito de melhorar a absorção cutânea do fármaco. A permeação cutânea e a retenção do fármaco na pele foram analisadas e os resultados obtidos demonstraram uma elevada absorção e retenção do miconazol associada aos lipossomas, quando comparado com os cremes comerciais contendo o fármaco. Recentemente, Santos e colaboradores (2013) desenvolveram nanocápsulas de Eudragit® RS 100 contendo clotrimazol com o intuito de aumentar o tempo de permanência do antifúngico na região vulvovaginal e promover uma liberação controlada do mesmo. As nanopartículas foram preparadas pelo método de deposição interfacial do polímero pré formando e apresentaram tamanho de partículas em torno de 150 nm, índice de polidispersão abaixo de 0,17 e eficiência de encapsulamento próxima a 100%. O estudo de liberação *in vitro* das suspensões de nanocápsulas foi conduzido a partir da técnica de difusão em sacos de diálise e os resultados demonstraram que após 24 horas de experimento a solução de fármaco livre já havia liberado praticamente 100% do clotrimazol, enquanto que as nanocápsulas contendo o fármaco nas concentrações de 1,0 e 3,0 mg/mL liberaram 66% e 58% do fármaco, respectivamente.

CAPÍTULO 1: Validação de metodologia analítica por CLAE-UV para quantificação do tioconazol associado à nanocápsulas poliméricas.

CAPÍTULO 1: Validação de metodologia analítica por CLAE-UV para quantificação do tioconazol associado à nanocápsulas poliméricas.

1.1 Apresentação

O desenvolvimento de metodologias analíticas destinadas à quantificação de fármacos é de fundamental importância e são imprescindíveis no acompanhamento de formulações farmacêuticas. A validação analítica assegura que a metodologia desenvolvida irá proporcionar resultados confiáveis ao propósito que se destina. Os parâmetros requeridos para a validação de métodos são: especificidade ou seletividade, linearidade, intervalo de concentração, precisão, exatidão, robustez e limites de detecção e quantificação (ICH, 2005). A determinação desses parâmetros é realizada de acordo com guias que fornecem diretrizes a serem seguidas, como por exemplo, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o *International Conference on Harmonization* (ICH).

Alguns métodos para análise do tioconazol por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) são encontrados na literatura; entretanto, são métodos trabalhosos e complexos que utilizam solventes orgânicos de alto custo e solução tampão na preparação da fase móvel.

Diante do exposto, este capítulo tem como objetivo apresentar a validação de um método analítico para quantificação do tioconazol em suspensões de nanocápsulas poliméricas por CLAE-UV.

1 INTRODUÇÃO

Os derivados imidazólicos são agentes antifúngicos caracterizados pela presença de um anel azólico com dois átomos de nitrogênio, o qual se liga a outros anéis aromáticos que conferem a esses fármacos diferentes propriedades físico-químicas e biológicas (SILVA, 1994). O tioconazol (Figura 1) é um imidazol, caracterizado como um pó cristalino branco ou quase branco, muito pouco solúvel em água, muito solúvel em clorofórmio e facilmente solúvel em etanol (BRITISH PHARMACOPOEIA, 2010). Sua fórmula molecular é $C_{16}H_{13}Cl_3N_2OS$, apresenta uma massa de 387,71 g/mol (USP, 2012), pKa de 6,5 (FERGUSON; GOODALL; LORAN, 1996) e LogP de 4,29 (VRAKAS; GIAGINIS; TSANTILI-KAKOULIDOU, 2006).

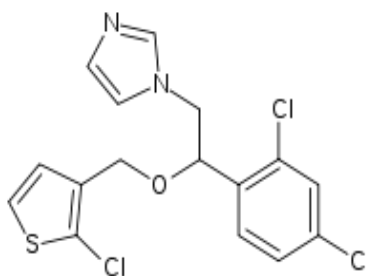


Figura 1: Estrutura química do tioconazol.

Esse fármaco possui um amplo espectro de ação sendo utilizado para o tratamento tópico de dermatofitoses de pele e unhas, pitiríase versicolor e candidíase mucocutânea (SOBUE; SEKIGUCHI, 2004). Relatos de efeitos indesejáveis decorrente do uso de tioconazol são encontrados na literatura, inclusive Dooms-Goossens e colaboradores (1995) o destacam como um dos derivados imidazólicos com maior potencial alergênico. Esses inconvenientes na terapêutica com tioconazol podem estar diretamente relacionados com a baixa absorção do fármaco, uma vez que se faz necessária a utilização de concentrações elevadas para o efeito desejado (MUÑOZ et al., 2010).

Visando minimizar os problemas enfrentados com o uso deste antifúngico, nanocápsulas poliméricas contendo tioconazol foram desenvolvidas pelo nosso grupo de pesquisa. As nanocápsulas poliméricas são nanopartículas compostas por um núcleo geralmente oleoso envolto por um fino filme de polímero, onde o fármaco pode estar

adsorvido na parede, disperso no meio e/ou dissolvido no núcleo (SCHAFFAZICK et al., 2003). Esses sistemas apresentam tamanho de partículas inferior a 1 µm e atuam como carreadores de fármacos, promovendo uma liberação controlada das substâncias em locais específicos. Além disso, promovem uma melhora na resposta terapêutica, permitem a redução da quantidade administrada de fármaco e minimizam efeitos colaterais indesejáveis (RAWAT; SING; SARF, 2006; OURIQUE et al., 2011).

A caracterização dos sistemas nanoestruturados é realizada através de variadas metodologias, sendo fundamental a determinação do teor de fármaco incorporado a eles. Na literatura científica encontram-se alguns métodos para a quantificação do tioconazol em formas farmacêuticas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE); entretanto, nenhum é específico para nanoestruturas. Além disso, são métodos bastante trabalhosos, que utilizam solventes de custo elevado e, ainda, a grande maioria faz uso de solução tampão (BERRIDGE; LAST; PLATT, 1985; PIETRA et al., 1992; FERGUSON; GOODALL; LORAN, 1996; GAGLIARDI et al., 2003).

A Farmacopéia Americana (USP, 2012) descreve como fase móvel a utilização de acetonitrila:metanol:água (44:40:28) baseificada com hidróxido de amônio, tendo como desvantagem o uso de acetonitrila, solvente de alto custo. Outro fator desvantajoso é o comprimento da coluna, que necessita de longo tempo de eluição, retardando o tempo de retenção do pico do tioconazol (entre 12 e 17 minutos). Por outro lado, a Farmacopéia Britânica (2010) descreve métodos para quantificação do tioconazol em forma farmacêutica creme e solução para unhas. Ambas as metodologias utilizam como fase móvel uma mistura de tetrabutilamônio diidrogênio ortofosfato 0,005 M (pH ajustado para 7,4 com hidróxido de amônio 2M) e metanol (1:4), fator esse desvantajoso em se tratando do uso de tampão, por ser prejudicial tanto para o tempo de vida útil da coluna, quanto do equipamento.

Frente ao exposto, o objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento e a validação de uma metodologia analítica capaz de quantificar o tioconazol após a sua associação à nanocápsulas poliméricas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material e Reagentes

O tioconazol (99,22%, m/m) foi obtido da Pharma Nostra (São Paulo, Brasil); metanol de grau cromatográfico foi adquirido da Tedia (Rio de Janeiro, Brasil); o hidróxido de amônia da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil) e a água ultrapura foi purificada através do aparelho MegaPurity Mega RO (Rio de Janeiro, Brasil). Para a preparação das nanopartículas foram utilizados monoestearato de sorbitano (Span[®] 80) e o polímero poli(ϵ -caprolactona) (PCL, Mn = 70,000 – 90,000) obtidos da Sigma-Aldrich (São Paulo, Brasil); triglicerídeos de cadeia média adquiridos da Delaware (Porto Alegre, Brasil) e o polissorbato 80 (Tween[®] 80) e a acetona da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil).

2.2 Preparação da suspensão de nanocápsulas poliméricas

As suspensões de nanocápsulas foram preparadas pelo método de deposição interfacial do polímero pré-formado descrito por Fessi e colaboradores (1989). Foram obtidas nanocápsulas poliméricas de tioconazol (NC-TIO), a uma concentração de 1,0 mg/mL. Para a avaliação da especificidade do método, nanocápsulas sem o fármaco foram, também, preparadas (NC-B).

2.3 Condições cromatográficas

Foi utilizado um cromatógrafo a líquido Shimadzu (Kyoto, Japão), equipado com bomba LC-10AD VP, detector UV SPD-10AVP, central de controle SCL-10A VP e injetor manual Rheodyne (volume de injeção 20 μ L). Os dados foram analisados pelo programa Class-VP (Shimadzu, Kyoto, Japão). Um segundo cromatógrafo foi utilizado para determinação da pureza do pico (Shimadzu LC-20A, Kyoto, Japão), equipado com bomba LC-20AT, detector SPD-M20A PDA e sistema controlador CBM-20A. Como fase estacionária empregou-se uma coluna Gemini[®] Phenomenex C-18 (150 x 4,6 mm) com porosidade de 5 μ m associada a uma pré-coluna Phenomenex[®] C-18 (4,0 x 3,0 mm, 5 μ m). A fase móvel foi composta de metanol:água (80:20, v/v) acrescida de 0,18% de hidróxido de amônio. O sistema foi operado à temperatura ambiente, utilizando fluxo isocrático de

1,0 mL/min. A detecção foi realizada em 219 nm e o tempo de retenção foi de, aproximadamente, 7,2 minutos.

2.4 Preparação das amostras

Para total extração do tioconazol, 400 µL das suspensões de nanocápsulas poliméricas foram adicionados em balão volumétrico de 20 mL juntamente com metanol. Essa solução foi submetida à sonicação por 40 minutos, a fim de romper a estrutura das nanocápsulas. Após, o volume do balão foi aferido, para obtenção da concentração teórica de 20,0 µg/mL. As amostras foram filtradas em filtro quantitativo e em membrana de celulose regenerada (0,45 µm) sendo, após, analisadas através de CLAE-UV (n = 3).

2.5 Preparação da solução de referência

Pesou-se, exatamente, 20 mg de tioconazol, transferindo-se, cuidadosamente, para balão volumétrico de 20 mL, sendo o volume completado com metanol (1,0 mg/mL). A partir dessa solução, uma alíquota de 400 µL foi transferida para balão volumétrico de 20 mL, utilizando metanol como solvente, a fim de obter uma solução de concentração de 20 µg/mL. Todas as soluções foram filtradas em membrana de celulose regenerada (0,45 µm) antes de serem analisadas através do sistema cromatográfico (n = 3).

2.6 Validação do método analítico

Os parâmetros avaliados na validação do método compreenderam: especificidade, linearidade, limites de quantificação e detecção, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), exatidão e robustez (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

2.6.1 Especificidade

A especificidade do método foi determinada pela análise da pureza do pico do tioconazol e pela utilização de uma suspensão de nanocápsulas sem o fármaco, contendo os excipientes utilizados na sua preparação (amostra placebo). Essa suspensão foi submetida ao mesmo processo de preparação das amostras contendo o fármaco (item 2.4), sendo

posteriormente injetada e o cromatograma obtido foi analisado para verificar a possibilidade de alguma inferência dos componentes da formulação.

2.6.2 Linearidade e limites de detecção e quantificação

Para a construção da curva analítica, foram retiradas alíquotas da solução padrão (1,0 mg/mL), a fim de obter concentrações de 5, 10, 20, 30, 40 e 50 µg/mL. Essas soluções foram preparadas em balões de 20 mL e o conteúdo diluído em metanol. Três curvas analíticas independentes foram construídas e a linearidade foi obtida pelo estudo da regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados e analisadas por Análise de Variância (ANOVA). Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados a partir da curva analítica utilizando as equações 1 e 2.

$$LD = 3,3 \cdot DP / S \quad (1)$$

$$LQ = 10 \cdot DP / S \quad (2)$$

Onde: DP = Desvio padrão e S = inclinação da curva analítica.

2.6.3 Precisão

A precisão foi determinada pela repetibilidade e precisão intermediária. A repetibilidade foi realizada a partir da análise de seis amostras independentes, na mesma concentração (20,0 µg/mL), no mesmo dia e nas mesmas condições experimentais. Para a avaliação da precisão intermediária as amostras (20,0 µg/mL) foram analisadas em três dias diferentes (n = 3). Os resultados foram expressos como desvio padrão relativo (DPR, %).

2.6.4 Exatidão

O ensaio de exatidão foi realizado em triplicata, a partir do teste de recuperação. Uma solução de tioconazol na concentração de 10 µg/mL foi preparada, após extração do fármaco das nanocápsulas com metanol. A essa solução foram acrescentadas quantidades de solução mãe, a fim de obter soluções de concentração de 16, 20 e 24 µg/mL (correspondendo a 80, 100 e 120% da concentração usual de análise – 20 µg/mL). O percentual de recuperação foi calculado pela diferença entre as áreas obtidas das soluções acrescentadas ou não da solução mãe (AOAC, 2000).

2.6.5 Robustez

A robustez do método foi avaliada, a partir análise das amostras (20 µg/mL), variando-se o comprimento de onda (216 e 222 nm), o fluxo (0,8 e 1,2 mL/min) e a coluna (Nanoseparation[®] C-18 – 15 x 4,6 mm, porosidade de 5 µm).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O desenvolvimento de uma metodologia analítica capaz de quantificar fármacos incorporados em sistemas nanoestruturados exige cuidados no sentido de garantir a total separação do fármaco do complexo sistema ao qual está confinado. Neste sentido, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) tem se mostrado uma boa alternativa e cada vez mais estudos a cerca do uso dessa metodologia para análise de fármacos nanoestruturados vêm sendo realizados (FONTANA et al., 2010; SANTOS et al., 2012).

Alguns testes para escolha da fase móvel ideal foram realizados, sendo o principal objetivo utilizar um sistema eluente menos complexo que os já relatados na literatura (BERRIDGE; LAST; PLATT, 1985; GAGLIARDI et al., 2003). Inicialmente foram testadas soluções de metanol:água em diferentes proporções (80:20; 85:15; 90:10), sendo o metanol o solvente escolhido por apresentar um menor custo quando comparado à acetonitrila. Todas as fases móveis testadas proporcionaram valores de fator de cauda e pratos teóricos semelhantes (em torno de 1,2 e 3000, respectivamente); entretanto, as proporções 85:15 e 90:10, apesar de promoverem uma redução no tempo de retenção, levaram a uma diminuição da resolução. A proporção 80:20 foi a escolhida por propiciar uma melhor resolução, além de utilizar uma menor quantidade de solvente orgânico. No entanto, no decorrer das análises variações significativas nos parâmetros cromatográficos (área, fator de cauda e resolução dos picos) foram observadas. Essas variações foram atribuídas a mudanças nos valores de pH durante o ensaio. Cabe salientar que em meio levemente ácido e neutro, mesmo com pequenas variações nos valores de pH, a ionização do fármaco muda drasticamente. Desta forma, optou-se pela adição de uma base à fase móvel, a fim de manter o tioconazol na forma não ionizada, sem ser necessário o uso de solução tampão para o controle do pH. A escolha de hidróxido de amônia e da concentração utilizada foi baseada no método descrito pela Farmacopéia Americana (USP, 2012).

A fase móvel composta por metanol:água (80:20) e 0,18% de hidróxido de amônia, mostrou-se adequada, proporcionando um tempo de análise de 9 minutos, picos com boa

resolução (próximo a 10.000), simétricos (fator de cauda em torno de 1,2) e com pratos teóricos em torno de 5000. Após a definição das condições cromatográficas o método foi validado quanto à especificidade, linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão, exatidão e robustez.

No que diz respeito à especificidade, o método mostrou-se específico para a análise do tioconazol, sem ser observada a interferência dos excipientes e/ou solvente no pico cromatográfico do fármaco. A Figura 2 mostra a sobreposição dos cromatogramas obtidos para a amostra (NC-TIO), solução de trabalho e para a solução placebo (NC-B), demonstrando que nenhum pico referente aos excipientes foi detectado no tempo de retenção do tioconazol e nem mesmo próximo a ele. A análise da pureza do pico confirma a especificidade do método, uma vez que o índice de pureza encontrado foi de 1,000.

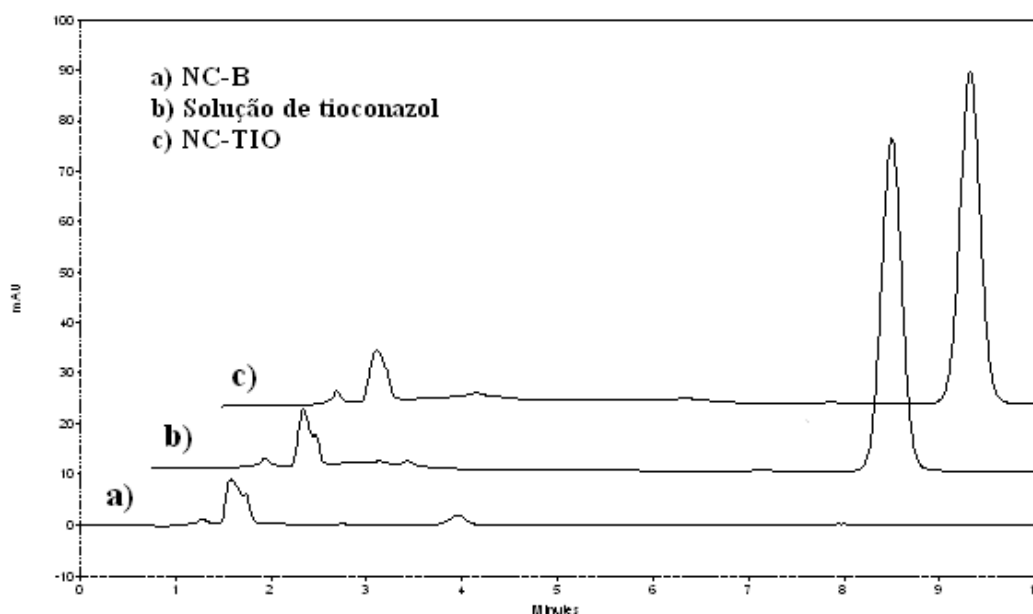


Figura 2: Cromatogramas obtidos por CLAE para a formulação placebo (NC-B), solução de tioconazol (20,0 $\mu\text{g/mL}$) e suspensão de nanocápsula polimérica contendo tioconazol (NC-TIO) (20,0 $\mu\text{g/mL}$).

Na análise da linearidade, as curvas apresentaram adequado coeficiente de correlação ($r = 0,9999$; $y = 52105x - 386,7$), regressão linear significativa ($F_{\text{calculado}} = 64.256,05 > F_{\text{tabelado}} = 4,75$) e sem desvio de linearidade ($F_{\text{calculado}} = 1,74 < F_{\text{tabelado}} = 3,26$), demonstrando que o

método proposto é linear na faixa de concentração de 5 a 50 $\mu\text{g/mL}$. Os valores de LQ e LD foram de 0,61 $\mu\text{g/mL}$ e 0,18 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, evidenciando a sensibilidade do método para baixas concentrações.

Os resultados obtidos para a precisão (repetibilidade e precisão intermediária) estão expressos na Tabela 1. O desvio padrão relativo (DPR) para a repetibilidade foi de 1,42% e para precisão intermediária foi de 1,17%, indicando que a metodologia desenvolvida é precisa dentro da faixa de concentrações avaliada. Os valores de recuperação alcançados para o ensaio de exatidão estão entre 99 e 100%, demonstrando que o método possui exatidão satisfatória (Tabela 2).

Tabela 1: Resultados da precisão do método analítico por CLAE (repetibilidade e precisão intermediária) para a quantificação do tioconazol em nanocápsulas poliméricas.

	Concentração Teórica ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração Experimental ($\mu\text{g/mL}$)	Teor (%)	DPR (%)
Repetibilidade (n = 6)	20,0	19,99 \pm 0,28	99,95 \pm 1,42	1,42
Precisão intermediária				
Dia 1 (n = 3)	20,0	19,74 \pm 0,14	98,70 \pm 0,68	0,69
Dia 2 (n = 3)	20,0	19,93 \pm 0,33	99,64 \pm 1,64	1,65
Dia 3 (n = 3)	20,0	19,67 \pm 0,18	98,35 \pm 0,90	0,92
Média \pm s (n = 9)	20,0	19,78 \pm 0,23	98,89 \pm 1,15	1,17

Tabela 2: Resultados obtidos para o ensaio de exatidão do método analítico por CLAE para a quantificação do tioconazol em nanocápsulas poliméricas (n = 3).

Amostra	Concentração adicionada ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração recuperada ($\mu\text{g/mL}$)	Recuperação (%)
R1	6,01 \pm 0,05	16,19 \pm 0,03	100,32 \pm 0,85
R2	9,99 \pm 0,14	20,16 \pm 0,11	99,93 \pm 1,45
R3	13,95 \pm 0,16	24,12 \pm 0,15	99,63 \pm 1,17
		Recuperação média (%)	99,96 \pm 0,35
		DPR	0,35

R1, R2 e R3: amostras acrescidas da solução mãe.

A Tabela 3 demonstra os resultados encontrados na robustez do método analítico. O método não foi afetado pelas pequenas variações no comprimento de onda, fluxo e nem mesmo pela mudança da marca da coluna, uma vez que os resultados obtidos foram muito semelhantes aos obtidos nas condições recomendadas, apresentando DPR menor que 2% o que indica a robustez do método cromatográfico desenvolvido.

Tabela 3: Análise da robustez do método analítico por CLAE para a quantificação do tioconazol em nanocápsulas poliméricas.

Condições	Pratos teóricos	Fator de cauda	Tempo de retenção	Tioconazol (%)	DPR (%)
Condições recomendadas*	5521,25	1,2	7,2	99,41	1,11
<i>Fluxo (mL/min)</i>					
0,8	6131,3	1,5	9,0	99,51	0,05
1,2	5038,25	1,1	6,2	99,40	0,19
<i>λ (nm)</i>					
216	5626,29	1,3	7,3	100,05	0,71
222	5603,3	1,3	7,3	100,83	1,80
<i>Coluna:</i>					
Nanoseparation® (15 x 4,6 mm)	3478,27	1,2	5,5	99,57	0,04

*: fluxo de 1,0 mL/min; detecção UV a 219 nm; coluna Gemini® Phenomenex C-18.

Mediante o conjunto dos resultados, foi possível verificar que o método cromatográfico desenvolvido é adequado para a análise do tioconazol, podendo ser aplicado para a quantificação do fármaco incorporado em matrizes complexas como as nanocápsulas poliméricas, devido a sua satisfatória seletividade. Comparando com os métodos cromatográficos encontrados na literatura para a análise do tioconazol, o método proposto apresenta como vantagens a facilidade na preparação da fase móvel, a redução de solventes orgânicos e a não utilização de solução tampão, o que preserva o equipamento e aumenta o tempo de vida útil da coluna.

4 CONCLUSÃO

Neste trabalho, um método rápido, simples e eficiente foi desenvolvido para a quantificação do tioconazol em nanocápsulas poliméricas, utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência com detecção UV. O método proposto mostrou-se específico, robusto, preciso, exato e linear na faixa de concentrações de 5 a 50 µg/mL, demonstrando a confiabilidade do mesmo.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis. Ed 17, Gaithersburg, MD, 2000, v. 1.

BERRIDGE, J.C.; LAST, P.E.; PLATT, R.V. High-performance liquid chromatographic determination of tioconazole in pharmaceutical formulations. **Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis**, v. 3, n. 4, p. 391-394, 1985.

BRASIL. Resolução – RE nº 899 de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 02 de junho de 2003.

BRITISH PHARMACOPOEIA. 2010: Her Majesty. Stationary Office, v.2, London, p. 2103-2104, 2010.

DOOMS-GOOSSENS, A.; MATURA, M.; DRIEGH, J.; DEGREEF, H. Contact allergy to imidazoles used as antimycotic agents. **Contact Dermatitis**, v. 33, n. 2, p. 73-77, 1995.

FERGUSON, P.D.; GOODALL, D.M.; LORAN, J.S. Systematic approach to the treatment of enantiomeric separations in capillary electrophoresis and liquid chromatography III. A binding constant-retention factor relationship and effects of acetonitrile on the chiral separation of tioconazole. **Journal of Chromatography A**, v. 745, p. 25-35, 1996.

FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J-Ph.; AMMOURY, N.; BENITA, S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutics**, v.55, n.1, p. R1-R4, 1989.

FONTANA, M.C.; BASTOS, M.O.; BECK, R.C.R. Development and Validation of a Fast RP-HPLC Method for the Determination of Clobetasol Propionate in Topical Nanocapsule Suspensions. **Journal of Chromatographic Science**, v. 48, n. 8, p. 637-640, 2010.

GAGLIARDI, L.; ORSI, D.; CHIMENTI, P.; PORRA, R.; TONELLI, D. HPLC determination of imidazole antimycotics in antidandruff cosmetic products. **Analytical Sciences**, v. 19, p. 1195-1197, 2003.

Internacional Conference on Harmonization (ICH), Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, Q2 (R1), 2005.

MUÑOZ, A.J.C.; TUR-TUR, C.; MOLINA, J.M.H.; SANTOS, P.; CÁRDENES, D.; GIUSIANO, G. Antifúngicos disponibles para el tratamiento de las micosis ungueales. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 27, n. 2, p. 49-56, 2010.

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

PIETRA, A.M.; CAVRINI, V.; ANDRISANO, V.; GATTI, R. HPLC analysis of imidazole antimycotic drugs in pharmaceutical formulations. **Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis**, v. 10, n. 10-12, p. 873-879, 1992.

RAWAT, M.; SINGH, D.; SARAF, S. Nanocarriers: promising vehicle for bioactive drugs. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, p. 1790-1798, 2006.

SANTOS, S. S.; FERREIRA, L. M.; SCHAFFAZICK, S. R.; CRUZ, L. A simple RP-HPLC method for determination of clotrimazole from acrylic nanocapsule suspensions. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 31, n. 3, p. 482-486, 2012.

SCHAFFAZICK, S. R.; FREITAS, L. L.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 726-737, 2003.

SILVA, P. **Farmacologia**. 4. Ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara & Koogan S.A., 1994. p. 1178-1179.

USP 35. The United States Pharmacopeia. 35th. ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2012.

VRAKAS, D.; GIAGINIS, C.; TSANTILI-KAKOULIDOU, A. Different retention behavior of structurally diverse basic and neutral drugs in immobilized artificial membrane and reversed-phase high performance liquid chromatography: Comparison with octanol-water partitioning. **Journal of Chromatography A**, v. 1116, p. 158-164, 2006.

CAPÍTULO 2: Nanoemulsões e nanocápsulas poliméricas contendo tioconazol: Desenvolvimento, caracterização, avaliação da fotoestabilidade e atividade antifúngica *in vitro*.

CAPÍTULO 2: Nanoemulsões e nanocápsulas poliméricas contendo tioconazol: Desenvolvimento, caracterização, avaliação da fotoestabilidade e atividade antifúngica *in vitro*.

2.1 Apresentação

As micoses superficiais são infecções cutâneas causadas por fungos dermatófitos e que afetam a qualidade de vida dos pacientes causando coceira, desconforto e dores nas regiões afetadas (MARTINEZ-ROSSI; PERES; ROSSI, 2008). O tratamento destas infecções tem sido motivo de grande preocupação, devido ao aumento da prevalência dessas doenças e pela ampliação do uso de antifúngicos que levou ao aumento de cepas resistentes. O tioconazol é um antifúngico imidazólico utilizado no tratamento de micoses superficiais. Entretanto, devido à baixa absorção cutânea do fármaco se faz necessário o uso de concentrações elevadas do mesmo a fim de se obter a resposta terapêutica desejada. Esse aumento na sua concentração pode estar relacionado ao aparecimento de efeitos indesejados, como coceira, irritação local, alergias, eritema, prurido, dor durante o ato sexual e queimação vaginal (SWEETMAN, 2006; MUÑOZ et al., 2010). Com o intuito de contornar os problemas enfrentados com os fármacos convencionais, os sistemas nanoestruturados têm sido amplamente estudados. Esses sistemas permitem controlar e modular a liberação de fármacos, reduzir efeitos indesejados e proteger a substância ativa de degradações químicas e enzimáticas (CRUZ et al., 2006; RAWAT et al., 2006).

Diante do exposto, neste capítulo será descrito o desenvolvimento e a caracterização de nanocápsulas poliméricas de poli(ϵ -caprolactona) e nanoemulsões contendo o antifúngico tioconazol. Além disso, uma nova alternativa de fase oleosa para os sistemas nanoestruturados é apresentada através da utilização do óleo de café verde. As formulações foram avaliadas quanto ao teor de fármaco, eficiência de encapsulamento, diâmetro médio, índice de polidispersão, potencial zeta, pH, atividade antifúngica *in vitro* e estabilidade frente ao armazenamento e à radiação UVC.

1 INTRODUÇÃO

O tioconazol é um derivado imidazólico de uso tópico, utilizado no tratamento de candidíases mucocutâneas, pitiríase versicolor e infecções cutâneas e de unhas, causadas por dermatófitos. Possui atividade frente à *Candida spp.*, *Trichophyton spp.*, *Epidermophyton spp.*, *Malassezia furfur*, sendo também ativo frente a algumas clamídeas, tricomonas e bactérias gram positivas (CLISSOLD; HEEL, 1986; SWEETMAN, 2006). Seu mecanismo de ação está basicamente relacionado com a inibição da síntese do ergosterol, acarretando em alterações na formação da membrana celular, comprometendo, assim, o desenvolvimento dos micro-organismos (LATRILLE et al., 1987; JONES et al., 1993).

Apesar de, em alguns casos, possuir eficácia superior a de outros derivados azólicos, como por exemplo, o miconazol (JEVONS et al., 1979; FROMTLING, 1988) e o fluconazol (JONES et al., 1993), a terapêutica com o tioconazol ocasionalmente pode propiciar o aparecimento de alguns efeitos indesejados, como, coceira, queimação, irritação e prurido local (BATISTUZZO; ITAYA; ETO, 2006). Além disso, o tioconazol encontra-se entre os derivados imidazólicos com maior potencial alergênico (DOOMS-GOOSSENS et al., 1995). Essas reações adversas podem estar diretamente relacionadas com a necessidade de doses mais elevadas do fármaco para obtenção da resposta terapêutica (por exemplo, solução para unhas – 28% e creme vaginal – 6,0%), uma vez que este apresenta uma baixa absorção cutânea (MUÑOZ et al., 2010).

Os sistemas nanoestruturados têm sido desenvolvidos e amplamente estudados, a fim de contornar os problemas enfrentados com o uso de formulações convencionais. Esses sistemas são capazes de promover o controle da liberação de fármacos e devido ao seu tamanho reduzido ($< 1 \mu\text{m}$), direcionam as substâncias a sítios específicos, promovendo um aumento na eficácia e possibilitando a redução da frequência de aplicações para obtenção de níveis terapêuticos (SHAFFAZICK et al., 2003; JIMENÉZ et al., 2004; RAWAT; SING; SARF, 2006; MISCHRA; PATEL; TIWARI, 2010). Outros fatores que despertam grande interesse a cerca dessas nanoestruturas é a capacidade de protegerem a substância ativa de degradações químicas (OURIQUE et al., 2008; FONTANA et al., 2009) e enzimáticas (BILATI et al., 2005; BECK et al., 2006) e ainda, reduzirem os efeitos colaterais, por diminuírem o contato direto do ativo com a região alvo e permitirem o uso de concentrações menores do fármaco (SHAH et al., 2007; CARLUCCI; BREGNI, 2009).

Nanocápsulas poliméricas e nanoemulsões são exemplos de sistemas nanoestruturados e constituem os sistemas que serão estudados neste trabalho. As nanocápsulas são formadas

por um invólucro polimérico disposto ao redor de um núcleo geralmente oleoso, enquanto que as nanoemulsões são gotículas oleosas submicrométricas estabilizadas por tensoativos (ANTON; BENOIT; SAULNIER, 2008). Quanto à associação do fármaco a esses sistemas, ele pode estar dissolvido no núcleo, disperso ou ainda adsorvido na superfície externa das partículas (SCHAFFAZICK et al., 2003).

Diferentes tipos de óleos são utilizados no desenvolvimento dos sistemas nanoestruturados. Dentre eles, os triglicerídeos de cadeia média (TCM) são amplamente utilizados, por solubilizarem diversos tipos de fármacos e serem biocompatíveis (MORA-HUERTAS et al., 2010). Por outro lado, uma série de óleos vegetais vem sendo estudados como alternativa para o desenvolvimento desses sistemas (FRIEDRICH et al., 2008; ALMEIDA et al., 2009; CONTRI et al., 2012). Neste trabalho, propõe-se a utilização do óleo de café verde como núcleo oleoso dos sistemas coloidais, uma vez que este é capaz de evitar a desidratação e restaurar a barreira cutânea, por auxiliar na regeneração dos lipídeos da camada córnea (PEREDA et al., 2006). O óleo de café verde é obtido dos grãos de café da espécie *Coffea arabica* (Rubiaceae) através da prensagem a frio (CRODA, 2007) e apresenta efeito fotoprotetor (PELLE; ANDERSON, 1999), ação antioxidante (SAVIAN et al., 2011), além de ser renovador, estimulante cutâneo e apresentar efeito emoliente superior a de outros óleos (ATHAR; NASIR, 2005).

Considerando o fato de que, até o momento, não existem relatos na literatura científica da inclusão do tioconazol em nanocarreadores, e tendo em vista as características deste fármaco, aliado às vantagens apresentadas pelos sistemas coloidais, este trabalho tem por objetivos o desenvolvimento e a caracterização de suspensões de nanoemulsões e nanocápsulas poliméricas contendo tioconazol, bem como a avaliação da influência desses sistemas na proteção do fármaco frente à luz UVC e na atividade antifúngica.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material

O tioconazol (99,22 %; m/m) foi adquirido da Pharma Nostra (São Paulo, Brasil); o polímero – poli(ε-caprolactona) (PCL, Mn = 70,000 – 90,000) e o Span[®] 80 (monoestearato de sorbitano) foram obtidos da Sigma Aldrich (São Paulo, Brasil); Tween[®] 80 (polissorbato 80) e acetona foram adquiridos da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil). Os óleos triglicerídeos de cadeia média (TCM) e óleo de café verde (OC) foram obtidos da Delaware (Porto Alegre,

Brasil) e DEG (São Paulo, Brasil), respectivamente. Metanol grau cromatográfico foi adquirido da Tedia (São Paulo, Brasil). Os demais solventes, meios de cultura e reagentes empregados apresentaram grau farmacêutico.

2.2 Teste de inchamento/dissolução do polímero

Para a realização deste ensaio, o polímero (PCL) foi comprimido em prensa hidráulica durante 5 minutos, a 5 toneladas (Prensa Hidráulica P30000, Bovenau, Brasil) para a obtenção de filmes poliméricos. Esses filmes foram exatamente pesados, submersos em volume suficiente de óleo de café verde (2 mL) e em intervalos de tempos pré-estabelecidos (0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27 e 30 dias), foram retirados com o auxílio de uma pinça, secos em papel absorvente e pesados em balança analítica (WEISS-ANGELI et al., 2008). O ensaio foi realizado em triplicata.

2.3 Preparação das suspensões de nanocápsulas poliméricas e nanoemulsões

As nanoemulsões (NE) e nanocápsulas poliméricas (NC) foram obtidas pelos métodos de emulsificação espontânea (BOUCHEMAL et al., 2004) e deposição interfacial de polímero pré formado (FESSI et al., 1989), respectivamente. Para a preparação das NC (n = 3), inicialmente, a fase orgânica contendo o fármaco (0,025 g), o polímero biodegradável – PCL (0,25 g), o óleo (TCM ou OC – 0,40 g), o tensoativo de baixo EHL (Span[®] 80 – 0,1925 g) e um solvente miscível em água (acetona – 67 mL) foi adicionada a uma solução aquosa contendo o tensoativo de alto EHL (Tween[®] 80 – 0,1925 g) sob agitação magnética. A agitação foi mantida durante 10 minutos e, após, a formulação foi submetida à evaporação em evaporador rotatório (Fisatom, São Paulo, Brasil) (60 rpm e 40 °C) para a eliminação do solvente orgânico e ajuste do volume (25 mL) e da concentração final do fármaco (1,0 mg/mL). Para a preparação das NE (n = 3) foi omitida a presença do polímero. As formulações foram designadas: nanocápsulas de tioconazol com OC ou TCM (NC-TIO-OC e NC-TIO-TCM, respectivamente) e nanoemulsões de tioconazol com OC ou TCM (NE-TIO-OC e NE-TIO-TCM, respectivamente). Para fins comparativos, formulações controle (sem o fármaco) foram, também, preparadas e avaliadas (NE-TCM; NC-TCM; NE-OC e NC-OC). Após a preparação, as formulações foram acondicionadas em frascos de vidro âmbar, armazenadas a temperatura ambiente e protegidas da luz.

2.4 Caracterização físico-química dos sistemas desenvolvidos

2.4.1 Determinação do pH

A determinação do pH foi realizada diretamente nas formulações empregando potenciômetro previamente calibrado (Seven Easy, Mettler Toledo, Brasil) com soluções tampão pH 4,0 e 7,0.

2.4.2 Análise do tamanho das partículas, índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta

O tamanho das partículas e o índice de polidispersão foram determinados por espectroscopia de correlação de fótons (Zetasizer Nanoseries[®], Malvern Instruments, UK) após a diluição das amostras em água ultrapura (1:500, v/v), a 25 ± 2 °C. A determinação do potencial zeta foi realizada no mesmo equipamento, através da mobilidade eletroforética, após as amostras serem diluídas (1:500) em solução de NaCl 10 mM.

2.4.3 Determinação do teor de fármaco e da eficiência de encapsulamento

O teor de fármaco foi determinado após a diluição de uma alíquota das formulações (400 µL) em metanol. Esta solução foi submetida à sonicação (40 minutos) para total extração do fármaco, sendo posteriormente completado o volume com o solvente orgânico (20 mL), filtrada em filtro quantitativo e em membrana de celulose regenerada (0,45µm) e analisadas por cromatografia líquida com detecção UV.

A quantificação do tioconazol nas formulações foi realizada por CLAE-UV, de acordo com metodologia previamente validada (Capítulo 1). As análises foram realizadas em um cromatógrafo a líquido Shimadzu (Kyoto, Japão), equipado com bomba LC-10 AD VP, detector UV SPD-10AVP e injetor manual Rheodyne com volume de injeção de 20 µL. Um segundo cromatógrafo foi utilizado para a análise da pureza dos picos, sendo ele um Shimadzu LC-20A (Kyoto, Japão), equipado com bomba LC-20AT, detector SPD-M20A PDA e sistema controlador CBM-20A. Para a separação cromatográfica foi utilizada uma coluna Gemini Phenomenex[®] C₁₈ (150 x 4,6 mm; 5 µm) e pré-coluna C₁₈ Phenomenex Security Guard. A fase móvel foi composta por metanol/água (80:20 v/v) e 0,18% de hidróxido de amônia. O fluxo empregado foi de 1,0 mL/min e a detecção do fármaco foi em 219 nm.

O tioconazol livre (não-associado) foi avaliado no ultrafiltrado, pela técnica de ultrafiltração-centrifugação (Amicon[®] 10.000 MW, Millipore) em microcentrifuga (Sigma Aldrich), a 2.200 xG, durante 10 minutos. A eficiência de encapsulamento foi calculada pela diferença entre a concentração total de fármaco e a concentração encontrada no ultrafiltrado (concentração livre), de acordo com a equação 1.

$$(1) \quad EE \% = \frac{C_{\text{total}} - C_{\text{ultrafiltrado}}}{C_{\text{total}}} \times 100$$

2.5 Estabilidade das formulações

A estabilidade das formulações foi verificada após 30 dias de armazenamento à temperatura ambiente. Os parâmetros avaliados foram: pH, tamanho médio das partículas, PDI, potencial zeta e teor de fármaco.

2.6 Estudo da proteção do fármaco frente à fotodegradação

A proteção do fármaco frente à fotodegradação foi avaliada pela exposição das formulações (NC-TCM-TIO, NE-TCM-TIO, NC-OC-TIO e NE-OC-TIO) à luz ultravioleta artificial UVC (Phillips TUV – UVC *long life*, 30W). As amostras foram acondicionadas, individualmente, em cubetas transparentes (1,0 mL), em câmara espelhada (1 m x 25 cm x 25 cm). Cubetas individuais foram utilizadas para cada intervalo de tempo. Para comparação, uma solução do fármaco em metanol (S-TIO) foi, também, empregada. A fim de eliminar a hipótese de degradação térmica, uma amostra de cada formulação foi acondicionada em cubetas cobertas com papel alumínio (protegidas da luz). As amostras foram coletadas em tempos pré-estabelecidos (0,25; 0,5; 1,0; 1,5; 2; 3; 4; 5; 7; 10; 15; 20 e 22 horas), submetidas ao processo de extração (item 2.5.4) e o teor de tioconazol foi determinado por CLAE-UV.

Para determinação da ordem de reação, os resultados obtidos foram plotados em gráficos de concentração do fármaco *versus* tempo (ordem zero), logarítimo da concentração do fármaco *versus* tempo (primeira ordem) e 1/concentração do fármaco *versus* tempo (segunda ordem). A constante de degradação (k) e o tempo de ½ vida de cada formulação foram calculados segundo a respectiva ordem de reação (SINKO, 2006).

2.7 Avaliação da atividade antifúngica *in vitro* dos sistemas nanoestruturados

A avaliação da atividade antifúngica das formulações contendo tioconazol foi realizada pelo método de difusão em ágar com pocinhos. As leveduras utilizadas foram: *Candida albicans* ATCC 10231, isolado clínico de *C. albicans* e *C. glabrata* ATCC 2201, as quais foram mantidas em ágar Sabouraud-dextrose 4% (SAD), por 48 horas, a temperatura de 25 ± 2 °C (tubo inclinado). O inóculo utilizado para cada levedura foi a 1% (v/v), após preparação da suspensão do micro-organismo em solução salina estéril, a uma concentração de $25 \pm 2\%$ de transmitância, lida em espectrofotômetro (Pró-Análise, modelo UV-1800 PC, Porto Alegre, Brasil), a 580 nm (contendo, aproximadamente, $7,0 \times 10^4$ UFC/mL).

Para execução do ensaio, inicialmente, 20 mL de SAD foram distribuídos em placas de Petri esterilizadas, formando assim a camada base. Após total solidificação do meio, 5 mL do inóculo foram uniformemente distribuídos sob a camada base. Com o auxílio de um cilindro de metal, poços de 9,5 mm de diâmetro foram confeccionados e posteriormente preenchidos com 100 µL das amostras diluídas em água, a uma concentração de 2,0 µg/mL. Para fins comparativos, as formulações brancas (sem a presença do fármaco) e uma solução metanólica de tioconazol (fármaco livre), diluída em água (2,0 µg/mL) foram, também, utilizadas. As placas foram incubadas a 35 ± 5 °C, por 24 horas, e ao final do período de incubação os halos obtidos foram medidos utilizando paquímetro digital (Paquímetro Eletrônico Digital Starrett, 727) (F. Bras. V, 2010). Para cada amostra foram realizadas seis determinações.

2.8 Análise estatística

Todas as formulações foram preparadas e analisadas em triplicata. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. A análise estatística dos resultados foi realizada por análise de variância (ANOVA), seguida do teste de Tukey, a um nível de significância de 5 %, empregando-se o software SigmaStat Windows versão 3.0.1.0 (Jandel Scientific, USA).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Teste de inchamento/dissolução do polímero

Como citado anteriormente, nanocápsulas poliméricas são vesículas formadas por uma cavidade oleosa envolta por um filme polimérico. Para a formação e a estabilidade destas estruturas é fundamental que o óleo não dissolva o polímero, a fim de manter a integridade do sistema, pois a incompatibilidade desses componentes pode levar a formação de micelas e não de nanocápsulas (SCHAFFAZICK et al., 2002). Guterres e colaboradores (2000) observaram esta incompatibilidade entre o PCL e o benzoato de benzila, onde o óleo agiu como solvente do polímero.

Este ensaio foi realizado com o intuito de analisar a compatibilidade do óleo de café verde com o PCL, uma vez que até o presente momento não se encontram na literatura nanocápsulas poliméricas que associem estes dois componentes. A massa inicial dos filmes poliméricos (1, 2 e 3) foi de 0,026; 0,027 e 0,025 g, respectivamente, e manteve-se até o final do experimento ($p < 0,05$) (Figura 1). Estes resultados demonstram que não houve interação entre o OC e a PCL, uma vez que não houve perda ou acréscimo de massa, sendo possível empregar o óleo como núcleo oleoso na obtenção das nanocápsulas poliméricas contendo tioconazol.

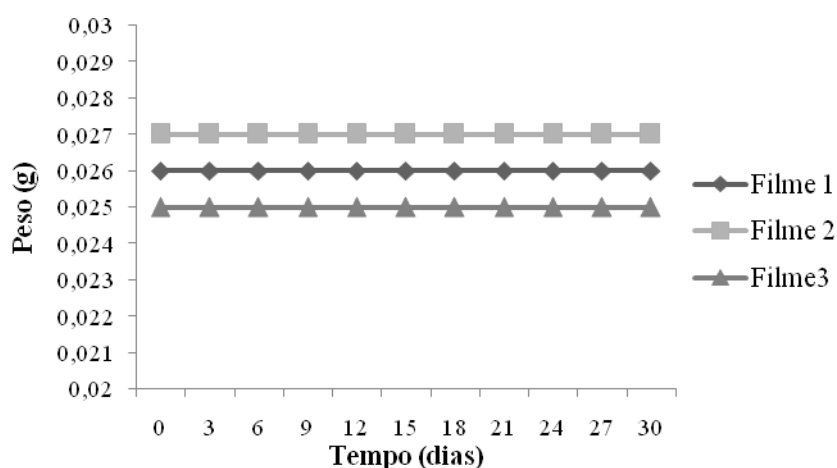


Figura 1: Peso dos filmes poliméricos em intervalos de tempo.

3.2 Caracterização físico-química das nanoemulsões e nanocápsulas poliméricas

Após preparação, as formulações apresentaram, macroscopicamente, aspecto leitoso, homogêneo, opalescente e com reflexo azulado (efeito *Tyndall*), este decorrente do movimento Browniano das estruturas coloidais (SCHAFFAZICK et al., 2003). Os resultados obtidos na caracterização das nanoestruturas se encontram na Tabela 1. Nas Figuras 2 e 3 estão apresentados os resultados da análise de distribuição do tamanho das partículas.

Tabela 1: Características físico-químicas das nanocápsulas poliméricas e nanoemulsões de tioconazol contendo os óleos – TCM (NC-TCM-TIO e NE-TCM-TIO) e OC (NC-OC-TIO e NE-OC-TIO) e suas respectivas formulações sem o fármaco (NC-TCM; NE-TCM; NC-OC e NE-OC) (n = 3, média ± desvio padrão)

Formulação	Concentração fármaco (mg/mL)	Tamanho de Partícula (nm)	PDI*	Potencial zeta (mV)	pH
NC-TCM-TIO	0,99 ± 0,01	197 ± 03	0,12 ± 0,01	-3,5 ± 0,6	6,02 ± 0,02
NC-TCM	---	181 ± 02	0,08 ± 0,01	-7,2 ± 0,1	5,94 ± 0,06
NE-TCM-TIO	1,00 ± 0,01	181 ± 03	0,10 ± 0,03	-4,2 ± 1,0	6,27 ± 0,07
NE-TCM	---	175 ± 09	0,09 ± 0,02	-7,6 ± 0,7	5,92 ± 0,05
NC-OC-TIO	1,01 ± 0,01	193 ± 03	0,08 ± 0,03	-4,6 ± 0,9	6,09 ± 0,04
NC-OC	---	177 ± 01	0,07 ± 0,01	-11,3 ± 1,1	5,56 ± 0,06
NE-OC-TIO	1,02 ± 0,00	173 ± 05	0,05 ± 0,01	-5,9 ± 2,0	6,25 ± 0,04
NE-OC	---	158 ± 04	0,09 ± 0,01	-9,9 ± 0,8	5,96 ± 0,10

*PDI: índice de polidispersão.

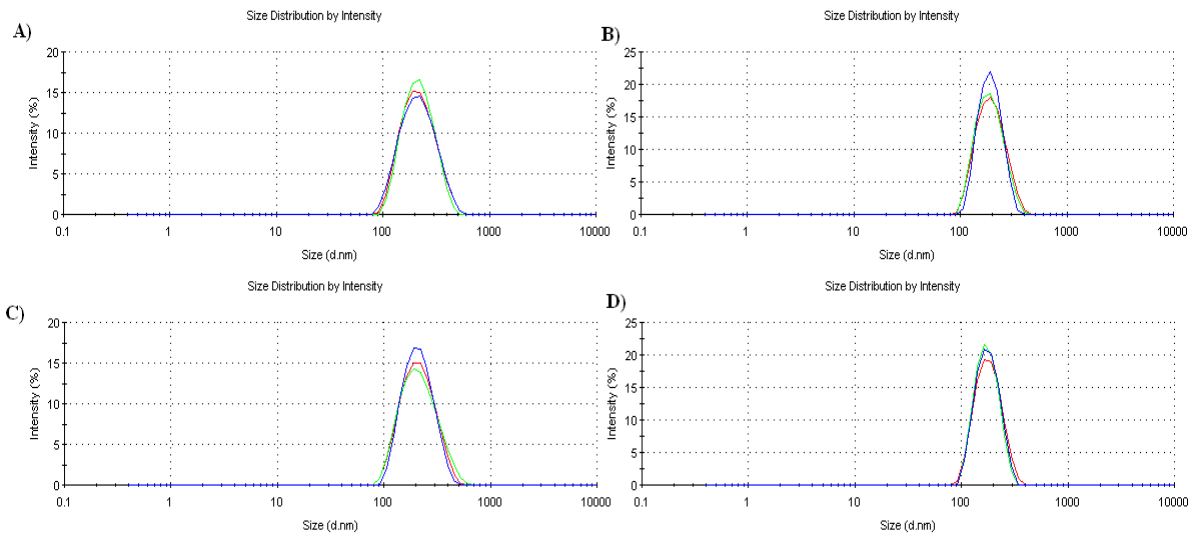


Figura 2: Distribuição do tamanho de partículas das nanoemulsões e nanocápsulas poliméricas contendo tioconazol (1,0 mg/mL), analisadas por espectroscopia de correlação de fótons. (A) NC-TCM-TIO, (B) NE-TCM-TIO, (C) NC-OC-TIO e (D) NE-OC-TIO.

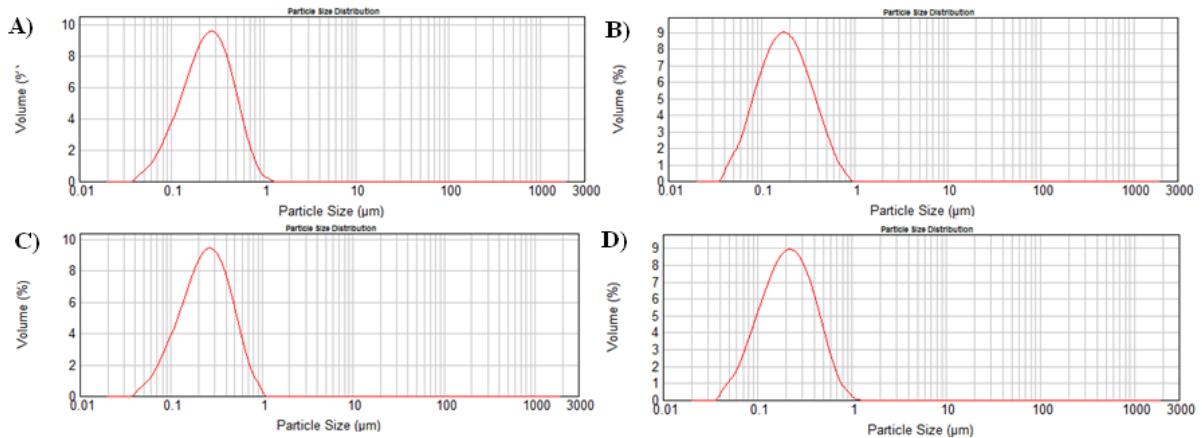


Figura 3: Distribuição do tamanho de partículas das nanoemulsões e nanocápsulas poliméricas contendo tioconazol (1,0 mg/mL), analisadas por difração a laser. (A) NC-TCM-TIO, (B) NE-TCM-TIO, (C) NC-OC-TIO e (D) NE-OC-TIO.

As formulações apresentaram tamanho nanométrico (150 – 200 nm) e índice de polidispersão abaixo de 0,15, indicando a adequada homogeneidade do sistema. Os valores encontrados estão de acordo com dados relatados na literatura para estes sistemas, de acordo com os métodos empregados (BERNARDI et al., 2008; OURIQUE et al., 2008; FLORES et al., 2011). A análise do tamanho de partículas por difração a laser demonstrou uma distribuição nanométrica, sem a presença simultânea de micropartículas (Figura 3).

Comparando os sistemas desenvolvidos, é possível observar que as nanoemulsões e nanocápsulas apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) quanto ao tamanho (NC > NE), demonstrando que a presença do polímero é fator relevante no aumento do tamanho das partículas. Este resultado corrobora com o obtido por Flores e colaboradores (2011), que ao analisarem nanoemulsões e suspensões de nanocápsulas contendo o óleo essencial de melaleuca observaram que as nanoemulsões apresentaram tamanho de partícula menor que as nanocápsulas (167 ± 04 e 212 ± 08 nm, respectivamente). A adição do tioconazol às nanoestruturas também promoveu um aumento no diâmetro médio. Shaffazick e colaboradores (2002) relataram que a incorporação do diclofenaco nos sistemas nanoestruturados gerou um acréscimo de cerca de 20% no tamanho das partículas.

No que se refere ao pH, as amostras apresentaram pH ácido (5,5 a 6,3) devido às características dos componentes das formulações. Diferenças significativas foram observadas entre as formulações (NE > NC). As nanocápsulas apresentaram pH mais baixo devido a presença do PCL, que por possuir grupos de ácido carboxílicos terminais em sua estrutura leva a valores de pH mais baixos (SCHAFFAZICK et al., 2002). A adição do fármaco promoveu um pequeno aumento no pH das nanoestruturas, provavelmente devido as características básicas do tioconazol.

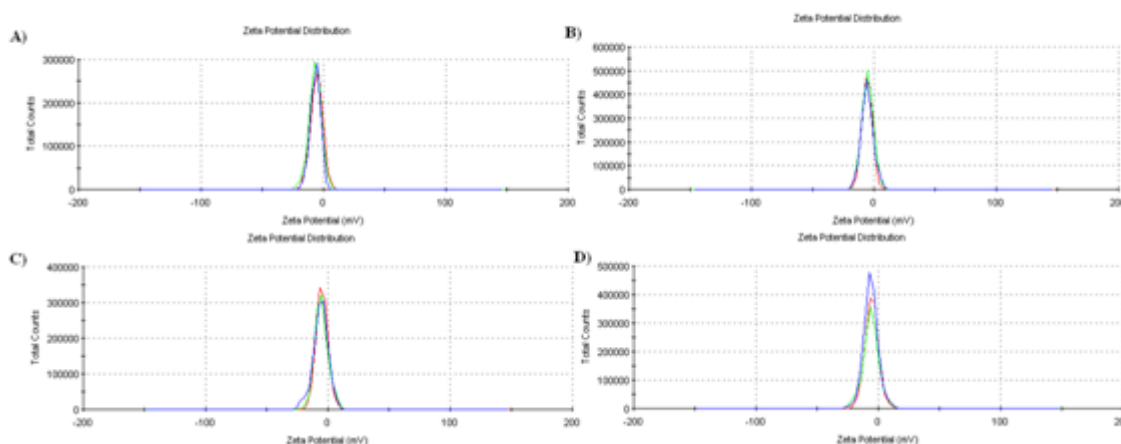


Figura 4: Distribuição do potencial zeta das nanoemulsões e nanocápsulas poliméricas contendo tioconazol (1,0 mg/mL), analisadas através da mobilidade eletroforética. (A) NC-TCM-TIO, (B) NE-TCM-TIO, (C) NC-OC-TIO e (D) NE-OC-TIO.

Em relação ao potencial zeta, as formulações apresentaram valores negativos (-3,5 a -11,3 mV), devido ao efeito estérico causado pelo polissorbato 80 (Tween[®] 80) e a presença dos grupamentos carboxílicos terminais da estrutura do PCL (CATTANI et al., 2010). A incorporação do tioconazol nos sistemas nanoestruturados reduziu o potencial zeta, o que poderia indicar uma adsorção do fármaco na superfície das partículas. Esta redução poderia indicar uma menor estabilidade das formulações após a adição do fármaco, pois quanto maior o valor de potencial zeta maior seria a estabilidade das formulações, uma vez que grandes forças repulsivas tendem a evitar a agregação entre as partículas (LEGRAND et al., 1999). O núcleo oleoso não afetou esse parâmetro, uma vez que não foram observadas diferenças significativas entre as formulações contendo óleo de café verde e as contendo TCM. A Figura 4 apresenta a distribuição do potencial zeta das formulações.

Quanto ao teor de fármaco, as formulações apresentaram valores próximos ao teórico (1,0 mg/mL) e eficiência de encapsulamento de, aproximadamente, 100%.

Comparando-se as formulações em relação à presença dos óleos empregados, diferenças significativas não foram observadas nas características físico-químicas das nanocápsulas poliméricas e nanoemulsões ($p > 0,05$).

3.3 Estabilidade frente ao armazenamento

Após 30 dias de armazenamento à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, as formulações mantiveram suas características macroscópicas iniciais, sem precipitação e alterações de cor ou aspecto.

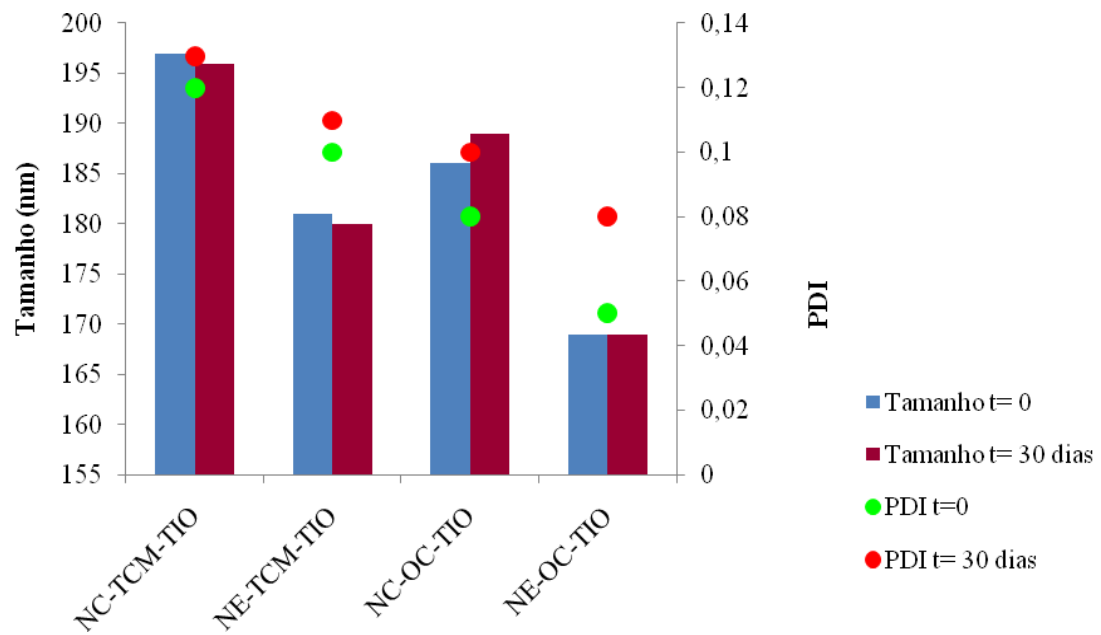


Figura 5: Tamanho médio das partículas e PDI das nanocápsulas poliméricas e nanoemulsões contendo tioconazol (NC-TCM-TIO; NE-TCM-TIO; NC-OC-TIO e NE-OC-TIO) determinados no estudo de estabilidade a temperatura ambiente.

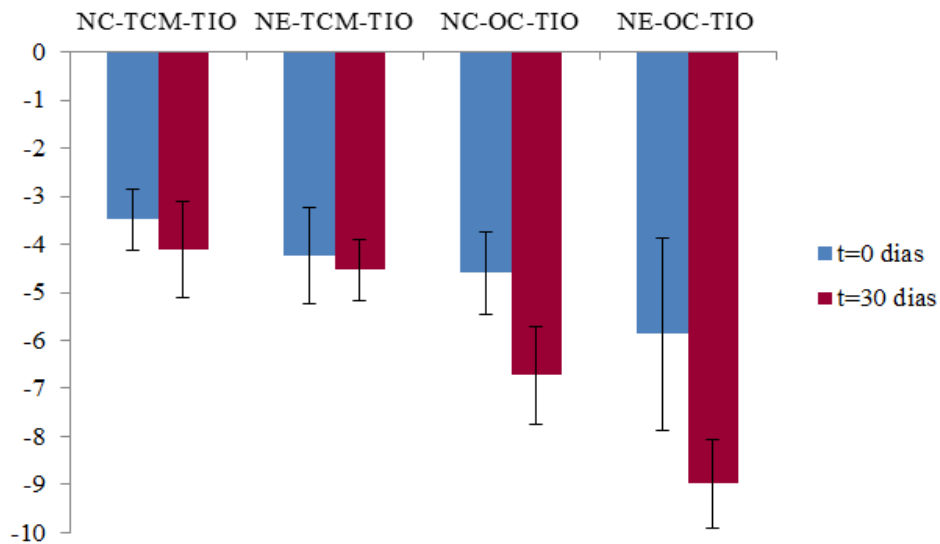


Figura 6: Potencial zeta das nanocápsulas poliméricas e nanoemulsões contendo tioconazol (NC-TCM-TIO; NE-TCM-TIO; NC-OC-TIO e NE-OC-TIO) determinados no estudo de estabilidade a temperatura ambiente.

As Figuras 5 e 6 demonstram um comparativo entre os resultados obtidos para tamanho médio das partículas, PDI e potencial zeta, após a preparação ($t = 0$) e 30 dias de armazenamento. A partir dos resultados se verificou que as formulações mantiveram suas

características iniciais e diferenças significativas não foram verificadas ($p > 0,05$), demonstrando a estabilidade das mesmas durante o período de armazenamento, a temperatura ambiente.

Tabela 2: Valores de pH e teor de tioconazol determinados no estudo de estabilidade das suspensões de nanocápsulas poliméricas (NC-TCM-TIO e NC-OC-TIO) e nanoemulsões (NE-TCM-TIO e NE-OC-TIO) após preparação e 30 dias a temperatura ambiente ($n = 3$, média \pm desvio padrão)

Formulação	pH		Concentração (mg/mL)	
	t = 0	t = 30 dias	t = 0	t = 30 dias
NC-TCM-TIO	6,05 \pm 0,04	5,49 \pm 0,05	0,99 \pm 0,01	0,99 \pm 0,00
NE-TCM-TIO	6,27 \pm 0,07	5,74 \pm 0,19	1,00 \pm 0,01	1,00 \pm 0,02
NC-OC-TIO	6,09 \pm 0,04	5,33 \pm 0,27	1,00 \pm 0,01	0,99 \pm 0,00
NE-OC-TIO	6,25 \pm 0,03	5,59 \pm 0,08	1,02 \pm 0,01	1,00 \pm 0,02

No que se refere ao pH, uma redução significativa em relação aos valores iniciais foi observada para todas as formulações ($p < 0,05$) (Tabela 2); no entanto, esses resultados estão de acordo com outros trabalhos encontrados na literatura (FONTANA et al., 2009; FLORES et al., 2011). Esta diminuição poderia ser explicada por uma possível hidrólise das cadeias dos triglicerídeos e o respectivo aumento dos ácidos graxos livres presentes nos óleos. Além disso, no caso das nanocápsulas, a interação do polímero com a água, e conseqüente hidrólise ou ionização dos grupos carboxílicos que ficam expostos após o relaxamento das cadeias poliméricas, pode, também, ter contribuído para a diminuição do pH (JAGER et al., 2007).

Cabe ainda ressaltar, que todas as formulações mantiveram o teor de fármaco próximo ao valor teórico (1,0 mg/mL) e que a presença do fármaco não alterou a estabilidade dos sistemas, uma vez que as formulações brancas apresentaram o mesmo comportamento.

3.4 Estudo da proteção do fármaco frente à fotodegradação

Este estudo teve por objetivo avaliar a capacidade dos sistemas nanoestruturados e de seus componentes na fotoproteção do tioconazol. As formulações foram expostas a luz UVC, que por ser uma fonte mais energética, possibilitou reduzir o tempo do experimento. Cabe

salientar que, até o momento, não há relatos na literatura científica a cerca do comportamento do tioconazol nesta condição.

Os resultados obtidos no estudo de fotodegradação estão expressos na Figura 7. Para determinação da ordem e da cinética de fotodegradação, as amostras foram degradadas até, aproximadamente, 50%. Todas as formulações apresentaram cinética de primeira ordem e a constante de degradação (k) e o tempo de meia vida (tempo necessário para que ocorra 50% de degradação – $t_{1/2}$) foram calculados (Tabela 3).

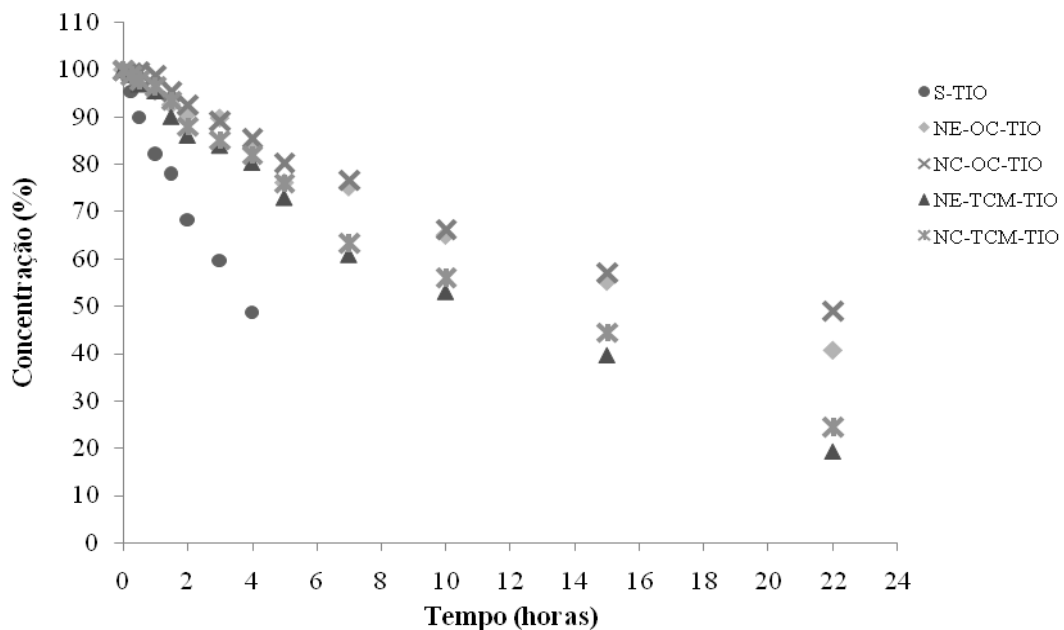


Figura 7: Teor residual de tioconazol em função do tempo após exposição da solução metanólica do fármaco (S-TIO), nanocápsulas poliméricas (NC-TCM-TIO e NC-OC-TIO) e nanoemulsões (NE-TCM-TIO e NC-OC-TIO) à luz UVC.

Tabela 3: Parâmetros de constante de velocidade de degradação (k), tempo de meia vida ($t_{1/2}$) e correlação (r^2) para solução metanólica de tioconazol (S-TIO), suspensão de nanocápsulas e nanoemulsões de tioconazol com TCM e OC (NC-TCM-TIO e NE-TCM-TIO, respectivamente), suspensão de nanocápsulas e nanoemulsão de tioconazol com TCM e OC (NC-OC-TIO e NE-OC-TIO, respectivamente) após o estudo de fotodegradação frente à luz UVC

Formulação	k (h^{-1})	$t_{1/2}$ (h)	r^2
S-TIO	$0,19 \pm 0,02$	3,72	0,9952
NC-TCM-TIO	$0,05 \pm 0,01$	13,41	0,9903
NE-TCM-TIO	$0,06 \pm 0,01$	11,38	0,9934
NC-OC-TIO	$0,03 \pm 0,01$	22,39	0,9845
NE-OC-TIO	$0,04 \pm 0,01$	16,01	0,9932

*: Valores calculados considerando cinética de primeira ordem.

A partir dos resultados, torna-se clara a importância dos sistemas nanoestruturados em proteger o tioconazol da luz. Experimentalmente, para degradar aproximadamente 50% do fármaco, as nanocápsulas e nanoemulsões com TCM e nanocápsulas e nanoemulsões com OC levaram 15 e 22 horas respectivamente, enquanto que a solução metanólica (fármaco livre) levou apenas 4 horas (Figura 5). Os dados de cinética de degradação do fármaco (Tabela 3) confirmam esses resultados, uma vez que, as constantes de velocidade de degradação (k) dos sistemas nanoestruturados foram de 0,03 a 0,06 h^{-1} , valores estes inferiores ao obtido para o fármaco livre (0,19 h^{-1}). Esta característica das nanoestruturas em proteger as substâncias da luz é bastante conhecida e estudada. Weiss-Angeli e colaboradores (2008) verificaram um aumento na fotoestabilidade do octilmetoxicinamato após sua incorporação em nanocápsulas poliméricas. No mesmo contexto, Fontana e colaboradores (2009) evidenciaram que as nanopartículas (nanocápsulas, nanoesferas e nanoemulsão) reduziram a fotodegradação do propionato de clobetasol quando comparada com a solução capilar comercial e com a solução etanólica contendo o fármaco livre. Almeida e colaboradores (2009) verificaram uma maior proteção frente à luz UVC da benzofenona-3 associada à nanoemulsões e nanocápsulas. Um ano mais tarde, o mesmo grupo de pesquisa relatou que a associação da rutina à nanocápsulas poliméricas e nanoemulsões apresentou um aumento de 5,3 e 6,9 vezes na fotoestabilidade da mesma, respectivamente (ALMEIDA et al., 2010).

Comparando os sistemas desenvolvidos neste trabalho em relação ao tempo de meia vida (tempo necessário para que ocorra 50% de degradação do fármaco), as nanocápsulas

apresentaram valores superiores às nanoemulsões ($p < 0,05$) (Tabela 3). Esta maior estabilidade observada para as suspensões poliméricas pode ser atribuída ao invólucro polimérico formado pela PCL a qual possui a capacidade de refletir e espalhar a radiação UV, promovendo uma maior proteção do fármaco frente à luz (JIMÉNEZ et al., 2004). Além disso, este ensaio também evidenciou a importância do OC na proteção do fármaco frente à luz UVC, uma vez que o $t_{1/2}$ para NE-TIO-OC e NC-TIO-OC foi de 16 e 22 horas, respectivamente, enquanto que para as NE-TIO-TCM e NC-TIO-TCM os valores encontrados foram 11 e 14 horas, respectivamente. Este potencial está provavelmente relacionado com a ação antioxidante (SAVIAN et al., 2011) e o efeito fotoprotetor (PELLE; ANDERSON, 1999; ALVAREZ, RODRIGUES, 2000) do óleo de café verde.

Cabe ressaltar que durante o estudo todas as amostras protegidas da luz (controle escuro) apresentaram teor de tioconazol próximo a 100%, demonstrando não haver influência da temperatura na degradação do fármaco. Outro fator importante se refere ao método cromatográfico, o qual permitiu a total separação do pico cromatográfico do fármaco (pureza = 1) e de seus possíveis produtos de degradação (Figura 8).

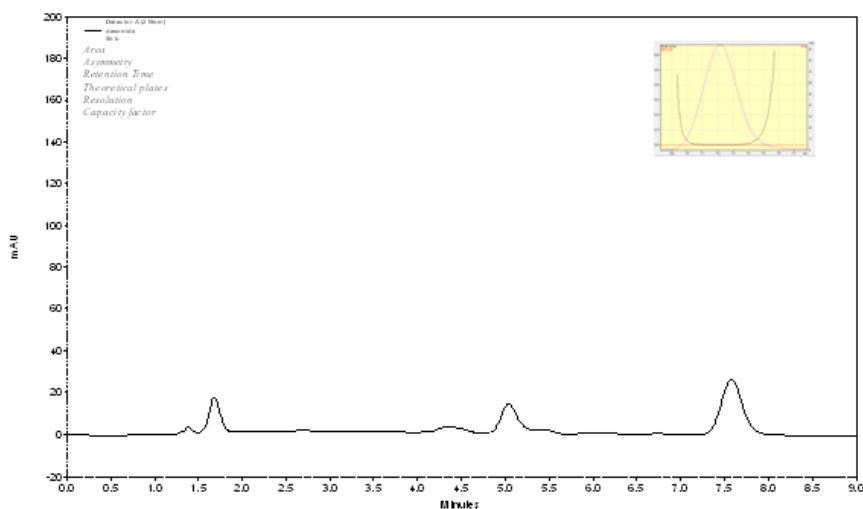


Figura 8: Cromatograma obtido por CLAE para a solução metanólica de tioconazol (S-TIO) após 5 horas de exposição à luz UVC.

3.5 Avaliação da atividade antifúngica *in vitro* dos sistemas nanoestruturados

O objetivo deste ensaio foi verificar se a atividade antifúngica do tioconazol foi alterada após sua incorporação nos sistemas nanoestruturados. O ensaio foi realizado frente a

três cepas de *Candida*, sendo uma delas um isolado clínico. Cabe salientar que as espécies testadas são comumente relacionadas à vulvovaginites (MASLYANSKAYA et al., 2013). Os resultados alcançados foram satisfatórios, uma vez que as nanocápsulas e nanoemulsões apresentaram ação frente todas as leveduras testadas (*C. albicans*; isolado clínico de *C. albicans* e *C. glabrata*). Porém, uma maior atividade foi verificada para as espécies de *C. albicans* (Tabela 4). Para as amostras sem o fármaco (NC-TCM, NE-TCM, NC-OC, NE-OC e solventes), não foi verificada atividade antifúngica.

Tabela 4: Diâmetro dos halos de inibição (mm) do tioconazol livre (TIO), suspensão de nanocápsulas e nanoemulsão de tioconazol com TCM e OC (NC-TCM-TIO e NE-TCM-TIO, respectivamente), suspensão de nanocápsulas e nanoemulsão de tioconazol com TCM e OC (NC-OC-TIO e NE-OC-TIO) (n = 3, média ± desvio padrão)

Amostras	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	<i>C. albicans</i> IC*	<i>C. glabrata</i> ATCC 2201
NC-TIO-TCM	24,15 ± 0,10	27,09 ± 0,38	18,04 ± 0,29
NE-TIO-TCM	24,71 ± 0,15	27,13 ± 0,31	18,67 ± 0,33
NC-TIO-OC	24,19 ± 0,19	27,07 ± 0,17	18,17 ± 0,32
NE-TIO-OC	24,82 ± 0,50	27,28 ± 0,10	18,65 ± 0,33
TIO	25,79 ± 0,32	28,00 ± 0,24	19,35 ± 0,21

*: isolado clínico.

A ação antifúngica do tioconazol frente a *C. albicans* foi avaliada por Attama e colaboradores (2011), após a sua associação em microemulsões. O ensaio realizado pelo método de difusão em ágar demonstrou que a ação do tioconazol incorporado à microemulsão foi superior a ação da solução de tioconazol em DMSO, sendo que os halos de inibição foram de 22 ± 0,1 mm e 16 ± 0,3 mm, respectivamente. Os autores atribuíram este resultado ao fato dos constituintes da formulação (óleo de soja – 26%, Cremophor® S9 – 40% e Brij® 35 – 34%) aumentar a permeabilidade do fármaco na parede da célula fúngica.

Uma pequena diminuição dos halos de inibição foi verificada para as nanoemulsões e nanocápsulas em relação à solução do fármaco livre (não associado aos nanocarreadores). A maior inibição verificada para o fármaco livre pode estar relacionada à sua maior disponibilidade em difundir para o meio de cultura, uma vez que se encontra em solução, enquanto que associado aos nanocarreadores necessita transpor a barreira estabelecida pelo

sistema ao qual está confinado, fazendo com que seja liberado de maneira controlada e, conseqüentemente, em concentrações menores. Porém, atribuindo-se 100% à atividade observada para a solução de tioconazol, os nanocarreadores apresentaram entre 93,64 e 97,49 % de atividade para todas as espécies testadas, podendo considerar este resultado satisfatório no que se refere à manutenção da atividade antifúngica do tioconazol. Estas observações associadas à liberação mais lenta do fármaco demonstram, por hipótese, que as nanoestruturas promovem uma maior ação antifúngica, tendo em vista o tamanho reduzido, permitindo que um maior número de partículas fixe na superfície do micro-organismo (PADMAVATHY; VIJAYARAGHAVAN, 2008).

Vitalis (2012) avaliou a atividade antifúngica de nanocápsulas de clorexidina frente à *C. albicans* e *Enterococcus faecalis*, pelo método de difusão em ágar, e os halos de inibição foram medidos em 24, 48 e 72 horas. Nas primeiras 24 horas as nanocápsulas apresentaram halos de inibição significativamente menores que o fármaco livre; entretanto, após este período, se verificou um aumento gradual dos halos formados. Patel (2010) relatou que nanocápsulas poliméricas contendo itraconazol apresentaram maior atividade antifúngica frente ao *Aspergillus flavus* que o fármaco disperso em água ou emulsionado. A avaliação da atividade antifúngica de nanocápsulas poliméricas contendo clotrimazol foi realizada por Santos e colaboradores (2013). Neste estudo, os autores relataram um pequeno aumento da atividade antifúngica para a solução de clotrimazol; entretanto, a associação do fármaco com TCM apresentou atividade semelhante à das nanocápsulas de Eudragit® RS100.

Comparando-se os sistemas nanoestruturados, as nanoemulsões apresentaram halos de inibição um pouco mais acentuados que as nanocápsulas, independente do tipo de cepa avaliada. Esta diferença nos halos formados pode estar relacionada à presença da parede polimérica nas nanocápsulas, uma vez que esta proporciona uma liberação gradual da substância e, conseqüentemente, mantém as concentrações por um tempo mais prolongado (FLORES et al., 2013). Além disso, a presença dos diferentes óleos não influenciou na atividade antifúngica dos sistemas. Para obter resultados mais conclusivos em relação ao perfil de inibição das nanoestruturas, sugere-se a realização de ensaios por um período mais prolongado.

4 CONCLUSÃO

Este trabalho demonstrou a viabilidade tecnológica na obtenção de nanoemulsões e nanocápsulas poliméricas de PCL contendo tioconazol, utilizando como núcleo oleoso os óleos triglicéridos de cadeia média e o óleo de café verde. Os sistemas nanoestruturados apresentaram características físico-químicas satisfatórias (tamanho nanométrico, baixo índice de polidispersão e potencial zeta negativo) e foram estáveis por um período de 30 dias quando armazenadas a temperatura ambiente. Além disso, uma maior proteção do fármaco frente à radiação UVC foi verificada para as nanocápsulas contendo o óleo de café verde. A atividade antifúngica do tioconazol associado às nanoestruturas foi avaliada e ambas as formulações apresentaram ação frente às leveduras de *C. albicans* e *C. glabrata*.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, J.S.; JEZUR, L.; FONTANA, M.C.; PEASE, K.; SILVA, C.B.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S.; BECK, R.C.R. Oil-based nanoparticles containing alternative vegetable oils (grape seed oil and almond kernel oil): preparation and characterization. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 28, p. 165-172, 2009.

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

ALVAREZ, A.M.R. & RODRÍGUEZ, M.L.G. Lipids in pharmaceutical and cosmetic preparations. **Grasas y aceites**. v. 51, n.1-2, p.74-96, 2000.

ANTON, N.; BENOIT, J.P.; SAULNIER, P. Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates - A review. **Journal of Controlled Release**, v. 128, p. 185-199, 2008.

ATTAMA, A. A.; AYOGU, I. J.; KENECHUKWU, F. C.; OGBONNA, J. D. N.; OKORE, V. C. A New Lipid Based Drug Delivery System (LBDDS) for Oral Delivery of Tioconazole. **International Journal of Drug Delivery**, v. 3, p. 743-753, 2011.

ATHAR, M. & NASIR, S.M. Taxonomic perspective of plant species yielding vegetable oils used in cosmetics and skin care products. **Afr. J. Biotechnol.** v.4, n.1, p. 36-44, 2005.

BATISTUZZO, J.A.O., ITAYA, M., ETO, Y. Formulário Médico Farmacêutico. 3ed, São Paulo: Pharmabooks, 2006.

BECK, R. C. R.; HASS, S. E.; GUTERRES, S. S.; RÉ, M. I.; BENVENUTTI, E. V.; POHLMANN, A.R. Nanoparticle-coated organic-inorganic microparticles: Experimental design and gastrointestinal tolerance evaluation. **Química Nova**, v. 29, n. 5, p. 990-996, 2006.

BERNARDI et al. Relative cytotoxicity of indomethacin and indomethacin ethyl ester-loaded nanocapsules against glioma cells lines: An in vivo study. **European Journal of Pharmacology**, v. 586, p. 24-34, 2008.

BILATI, U.; ALLÉMAN, E.; DOELKER, E. Strategic Approaches for Overcoming Peptide and Protein Instability Within Biodegradable Nano and Microparticles. **European Journal of Pharmaceutics and Pharmaceutics**, v.59, p. 375-388, 2005.

BOUCHEMAL, K.; BRIANÇON, S.; PIERRER, E.; FESSI, H. Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimization. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 2080, p. 241-251, 2004.

CARLUCCI, A. M.; BREGNI, C. Productos Nanotecnológicos de Aplicación en Farmacoterapia. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 28, n. 3, p.470-477, 2009.

CATTANI, V. B.; FIEL, L. A.; JAGER, A.; JAGER, E.; COLOME, L. M.; UCHOA, F.; STEFANI, V.; DALLA COSTA, T.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R. Lipid-core nanocapsules restrained the indomethacin ethyl ester hydrolysis in the gastrointestinal lumen and wall acting as mucoadhesive reservoirs. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 39, p. 116-124, 2010.

CLISSOLD, S. P; HEEL, R. C. Tioconazole. A review of its antimicrobial activity and therapeutic use in superficial mycoses. **Drugs**, v. 31, n. 1, p. 29-51, 1986.

CONTRI, R.V.; RIBEIRO, K.L.F; FIEL, L.A.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S. Vegetable oils as core of cationic polymeric nanocapsules: influence on the physicochemical properties. **Journal of Experimental Nanoscience**, p. 1-12, 2012.

CRODA DO BRASIL. Crodamazon Café Verde CA. Campinas: Croda, 2007. 2p. [Catálogo].

CRUZ, L.; SOARES, L. U.; DALLA COSTA, T.; MEZZALIRA, G.; SILVEIRA, N. P.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R. Diffusion and mathematical modeling of release profiles from nanocarriers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 313, p. 198-205, 2006.

DOOMS-GOOSSENS, A.; MATURA, M.; DRIEGH, J.; DEGREEF, H. Contact allergy to imidazoles used as antimycotic agents. **Contact Dermatitis**, v. 33, n. 2, p. 73-77, 1995.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. Vol.1, 5. ed. Brasília: Editora Fiocruz, 2010.

FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J-Ph.; AMMOURY, N.; BENITA, S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutics**, v.55, n.1, p. R1-R4, 1989.

FLORES et al. Nanostructured systems containing an essential oil: Protection against volatilization. **Química Nova**, v. 34, n. 6, p. 968-972, 2011.

FLORES et al. Antifungal Activity of Nanocapsule Suspensions Containing Tea Tree Oil on the Growth of *Trichophyton rubrum*. **Mycopathologia**, v. 175, p. 281-286, 2013.

FONTANA, M. C.; CORADINI, K.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R.; BECK, R. C. R. Nanoencapsulation as a way to control the release and to increase the photostability of clobetasol propionate: influence of the nanostructure system. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 5, p. 254, 2009.

FRIEDRICH, R.B.; FONTANA, M.C.; BECK, R.C.R. Development and physicochemical characterization of dexamethasone-loaded polymeric nanocapsule suspensions. **Química Nova**, v. 31, p. 1131-1136, 2008.

FROMTLING, R. A. Overview of medically important antifungal azole derivatives. **Clinical Microbiology Reviews**, v.1, p.187–217, 1988.

GUTERRES, S.S.; WEISS-ANGELI, V.; FREITAS, L. L.; POHLMANN, A. R. Influence of benzyl benzoate as oil core on the physicochemical properties of spray-dried powders from polymeric nanocapsules containing indomethacin. **Drug Delivery**, v.7, p. 195-199, 2000.

JÄGER, A., STEFANI, V., GUTERRES, S. S., POHLMANN, A. R. Physico-chemical characterization of nanocapsule polymeric wall using fluorescent benzazole probes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 338, p. 297-305, 2007.

JIMÉNEZ, M. M.; PELLETIER, J.; BOBIN, M. F.; MARTINI, M. C. Influence of encapsulation on the in vitro percutaneous absorption of octyl-methoxycinnamate. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 272, p. 45-55, 2004.

JEVONS, S.; GYMER, G.E.; BRAMMER, K.W.; COX, D.A.; LEEMING, M.R.G. Antifungal activity of tioconazole (uk-20,349), a new imidazole derivative. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 15, n. 4, p. 597-602, 1979.

JONES, R.N.; BALE, M. J.; HOBAN, D.; ERWIM, M. E. In vitro antimicrobial activity of tioconazole and its concentrations in vaginal fluids following topical (vagistat-1 16.5%) application. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 17, n. 1, p. 45-51, 1993.

LATRILLE, F.; PERRAUD, J.; STADLER, J.; MONRO, A.M; SUTTER, C. J. Effects of tioconazole on parturition and serum levels of 17 β -oestradiol, progesterone, LH and PRL in the rat. **Biochemical Pharmacology**, v. 36, n. 7, p. 1119-1124, 1987.

LEGRAND, P.; BARRAT, G.; MOSQUEIRA, V.; FESSI, H.; DEVISSAGUET, J. P. Polymeric nanocapsules as drug delivery systems: a review. **STP Pharma Science**, v. 9, n. 5, p. 411-418, 1999.

MARTINEZ-ROSSI, N.M.; PERES, N.T.A.; ROSSI, A. Antifungal Resistance Mechanisms in Dermatophytes. **Mycopathologia**, v. 166, p. 369-383, 2008.

MASLYANSKAYA, S.; ALDERMAN, E.; LOUIS-JAQUES, J.; O'BRIEN, R.F. Vulvovaginal conditions. **Practical Pediatric and Adolescent Gynecology**, p. 285-292, 2013.

MISHRA, B; PATEL, B.B.; TIWARI, S. Colloidal nanocarriers: a review on formulation technology, types and application toward targeted drug delivery. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v.6, p. 9-24, 2010.

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

MOSQUEIRA, V. C. F.; LEGRAND, P.; PINTO-ALPHANDARY, H.; PUISIEUX, F.; BARRAT, G. Poly (D, L – Lactide) nanocapsules prepared by a solvent displacement process: influence of the composition on physicochemical and structural properties. **Journal of Pharmaceutical Science**, v. 89, n. 5, p. 614-626, 2000.

MUÑOZ, A.J.C.; TUR-TUR, C.; MOLINA, J.M.H.; SANTOS, P.; CÁRDENES, D.; GIUSIANO, G. Antifúngicos disponibles para el tratamiento de lãs micosis ungueales. **Revista Iberoamericana Micología**, v. 27, n. 2, p. 49-56, 2010.

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

PADMAVATHY, N; VIJAYARAGHAVAN, R. Enhanced bioactivity of ZnO Nanoparticles-an antimicrobial study. **Science and Technology of Advanced Materials**, v. 9, n. 3, 2008.

PATEL, N.R.; Itraconazole loaded poly(lactic-co-glycolic) acid nanoparticles for improved antifungal activity, 2010. Dissertação (Mestrado em Science in Biological and Agricultural Engineering)- Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College, Louisiana State University, 2010.

PELLE, E.; ANDERSON, J. **Topical composition and method for enhancing lipid barrier synthesis**. United States Patent 6716437, 1999.

PEREDA, M.D.C.V.; POLEZEL, M.A.; NOGUEIRA, C. et al. 2006. Uso do óleo de café Verde (*Coffea arábica*) em formulações cosméticas e farmacêuticas para a manutenção das propriedades da pele. PI0602842-0. Disponível em: <<http://www.patentesonline.com.br/uso-do-leo-de-caf-verde-coffee-arabica-em-formula-es-cosm-ticas-e-farmac-uticas-para-74028.html>>. Acesso 30 mai. 2013.

RAWAT, M.; SINGH, D.; SARAF, S. Nanocarriers: promising vehicle for bioactive drugs. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, p. 1790-1798, 2006.

SANTOS, S. S.; LORENZONI, A.; FERREIRA, L. M.; MATTIAZZI, J.; ADAMS, A. I. H.; DENARDI, L. B.; ALVES, S. H.; SCHAFFAZICK, S. R.; CRUZ, L. Clotrimazole-loaded Eudragit® RS100 nanocapsules: Preparation, characterization and in vitro evaluation of antifungal activity against *Candida* species. **Materials Science and Engineering: C**, v. 33, p. 1389-1394, 2013.

SAVIAN, A.L.; VARELLA, F.T.; ATHAYDE, M.L.; SILVA, C.B. Desenvolvimento e avaliação preliminar da estabilidade de emulsão não-iônica O/A contendo óleo de café verde como potencializador de fator de proteção solar. **Revista Brasileira de Farmácia**, 91(2), p., 82-88, 2011.

SCHAFFAZICK, S. R.; POHLMANN, A. R.; FREITAS, L. L.; GUTERRES, S. S. Caracterização e estudo da estabilidade de suspensões de nanocápsulas e de nanoesferas poliméricas contendo diclofenaco. **Acta Farmacêutica Bonaerense**, v. 21, n. 2, p. 99-106, 2002.

SCHAFFAZICK, S. R.; FREITAS, L. L.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 726-737, 2003.

SHAH, K. A.; DATE, A. A.; JOSHI, M. D.; PATRAVALE, V. B. Solid lipid nanoparticles (SLN) of tretinoin: **Potencial in topical delivery**, v. 345, p.163-171, 2007.

SINKO, P. J. Chemical Kinetics and Stability. In: P. J. Sinko, Ed. Martín's. **Physical Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**. Lippincott William & Wilkins, Baltimore, p. 396-434, 2006.

SWEETMAN, S.C. **Martindale - Guia Completa de Consulta Fármaco-Terapêutica**. 2 Ed. Barcelona: Pharma Editores, S.L., 2006. p. 588.

VITALIS, G. S. Utilização de nanopartículas de clorexidina como alternativa de medicação intracanal, 2012. Dissertação (Mestrado em Nanociências) - Centro Universitário Franciscano, Santa Maria, 2012.

WEISS-ANGELI, V.; POLLETO, F. S.; ZANACAN, L. R.; BALDASSO, F.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Nanocapsules of octyl methoxycinnamate containing quercetin delayed the photodegradation of both components under ultraviolet A Radiation. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v.4, n. 1, p. 80-89, 2008.

CAPÍTULO 3: Hidrogéis contendo nanocápsulas poliméricas e nanoemulsões de tioconazol: desenvolvimento, caracterização e liberação *in vitro*.

CAPÍTULO 3: Hidrogéis contendo nanocápsulas poliméricas e nanoemulsões de tioconazol: desenvolvimento, caracterização e liberação *in vitro*.

1.1 Apresentação

A via tópica constitui uma interessante alternativa para o tratamento de doenças, por ser uma terapia não invasiva e por promover a ação local de substâncias, reduzindo, assim, efeitos colaterais sistêmicos. Entretanto, a penetração cutânea é um grande desafio no desenvolvimento de formulações, uma vez que a camada córnea atua como uma barreira para a penetração de fármacos ou substâncias através da pele (SCHÄFER-KORTING, MEHNERT & KORTING, 2007). O uso de sistemas nanoestruturados em formulações dermatológicas tem sido uma estratégia para aumentar a biodisponibilidade de substâncias e para modular a penetração cutânea (ALVES et al., 2007).

No capítulo 2 foi apresentado o desenvolvimento e a caracterização físico-química de suspensões de nanocápsulas poliméricas e nanoemulsões contendo tioconazol com dois diferentes tipos de óleos: triglicerídeos de cadeia média e o óleo de café verde. Neste capítulo, foi avaliada a incorporação desses nanocarreadores em hidrogéis de Aristoflex[®] AVC, sendo apresentada a caracterização físico-química e o perfil de liberação *in vitro* das formulações semissólidas em estudo.

1 INTRODUÇÃO

Micoses superficiais são doenças causadas quando certos tipos de fungos colonizam tecidos queratinizados como pele, unhas, pêlos e cabelos, desencadeando processos inflamatórios decorrentes da destruição da queratina. Dentre as principais infecções, destacam-se as dermatofitoses ou tineas, pitiríase versicolor e candidíases mucocutâneas, sendo os principais agentes causadores espécies de fungos pertencentes aos gêneros *Epidermophyton*, *Microsporum* e *Trichophyton*, além de algumas leveduras como *Candida* sp (SIDRIM; ROCHA, 2004).

Por serem transmitidas pelo contato direto, estão entre as doenças infecciosas mais comuns (MARTINEZ-ROSSI; PERES; ROSSI, 2008), afetando principalmente a qualidade de vida dos pacientes por causarem desconforto, coceira, dores nos locais afetados e até mesmo constrangimentos (SHAW et al., 2002; TABORDA, et al., 2010). Além de danos causados aos pacientes, essas enfermidades representam um dos principais problemas sanitários a nível mundial, gerando um custo significativo para os sistemas de saúde de países desenvolvidos e subdesenvolvidos.

O tratamento dessas infecções geralmente é realizado pela administração tópica de antifúngicos, por um longo período de tempo, o que requer persistência por parte dos pacientes (CAMPANHA; TASCA; SVIDZINSKI, 2007). Cabe salientar que os fungos que acometem as unhas são os mais difíceis de erradicar, uma vez que, a densa estrutura queratínica e a baixa vascularização do local reduzem a absorção de medicamentos por esta via, tornando o tratamento das onicomicoses (*tinea unguium* ou micose das unhas) ainda mais complicado (MURDAN, 2002). Para o tratamento tópico ideal de micoses superficiais é necessário uma formulação que promova uma alta difusão do princípio ativo, a fim de que este possa atingir a região afetada na dose adequada (REPKA; MIDIDODDI; STODGHILL, 2004). Neste sentido, o grande desafio seria o desenvolvimento de formulações que fiquem retidas no estrato córneo, sejam eficazes em baixas concentrações, possibilitem uma redução dos efeitos adversos e uma posologia conveniente (MACHADO, 2008).

O tioconazol é um antifúngico pertencente à classe dos imidazóis, utilizado no tratamento tópico de dermatofitoses, pitiríase versicolor e candidíases mucocutâneas. Apresenta atividade frente a uma série de microorganismos, como *Candida* sp, *Trichophyton* sp, *Epidermophyton* sp e *Malassezia furfur*, bem como à algumas clamídias, tricomonas e bactérias gram positivas (SWEETMAN, 2006). Seu mecanismo de ação está relacionado à

inibição da síntese do ergosterol, comprometendo o desenvolvimento dos microorganismos (JONES et al., 1993).

Por outro lado, na literatura encontram-se relatos do aparecimento de efeitos indesejados, como coceira, irritação, queimação e prurido decorrentes do uso de tioconazol. Muñoz e colaboradores (2010) relacionam o aparecimento desses efeitos com a necessidade de elevadas concentrações do fármaco para obtenção do efeito terapêutico, devido a sua reduzida absorção. Ainda, Dooms-Goossens e colaboradores (1995) relatam que após a análise de casos de alergia de contato recorrente do uso de imidazóis, dos 43 pacientes tratados com tioconazol, 33 apresentaram reações positivas, estando este entre os derivados imidazólicos com maior potencial alergênico.

O desenvolvimento de sistemas nanoestruturados tem sido uma estratégia bastante promissora para aplicação tópica de substâncias ativas, uma vez que a via epidérmica apresenta como vantagens a ação local e a baixa absorção sistêmica. Por apresentarem um tamanho reduzido ($< 1\mu\text{m}$), essas partículas são capazes de transpor a barreira formada pelo estrato córneo, proporcionando um direcionamento em níveis ideais da substância ativa até o local de ação (ALVAREZ-ROMÁN et al., 2004). Diferentes vantagens são relatadas a cerca da aplicação tópica dos sistemas nanoestruturados, podendo destacar: praticidade ao paciente, por permitir reduzir o número de aplicações (JIMÉNEZ et al., 2004); redução da toxicidade (GUTERRES; ALVES; POHLMANN, 2007); maior penetração do ativo na derme e epiderme viável (ALVES et al., 2007); diminuição de reações alérgicas (PAESE et al., 2009) e a liberação controlada do fármaco (MARCHIORI et al., 2010). Além disso, reações de irritação e sensibilidade podem ser prevenidas, uma vez que o encapsulamento diminui o contato direto da substância com o local (GUTERRES; ALVES; POHLMANN, 2007).

Outra grande vantagem em utilizar esses sistemas na terapia tópica é o fato de promoverem um aumento da adesividade da substância ativa, evitando que a formulação seja removida por fricções provocadas pelas vestimentas ou mesmo pelas atividades cotidianas (GUTERRES; ALVES; POHLMANN, 2007). Laderman e colaboradores (2007) comprovaram a capacidade das nanoestruturas em ficarem retidas no folículo piloso. Nesse estudo, os autores demonstraram que um marcador fluorescente associado à nanopartículas permaneceu por 10 dias no folículo piloso, enquanto que o marcador não associado foi detectado por quatro dias após a aplicação tópica.

A incorporação das suspensões coloidais em bases semissólidas pode melhorar sua estabilidade, além de facilitar sua aplicabilidade. Essas vantagens podem ser ainda mais evidentes quando associadas a géis hidrofílicos, uma vez que estes são biocompatíveis,

hidrofílicos, flexíveis e versáteis (HAMIDI; AZADI; RAFIEI, 2008). Ourique e colaboradores (2011) desenvolveram hidrogéis de Carbopol[®] Ultrez 10 NF contendo nanocápsulas de tretinoína e obtiveram maior fotoproteção do fármaco frente à luz UVA, além de observarem um aumento na retenção do mesmo sobre a pele, obtendo um controle maior da permeabilidade da tretinoína. No mesmo contexto, Fontana e colaboradores (2011) desenvolverem hidrogéis com nanocápsulas e nanoemulsões de propionato de clobetasol, a fim de avaliar sua eficácia em dermatites de contato. O maior controle da liberação observado para os sistemas nanoestruturados promoveu um melhor efeito imunossupressor e um aumento da eficácia no tratamento *in vivo* da doença.

De acordo com a potencialidade das nanoemulsões e nanocápsulas poliméricas contendo tioconazol desenvolvidas por nosso grupo de pesquisa, aliadas as vantagens apresentadas pela aplicação tópica dos sistemas nanoestruturados, este trabalho tem por objetivos a incorporação dos sistemas coloidais desenvolvidos em hidrogéis de Aristoflex[®] AVC, bem como sua caracterização, avaliação das propriedades reológicas, espalhabilidade e perfil de liberação *in vitro*. É importante ressaltar que este trabalho é totalmente inovador, uma vez que não existe, até o momento, hidrogéis contendo tioconazol.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material

O tioconazol (99.22 %, w/w) foi adquirido da Pharma Nostra (São Paulo, Brasil); poli (ϵ -caprolactona) (PCL, Mn = 70,000 - 90,000) e Span[®] 80 (monooleato de sorbitano) da Sigma Aldrich (São Paulo, Brasil); Tween[®] 80 (polissorbato 80), etanol e acetona da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil); triglicerídeos de cadeia média (TCM) foram obtidos da Delaware (Porto Alegre, Brasil); o óleo de café verde da DEG (São Paulo, Brasil); Aristoflex[®] AVC (acriloldimetiltaurato/VP) da Clariant (São Paulo, Brasil) e Germal[®] 115 (imidazolidinil uréia) da Delaware (Porto Alegre, Brasil). Metanol grau HPLC foi adquirido da Tedia (Rio de Janeiro, Brasil).

2.2 Preparação das suspensões de nanocápsulas poliméricas e nanoemulsões

As suspensões de nanocápsulas poliméricas (NC) e nanoemulsões (NE) contendo tioconazol (1,0 mg/mL) foram preparadas em triplicata, pelos métodos de deposição

interfacial do polímero pré-formado (FESSI et al., 1989) e emulsificação espontânea (BOUCHEMAL et al., 2004), respectivamente. Uma fase orgânica composta por Span[®] 80 (0,1925 g), óleo de café verde (OC) ou triglicerídeos de cadeia média (TCM) (0,4 g), tioconazol (0,025 g), PCL (0,25 g) e acetona (67 mL) foi lentamente vertida, através de um funil, em uma fase aquosa contendo água ultrapura (133 mL) e Tween[®] 80 (0,1925g), sob agitação magnética. A agitação foi mantida por 10 minutos e, em seguida, a dispersão foi submetida à evaporação em evaporador rotatório (Fisatom, Brasil) para eliminação do solvente e ajuste da concentração de fármaco (volume final de 25 mL). As formulações foram denominadas: NC_{TCM}-TIO e NE_{TCM}-TIO (nanocápsulas e nanoemulsões preparadas com TCM, respectivamente); NC_{OC}-TIO e NE_{OC}-TIO (nanocápsulas e nanoemulsões preparadas com OC, respectivamente).

As amostras foram avaliadas em relação ao pH, tamanho das partículas e índice de polidispersão (PDI) por espectroscopia de correlação de fótons (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments), a 25 ± 2 °C, após diluição (1:500, v/v) em água ultrapura.

2.3 Preparação dos hidrogéis

Os hidrogéis foram preparados a partir das suspensões de nanocápsulas poliméricas e nanoemulsões contendo tioconazol, em triplicata, utilizando gral e pistilo. Inicialmente, o polímero formador de gel (Aristoflex[®]AVC – 1,0 %) e o conservante (Germal[®] 115 – 0,33 %), foram, cuidadosamente, triturados e homogeneizados. Em seguida, as dispersões coloidais foram lentamente adicionadas a essa mistura, a fim de obter 24,0 g de hidrogel (1,0 mg/g). Para fins comparativos, foram preparadas formulações com o fármaco livre (não associado aos nanocarreadores). Para estas amostras, o tioconazol foi previamente solubilizado em Tween[®] 80 (0,1925 g) e etanol (500 µL) para posterior mistura com os demais componentes da formulação (água, polímero e conservante), na mesma proporção que os hidrogéis contendo as nanoestruturas. Formulações placebo (omitindo-se a presença de fármaco) foram, também, preparadas para posterior avaliação da especificidade do método cromatográfico. As formulações foram designadas: HG-NE_{OC}-TIO e HG-NC_{OC}-TIO (hidrogéis contendo nanoemulsões e nanocápsulas poliméricas de tioconazol e OC, respectivamente); HG-NE_{TCM}-TIO e HG-NC_{TCM}-TTIO (hidrogéis contendo nanoemulsões e nanocápsulas poliméricas de tioconazol e TCM, respectivamente) e HG-TIO (hidrogel contendo o fármaco livre).

2.4 Caracterização físico-química dos hidrogéis

Após a preparação, as formulações foram caracterizadas quanto à cor, odor, aspecto, teor de fármaco, tamanho de partículas, índice de polidispersão (PDI), pH, espalhabilidade, viscosidade e propriedades reológicas.

2.4.1 Determinação do teor de fármaco nos hidrogéis

A quantificação do fármaco nas formulações foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando um cromatógrafo Shimadzu LC-10A (Kyoto, Japão), equipado com bomba LC-10A e detector modelo UV-VIS SPD-10A. Foi utilizada uma coluna Gemini Phenomenex[®] C18 (150 x 4,6 mm, 5 µm) e pré coluna Phenomenex[®] C-18 (4,0 x 3,0 mm, 5 µm). A fase móvel foi composta por uma mistura de metanol/água (80:20 v/v) com 0,18% de hidróxido de amônio, e o fluxo empregado foi de 1,0 mL/min. O volume de injeção foi de 20 µL e o fármaco foi detectado em 219 nm. Para a determinação da pureza do pico um segundo cromatógrafo foi utilizado (Shimadzu LC-20^a, Kyoto, Japão), equipado com bomba LC-20AT, detector SPD-M20A PDA e sistema controlador CBM-20A. O método foi validado quanto à especificidade, linearidade e precisão (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

Para a extração do tioconazol, uma alíquota de 0,5076 g de cada hidrogel foi transferida, quantitativamente, para balão volumétrico de 25 mL utilizado como solvente o metanol (20 µg/mL). Essa solução foi submetida à agitação magnética (4.000 rpm) por 20 minutos e em seguida agitada em vórtex (Biomixer, QL - 901) por 2 minutos. Após, as amostras foram centrifugadas (5.500 rpm) por 5 minutos, filtradas em filtro quantitativo e em membrana de celulose regenerada (porosidade de 0,45 µm), sendo, então, analisadas por CLAE-UV.

2.4.2 Determinação do pH

A medida dos valores de pH foi realizada em potenciômetro previamente calibrado (Seven Easy, Mettler Toledo, Brasil) com soluções tampão pH 4,0 e 7,0, após diluição das amostras em água na proporção de 10% (m/v).

2.4.3 Determinação do diâmetro médio das partículas e do índice de polidispersão (PDI) após incorporação das nanoemulsões e nanocápsulas poliméricas em hidrogéis

As amostras foram dispersas em água ultrapura (1:500) e homogeneizadas em agitador vórtex (Biomixer, QL - 901) durante 4 minutos para posterior determinação do diâmetro médio e do índice de polidispersão por espectroscopia de correlação de fótons (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments), a 25 ± 2 °C.

2.4.4 Determinação da espalhabilidade

A espalhabilidade foi determinada à temperatura ambiente, pelo método das placas paralelas descrito por Borguetti e Knorst (2006). Para tal, uma placa molde com orifício central de 1,0 cm de diâmetro foi posicionada sobre uma superfície de vidro (20 x 20 cm) com uma escala milimetrada, sendo posteriormente o orifício preenchido com a formulação. Após, a placa molde foi cuidadosamente removida e, intervalos de um minuto, placas de vidro com peso conhecido foram sendo adicionadas sobre a formulação (total de 10 placas). A medida da área espalhada foi determinada, em milímetros, nos eixos horizontal e vertical após a adição de cada placa (Equação 1). O fator de espalhabilidade foi calculado através da Equação 2 (MILAN et al., 2007).

$$E_i = d^2 \cdot \pi / 4 \quad (1)$$

Onde:

E_i : área de espalhabilidade (mm^2) após aplicação de determinada área i (g);

d : diâmetro médio (mm) determinado após a adição de cada amostra.

$$F_e = A/P \quad (2)$$

Onde:

F_e : fator de espalhabilidade ($\text{mm}^2 \cdot \text{g}$);

A: espalhabilidade máxima (mm^2);

P: peso total adicionado (g).

2.4.5 Avaliação da viscosidade e das propriedades reológicas

As características reológicas das formulações em estudo foram determinadas com o auxílio do viscosímetro rotacional (Brookfield LVDV-II+ Pro, Middleborough, Estados Unidos), com adaptador para pequenas amostras e sensor de cisalhamento SC4-25. As análises foram realizadas em triplicata, a temperatura de 25 ± 1 °C e seis pontos diferentes foram registrados ($0,3$ a $0,9$ s^{-1}), em intervalos de 1 minuto. Os resultados foram analisados com o auxílio do programa Rheocalc (V3.1-1 version, Brookfield, USA) e os reogramas foram avaliados usando diferentes modelos de fluxo: Bingham ($\tau = \tau_0 + \eta\dot{\gamma}$), Casson ($\tau = \tau_0^{0.5} + \eta^{0.5}\dot{\gamma}^{0.5}$), Ostwald ($\tau = k\dot{\gamma}^n$) e Herschel-Bulkley ($\tau = \tau_0^{0.5} + k\dot{\gamma}^n$), onde τ : tensão de cisalhamento; τ_0 : tensão de cisalhamento limite; η : viscosidade; n : índice de fluxo; k : índice de consistência e $\dot{\gamma}$: taxa de cisalhamento (KIM et al., 2003).

2.5 Estabilidade dos hidrogéis frente ao armazenamento

Os hidrogéis foram armazenados em potes plásticos de parede dupla, por 30 dias à temperatura ambiente. Ao final deste período foram analisados quanto ao teor, pH, tamanho de partículas e índice de polidispersão.

2.6 Avaliação da liberação *in vitro* do fármaco a partir dos hidrogéis

Estudos de liberação *in vitro* foram realizados utilizando-se células de difusão vertical do tipo Franz ($n = 6$) com área de difusão de $1,77$ cm^2 e volume de meio receptor de $7,0$ mL. O meio receptor foi composto por uma solução de etanol/água (40:70), a qual foi mantida a temperatura de 35 ± 1 °C sob agitação constante (3.000 rpm). Como barreira de liberação utilizou-se membrana de diálise (porosidade de 12,000 a 14,000 Da, Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil). Para o ensaio, uma alíquota de $0,5$ g de cada formulação foi cuidadosamente espalhada na superfície da membrana e, após intervalos de tempos pré-estabelecidos (0,5; 1; 2; 4; 6 e 8 horas), alíquotas do meio receptor foram coletadas (200 μ L) repondo-se o mesmo volume de meio fresco. O experimento foi conduzido mantendo a condição *sink*. A quantidade de tioconazol liberada foi determinada por CLAE, utilizando as condições cromatográficas descritas no item 2.4.1; entretanto, devido à necessidade do uso de

concentrações menores, uma nova validação do método foi realizada (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

Os perfis de liberação *in vitro* do fármaco, a partir dos hidrogéis, foram analisados mediante modelagem matemática (MicroMath Scientist[®] for Windows[™]), empregando modelo de Higuchi.

2.7 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão e avaliados estatisticamente pela análise de variância (ANOVA), seguida do teste de Tukey, a um nível de significância de 5 %, empregando-se o software SigmaStat Windows versão 3.0.1.0 (Jandel Scientific, USA).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização físico-química dos hidrogéis

Para a preparação dos hidrogéis contendo as nanoestruturas, inicialmente, as nanoemulsões e suspensões de nanocápsulas contendo tioconazol foram avaliadas em relação ao tamanho das partículas e índice de polidispersão. As amostras mostraram-se homogêneas e apresentaram tamanho nanométrico (170 - 202 nm), índice de polidispersão menor que 0,25 (0,13 - 0,22) e pH ácido (6,06 - 6,18). Estes resultados estão de acordo com os obtidos no desenvolvimento destes sistemas descritos no Capítulo 2.

Após a verificação das adequadas condições das nanoestruturas, essas foram incorporadas em hidrogéis de Aristoflex[®] AVC (acriloidimetiltaurato/VP). Este polímero, permite a formação de géis cristalinos, consistentes e estáveis numa ampla faixa de pH (4 a 9), conferindo, ainda, uma agradável sensação à pele (OLIVEIRA, 2009). Além disso, o Aristoflex[®] AVC foi escolhido por ser pouco utilizado na preparação de géis contendo sistemas nanoestruturados. A fim de analisar a influência dos sistemas coloidais nas características e comportamento dos hidrogéis, uma formulação sem a presença das nanoestruturas (fármaco livre) foi, também, preparada e avaliada.

Os hidrogéis apresentaram aspecto brilhante, homogêneo e características organolépticas satisfatórias. Os hidrogéis contendo NC-TIO e NE-TIO com TCM e OC apresentaram coloração branca e levemente amarelada (devido à cor do óleo de café verde),

respectivamente; os hidrogéis com o fármaco livre apresentaram-se incolores. As características físico-químicas dos hidrogéis após preparação encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1: Características físico-químicas dos hidrogéis de Aristoflex[®] AVC contendo nanocápsulas poliméricas e nanoemulsões de tioconazol de tioconazol e os óleos – TCM (HG-NC_{TCM}-TIO, HG-NE_{TCM}-TIO, HG-NC_{OC}-TIO e HG-NE_{OC}-TIO) e com fármaco livre (HG-TIO) (n = 3, média ± desvio padrão)

Formulação	Teor de fármaco (mg/g)	Tamanho de partículas (nm)	PDI*	pH
HG-NC _{TCM} -TIO	0,99 ± 0,00	196 ± 04	0,17 ± 0,05	6,30 ± 0,09
HG-NE _{TCM} -TIO	1,01 ± 0,00	196 ± 13	0,24 ± 0,01	6,48 ± 0,05
HG-NC _{OC} -TIO	1,00 ± 0,01	195 ± 02	0,16 ± 0,03	6,35 ± 0,03
HG-NE _{OC} -TIO	1,00 ± 0,00	203 ± 24	0,24 ± 0,01	6,45 ± 0,03
HG-TIO	1,00 ± 0,01	----	----	6,88 ± 0,18

* Índice de polidispersão; ---- Não determinado.

Para a determinação do teor de fármaco nos hidrogéis, o método analítico foi validado, o qual mostrou-se específico, ou seja, não foi observada a interferência dos excipientes e/ou solventes na quantificação do fármaco, sendo a especificidade confirmada pela análise da pureza do pico (índice de pureza do pico = 1,000). Quanto à linearidade, o método apresentou-se linear na faixa de concentração de 5 a 50 µg/mL ($y = 52105x - 386,7$; $r^2 = 0,9999$) e preciso (repetibilidade – DPR: 0,68% e precisão intermediária – DPR: 0,90%) na faixa de concentrações analisada (20 µg/mL). O teor de tioconazol em todos os hidrogéis, após a preparação, foi próximo ao teórico (0,99 a 1,01 mg/g), demonstrando que o processo de preparação dos hidrogéis não alterou a concentração do fármaco e a técnica de extração foi capaz de recuperar a quantidade teórica do mesmo presente nas formulações.

Os hidrogéis contendo os sistemas nanoestruturados apresentaram pH na faixa ácida (6,48 – 6,30) e portanto compatível com a aplicação tópica (KIM et al., 2006). O tipo de nanoestrutura (NC ou NE) modificou significativamente o pH dos hidrogéis (NE > NC; $p < 0,05$); por outro lado, o tipo de óleo (OC ou TCM) não afetou esse parâmetro ($p > 0,05$). Estes resultados estão de acordo com os obtidos para as respectivas dispersões coloidais, sendo atribuído o fato das nanocápsulas apresentarem pH menor que as nanoemulsões devido à

presença dos ácidos carboxílicos terminais presentes na estrutura da PCL (SCHAFFAZICK et al., 2002). O hidrogel contendo o fármaco livre (HG-TIO) apresentou pH mais elevado. Esta diferença é decorrente das características químicas dos componentes das nanoestruturas que contribuem para o caráter ácido dos sistemas coloidais. Além disso, o fato do tioconazol possuir características básicas contribui para o pH mais elevado do HG-TIO.

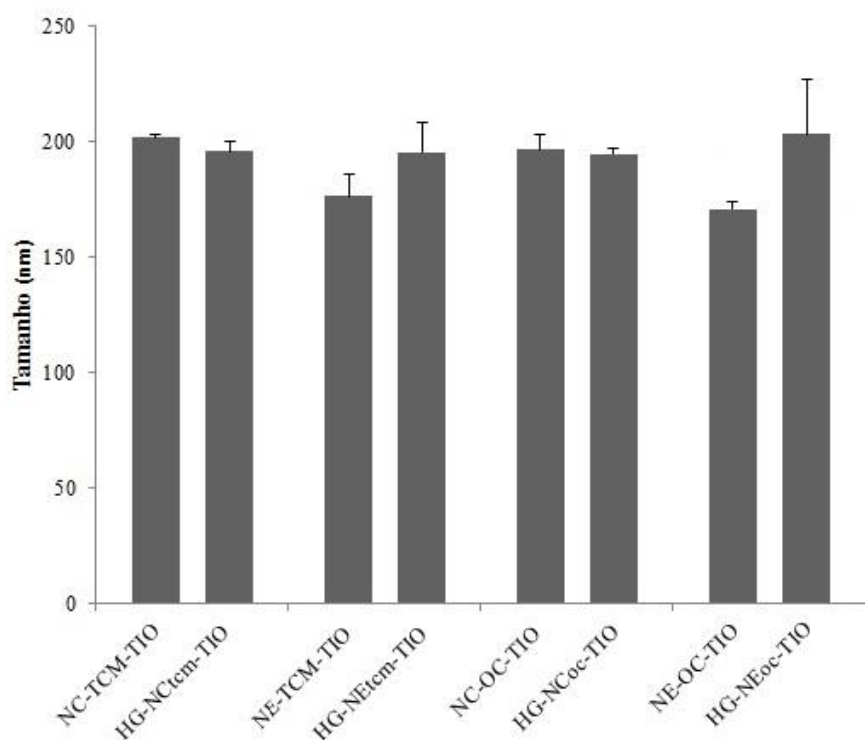


Figura 1: Representação gráfica do diâmetro médio das partículas das suspensões de nanocápsulas poliméricas e nanoemulsões contendo tioconazol com TCM (NC_{TCM}-TIO e NE_{TCM}-TIO) e OC (NC_{OC}-TIO e NE_{OC}-TIO) e os respectivos hidrogéis (HG-NC_{TCM}-TIO, HG-NE_{TCM}-TIO, HG-NC_{OC}-TIO e HG-NE_{OC}-TIO).

Todas as formulações contendo as nanoestruturas apresentaram tamanho nanométrico (203 - 196 nm) e índice de polidispersão abaixo de 0,25 (0,16 - 0,24), indicando uma adequada uniformidade de tamanho dos sistemas. A Figura 1 mostra um comparativo entre o tamanho das nanoemulsões e suspensões de nanocápsulas originais e o tamanho obtido para cada sistema após a incorporação aos hidrogéis. Os resultados demonstraram que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre o tamanho da formulação líquida original e da respectiva preparação semissólida, indicando a presença das nanoestruturas após sua

incorporação nos hidrogéis. A fim de verificar a influência do polímero formador de gel (Aristoflex[®] AVC) e dos demais constituintes da formulação, um hidrogel branco (sem a presença de fármaco e das nanoestruturas) foi preparado. A análise por espectroscopia de correlação de fótons demonstrou a presença de partículas de tamanho micrométrico (485 ± 50) e um alto índice de polidispersão ($0,52 \pm 24,8$), indicando que os valores de tamanho obtidos a partir dos hidrogéis contendo as nanoestruturas é proveniente dos sistemas nanoestruturados.

A avaliação reológica de produtos semissólidos de base nanotecnológica tem sido bastante estudada (BOOULMEDARAT et al., 2003; ALVES et al., 2005; MARCHIORI et al., 2010), uma vez que esta característica pode influenciar na liberação tópica das substâncias, além de auxiliar na caracterização desses sistemas. Através das propriedades reológicas das formas farmacêuticas é possível prever o comportamento da formulação e auxiliar no processamento do produto. Além disso, permite a avaliação da sua espalhabilidade e aderência à pele, sendo possível analisar a estabilidade físico-química de formulações frente aos efeitos causados pela temperatura e tempo (MAMBRO et al., 2003; SINKO, 2006).

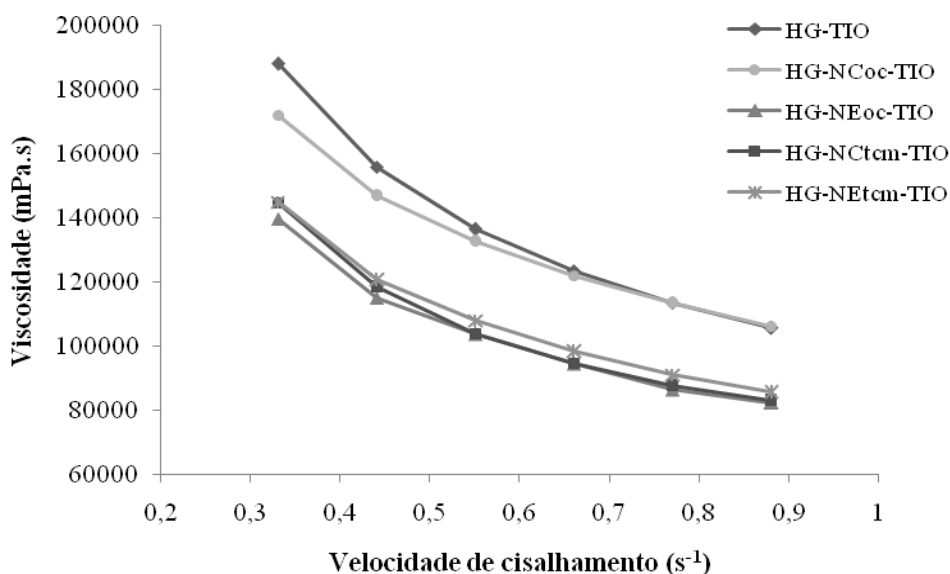


Figura 2: Representação gráfica de viscosidade (mPa.s) dos hidrogéis de Aristoflex[®] AVC contendo nanocápsulas e nanoemulsões de tioconazol em função da velocidade de cisalhamento (s⁻¹).

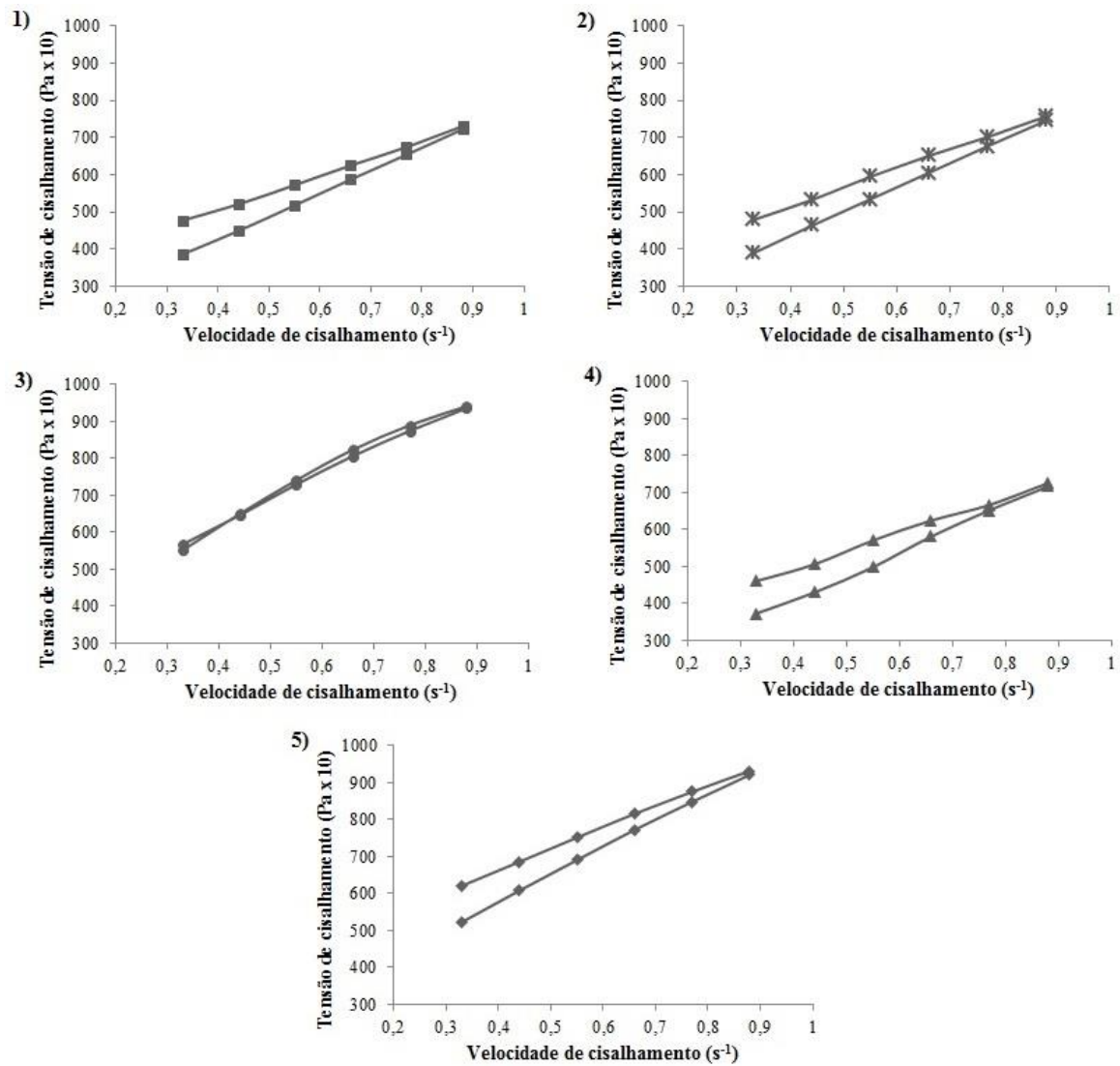


Figura 3: Reogramas dos hidrogéis de Aristoflex[®] AVC. (1) HG-NC_{TCM}-TIO; (2) HG-NE_{TCM}-TIO; (3) HG-NC_{OC}-TIO; (4) HG-NE_{OC}-TIO e (5) HG-TIO.

Os reogramas dos hidrogéis foram obtidos pela representação gráfica da viscosidade *versus* velocidade de cisalhamento (Figura 2) e tensão de cisalhamento *versus* velocidade de cisalhamento (Figura 3). A partir dos resultados foi possível constatar que todas as formulações apresentaram comportamento de fluxo não newtoniano, ou seja, não foi verificada uma relação linear entre a tensão de cisalhamento e a velocidade de cisalhamento (KIM et al., 2003). Este comportamento é característico de sistemas semissólidos, sendo observado em alguns estudos de desenvolvimento de hidrogéis contendo nanocarreadores

(FONTANA et al., 2011; OURIQUE et al., 2011). Além disso, as formulações apresentaram tixotropia (Figura 3), com exceção do HG-NC_{OC}-TIO. Este comportamento é caracterizado pela diminuição aparente da viscosidade em função do tempo de deformação, sendo uma propriedade desejável em formulações farmacêuticas por permitirem uma fácil remoção do material de acondicionamento e por proporcionarem uma melhor espalhabilidade (AULTON, 2005). O comportamento tixotrópico foi relatado para os hidrogéis contendo nanocarreadores, como por exemplo, em hidrogéis de Carbopol[®] 934 associados a carreadores lipídicos nanoestruturados contendo cetoconazol e clotrimazol e nanopartículas lipídicas sólidas com os mesmos fármacos (SOUTO; MÜLLER, 2006). Por outro lado, Alves e colaboradores (2005) verificaram a ausência de tixotropia nos hidrogéis de Carbopol[®] 940 contendo nanocápsulas, nanoesferas e nanoemulsões de nimesulida.

A análise dos reogramas foi realizada empregando-se quatro modelos de fluxo: Bingham, Ostwald, Casson e Herschel-Bulkley. O modelo que melhor descreveu o fluxo dos hidrogéis foi o de Casson, apresentando uma correlação maior que 0,96. Nos sistemas não newtonianos os fluidos podem apresentar características plásticas, pseudoplásticas e dilatantes (KIM et al., 2003). O modelo de Casson descreve o comportamento plástico dos sistemas e se caracteriza por apresentar uma tensão de cisalhamento inicial para iniciar o fluxo das camadas moleculares (LACHMAN et al., 2001). Na literatura científica alguns trabalhos descrevem este tipo de comportamento para géis hidrofílicos contendo sistemas nanoestruturados (PAVELIC; SKALKO-BASNET; SHUBERT, 2001; MILÃO et al., 2003).

Milão e colaboradores (2003) desenvolveram géis hidrofílicos de Carbopol[®] 940 contendo nanocápsulas poliméricas de diclofenaco, os quais apresentaram comportamento não newtoniano e fluxo plástico (modelo de Casson). Mais recentemente, nosso grupo de pesquisa avaliou as características reológicas de hidrogéis de Aristoflex[®] AVC contendo nanocápsulas poliméricas de antralina, os quais apresentaram tixotropia e seguiram o modelo de Casson (SAVIAN, 2012), conforme observado neste trabalho. Cabe salientar, que a incorporação das nanoestruturas nos hidrogéis não alterou as características reológicas dos mesmos, uma vez que os hidrogéis contendo o fármaco livre também apresentaram comportamento não-newtoniano, fluxo plástico (modelo de Casson) e tixotropia.

Após estabelecer o modelo de fluxo, os parâmetro de viscosidade (η) e valor de cedência ($\hat{\sigma}_0$) foram calculados (Tabela 2). A partir dos resultados, verificou-se que a incorporação das nanocápsulas e nanoemulsões ao hidrogel não alterou significativamente a viscosidade das formulações ($p > 0,05$). Da mesma forma, os valores de cedência não diferiram entre as formulações (96 a 190 Pa). A não interferência dos sistemas

nanoestruturados na viscosidade dos hidrogéis também foi observada por Almeida e colaboradores (2012), ao compararem hidrogéis de Carbopol Ultrez[®] 10 NF contendo nanocápsulas de rutina com hidrogéis contendo o fármaco livre.

Tabela 2: Valores de viscosidade (η), valor de cedência (τ_0) e fator de espalhabilidade (F_e) calculados para os hidrogéis de Aristoflex[®] AVC contendo nanocápsulas e nanoemulsões de tioconazol e o fármaco livre (n = 3, média \pm desvio padrão)

Formulação	η (mPa.s)	$\hat{\sigma}_0$ (Pa)	F_e (mm ² /g)
HG-NC _{TCM} -TIO	29466 \pm 1688	115,13 \pm 4,55	5,27 \pm 0,47
HG-NE _{TCM} -TIO	33290 \pm 1309	106,10 \pm 40,14	5,81 \pm 0,77
HG-NC _{OC} -TIO	37629 \pm 7947	161,00 \pm 23,13	4,98 \pm 0,61
HG-NE _{OC} -TIO	32620 \pm 814	96,70 \pm 7,48	6,10 \pm 0,59
HG-TIO	33986 \pm 10608	188,97 \pm 130,30	5,43 \pm 0,60

Outra característica importante a ser avaliada em formulações semissólidas é a espalhabilidade. Através deste parâmetro se verifica a capacidade da formulação em se espalhar sobre uma superfície após um determinado período de tempo, estando relacionada com a sua aplicação no local e com a ação requerida (ZANIN et al., 2001; GARG et al., 2002). Os valores de espalhabilidade *versus* peso foram plotados em gráfico e se encontram representados na Figura 4. Para os hidrogéis em estudo, os perfis de espalhabilidade foram semelhantes, independentes da presença e do tipo de sistema nanoestruturado incorporado ao hidrogel. Da mesma forma, diferenças significativas entre os fatores de espalhabilidade verificado para as formulações não foram observadas ($p > 0,05$) (Tabela 2). Estes resultados corroboram com os obtidos por Alves e colaboradores (2005) na avaliação da espalhabilidade de hidrogéis de Carbopol[®] 940 contendo nimesulida associada à nanoemulsões, nanocápsulas e nanoesferas.

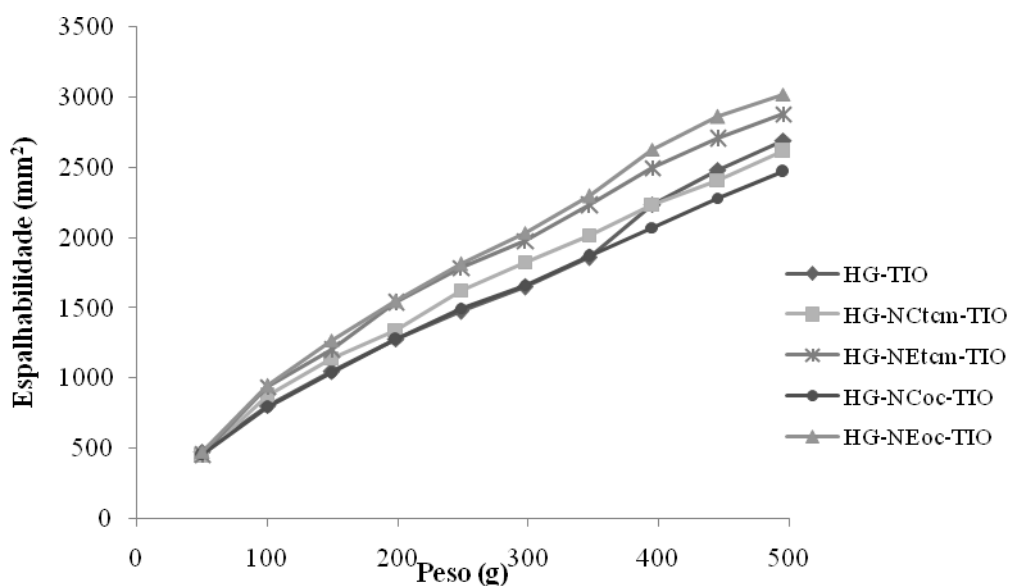


Figura 4: Representação gráfica da espalhabilidade dos hidrogéis de Aristoflex® AVC em função do peso adicionado (g).

3.2 Estudo de liberação *in vitro*

O estudo de liberação *in vitro* do tioconazol associado à nanoemulsões e nanocápsulas poliméricas e do fármaco livre a partir dos hidrogéis foi realizado utilizando célula de difusão do tipo Franz e membrana de diálise como barreira de difusão. A escolha desta membrana se deve ao tamanho menor dos poros (12,000 a 14,000 Da), impedindo a passagem das nanoestruturas. Os resultados obtidos estão representados na Figura 5. Para a quantificação do tioconazol nos diferentes tempos, o método analítico foi validado e se mostrou específico, ou seja, o meio receptor não interferiu no doseamento do fármaco (Apêndice 2); linear na faixa de concentração de 0,5 a 30 $\mu\text{g/mL}$ ($y = 52480x + 1120$; $r^2 = 1$), apresentando regressão linear significativa ($F_{\text{calculado}} = 28442,97 > F_{\text{tabelado}} = 4,96$) e ausência de desvio de linearidade ($F_{\text{calculado}} = 0,3446 < F_{\text{tabelado}} = 3,71$) e preciso (repetibilidade: – DPR: 1,38%; precisão intermediária: – DPR: 1,08%).

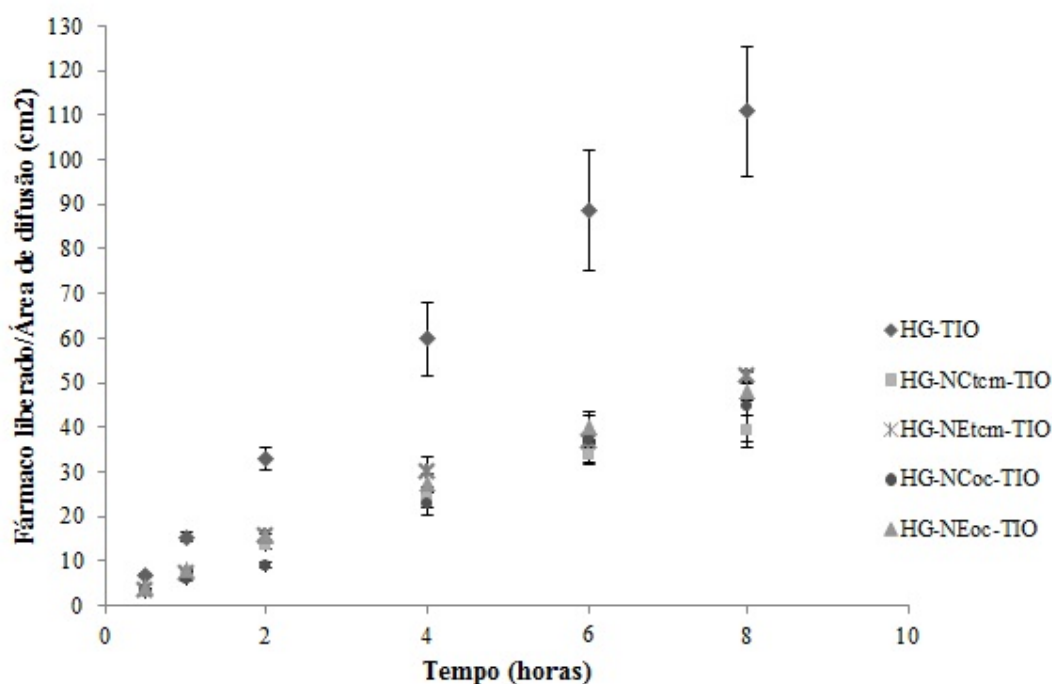


Figura 5: Liberação *in vitro* do tioconazol a partir dos hidrogéis em função do tempo (h).

A partir dos resultados é possível verificar que o tioconazol quando livre (não associado aos nanocarreadores – HG-TIO) apresentou uma maior liberação quando comparado com as formulações contendo as nanoestruturas. Ao final de oito horas de ensaio as formulações HG-NC_{TCM}-TIO, HG-NE_{TCM}-TIO, HG-NC_{OC}-TIO e HG-NE_{OC}-TIO liberaram $39,19 \pm 3,52$ (13,87%); $51,31 \pm 1,62$ (18,16%); $44,61 \pm 7,75$ (15,79%) e $47,99 \pm 2,09$ $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (16,99%) de fármaco, respectivamente, enquanto que o HG-TIO liberou $110,82 \pm 14,45$ $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (39% do total de fármaco aplicado), evidenciando a eficácia das nanoestruturas em controlar a liberação do fármaco. Os resultados encontrados permitem supor que o fármaco esteja localizado mais internamente às partículas, pois uma localização mais externa do mesmo levaria a uma liberação mais rápida do que a observada neste estudo, onde após uma hora de ensaio menos de 19% do fármaco havia sido liberado. Esse fato pode ser justificado pela alta lipofilicidade do tioconazol e consequente afinidade do mesmo pela fase oleosa das nanoestruturas; entretanto, para uma correta afirmação do local de associação do fármaco a esses sistemas, ensaios mais específicos necessitam ser realizados.

Tabela 3: Constantes de velocidade (k), coeficientes de correlação (r) e MSC obtidos no estudo de liberação *in vitro* do tioconazol para os hidrogéis contendo o fármaco livre (HG-TIO), nanocápsulas poliméricas (HG-NC_{TCM}-TIO e HG-NC_{OC}-TIO) e nanoemulsões (HG-NE_{TCM}-TIO e HG-NE_{OC}-TIO) de acordo com o modelo de Higuchi ($n = 6$, média \pm desvio padrão)

Formulação	Modelo de Higuchi		
	r	k (h^{-1})	MSC
HG-TIO	$0,967 \pm 0,01$	$11,809 \pm 1,25$	$1,933 \pm 0,30$
HG-NC _{TCM} -TIO	$0,977 \pm 0,00$	$4,430 \pm 0,27$	$2,228 \pm 0,17$
HG-NE _{TCM} -TIO	$0,969 \pm 0,01$	$5,366 \pm 0,15$	$1,974 \pm 0,12$
HG-NC _{OC} -TIO	$0,953 \pm 0,01$	$4,679 \pm 0,60$	$1,653 \pm 0,25$
HG-NE _{OC} -TIO	$0,975 \pm 0,00$	$5,295 \pm 0,26$	$2,155 \pm 0,15$

A modelagem matemática dos resultados seguiu modelo de Higuchi e as constantes encontradas estão na Tabela 3. Todas as formulações apresentaram adequado coeficiente de correlação (r) e as constantes de velocidade (k) demonstram que os hidrogéis contendo as NC, propiciaram uma liberação mais lenta do fármaco ($p > 0,05$) devido à presença da parede polimérica. Fontana e colaboradores (2010) relatam que a utilização da PCL como invólucro polimérico de nanocápsulas promoveu uma liberação ainda mais controlada do propionato de clobetasol quando comparado à utilização de polímeros amorfos, relacionando os resultados obtidos com as características hidrofóbicas do polímero, a sua estrutura semicristalina e ao organizado arranjo de suas cadeias poliméricas. Não foi observada influência dos óleos (TCM ou OC) na liberação do tioconazol ($p > 0,05$).

Cabe salientar que os resultados obtidos neste ensaio corroboram com outros trabalhos descritos na literatura. Em estudo realizado por Marchiori e colaboradores (2010) observou-se que o hidrogel de Carbopol[®] Ultrez 10 NF contendo nanocápsulas de dexametasona promoveu um maior controle da liberação do que o hidrogel que continha o fármaco livre. No mesmo contexto, Fontana e colaboradores (2011) constataram que os hidrogéis de Carbopol[®] Ultrez 10 NF contendo nanoestruturas (nanocápsulas, nanoesferas e nanoemulsões) de propionato de clobetasol propiciaram a liberação controlada do fármaco. Nesse mesmo estudo, os autores relatam que os hidrogéis contendo as nanocápsulas e nanoesferas proporcionaram um maior controle da liberação do clobetasol que os hidrogéis contendo as nanoemulsões, atribuindo o ocorrido à presença do polímero (PCL).

A liberação do fármaco a partir dos sistemas nanoestruturados é influenciada por uma série de fatores. No caso das nanocápsulas poliméricas esse processo pode ser dependente da desorção do fármaco das partículas ou, ainda, da difusão do mesmo através da parede polimérica (SCHAFFAZICK et al., 2003). Estudos comprovam que a incorporação dos nanocarreadores em veículos semissólidos permite um controle ainda maior da velocidade de liberação do fármaco, uma vez que a substância necessita ser liberada da nanoestrutura para então difundir através do semissólido. Contri (2010) relatou que a associação de nanocápsulas de capsaicina a hidrogéis de quitosana promoveu um maior controle da liberação da mesma quando comparado às nanopartículas em suspensão aquosa. Este resultado foi associado à elevada viscosidade do hidrogel.

Por fim, o fato das formulações desenvolvidas neste trabalho apresentarem uma liberação controlada do tioconazol é bastante vantajoso por permitir que a ação terapêutica do fármaco seja sustentada ao longo do tempo, levando a uma redução no número aplicações e, conseqüentemente, a uma maior comodidade para o paciente.

3.3 Estabilidade dos hidrogéis

Após 30 dias de armazenamento a temperatura ambiente, as formulações foram avaliadas quanto ao aspecto, tamanho médio de partículas, índice de polidispersão, pH e teor de fármaco.

A análise macroscópica demonstrou que os hidrogéis contendo o fármaco livre (HG-TIO) e a nanoemulsão de OC (HG-NE_{OC}-TIO) apresentaram mudanças na coloração, passando de incolor para amarelo e de levemente amarelada para amarelo intenso, respectivamente. As demais formulações não apresentaram alterações quanto ao aspecto macroscópico.

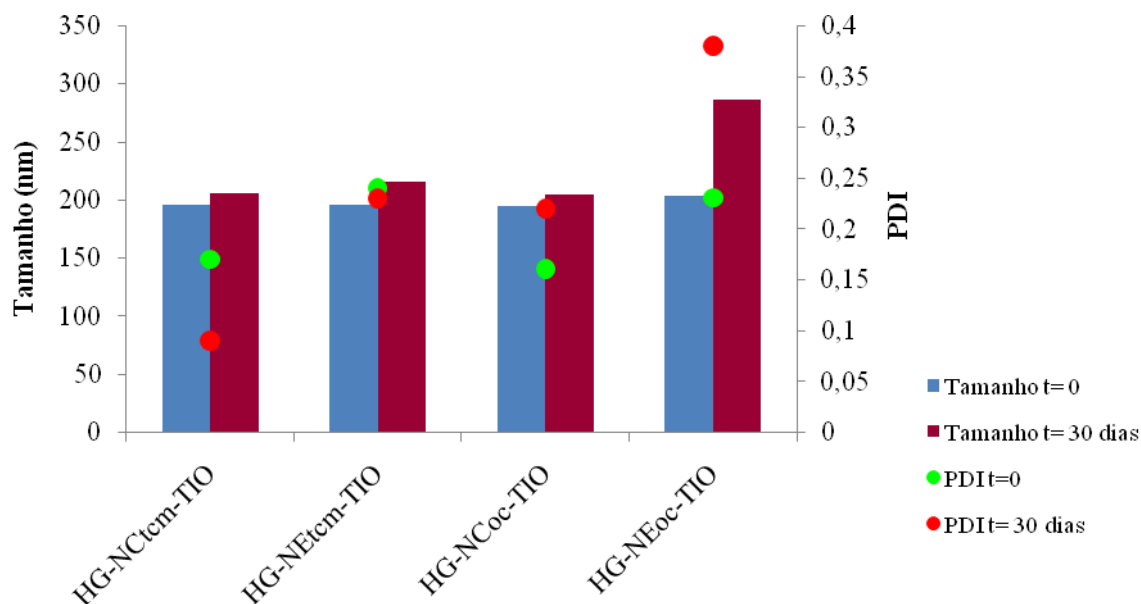


Figura 6: Avaliação do tamanho das partículas e do índice de polidispersão (PDI) dos hidrogéis contendo nanocápsulas de tioconazol com TCM (HG-NC_{TCM}-TIO) e OC (HG-NC_{OC}-TIO) e de nanoemulsões de tioconazol com TCM (HG-NE_{TCM}-TIO) e OC (HG-NE_{OC}-TIO) após preparação e 30 dias de armazenamento a temperatura ambiente.

A Figura 6 apresenta os resultados obtidos para o diâmetro médio das partículas e o índice de polidispersão após preparação (tempo zero) e 30 dias de armazenamento das formulações. Os resultados obtidos demonstraram que mudanças significativas não foram verificadas para as formulações em relação a estes parâmetros ($p > 0,05$), com exceção do hidrogel HG-NE_{OC}-TIO. Para esta formulação se verificou um aumento no tamanho (de $203,1 \pm 23,55$ nm para $286,17 \pm 4,22$ nm) e no índice de polidispersão (de $0,23 \pm 0,03$ para $0,38 \pm 0,02$) durante o tempo de estocagem ($p < 0,05$). O aumento nos valores de PDI indica uma menor uniformidade das partículas após o período de armazenamento e o aumento do tamanho pode ser decorrente da aglomeração das partículas.

Tabela 4: Determinação do pH e teor de tioconazol dos hidrogéis contendo nanocápsulas de tioconazol com TCM (HG-NC_{TCM}-TIO) e OC (HG-NC_{OC}-TIO), e de nanoemulsões contendo tioconazol com TCM (HG-NE_{TCM}-TIO) e OC (HG-NE_{OC}-TIO) após preparação e 30 dias de armazenamento a temperatura ambiente (n = 3, média ± desvio padrão)

Formulação	pH		Teor (mg/g)	
	t = 0	t = 30 dias	t = 0	t = 30 dias
HG-NC _{TCM} -TIO	6,30 ± 0,09	6,24 ± 0,04	0,99 ± 0,00	0,99 ± 0,01
HG-NE _{TCM} -TIO	6,48 ± 0,05	6,43 ± 0,03	1,01 ± 0,00	1,01 ± 0,01
HG-NC _{OC} -TIO	6,35 ± 0,03	6,32 ± 0,03	1,00 ± 0,01	1,01 ± 0,01
HG-NE _{OC} -TIO	6,45 ± 0,03	5,80 ± 0,11	1,00 ± 0,00	0,82 ± 0,01
HG-TIO	6,88 ± 0,18	5,65 ± 0,12	1,00 ± 0,01	0,84 ± 0,09

Os valores de pH e teor de fármaco encontram-se na Tabela 4. Em relação ao pH, uma redução significativa foi observada para os hidrogéis HG-NE_{OC}-TIO e HG-TIO ($p > 0,05$), variando de $6,45 \pm 0,03$ para $5,80 \pm 0,11$ e de $6,88 \pm 0,18$ para $5,65 \pm 0,12$, respectivamente. O monitoramento do pH em função do tempo fornece informações relevantes sobre a estabilidade das formulações nanoestruturadas (SCHAFFAZICK et al., 2003) e alterações nesse parâmetro podem indicar degradação dos componentes ou, ainda, difusão do fármaco para o meio aquoso (GUTERRES et al., 1995). As demais formulações (HG-NC_{TCM}-TIO, HG-NE_{TCM}-TIO e HG-NC_{OC}-TIO) mantiveram-se estáveis durante os 30 dias e alterações significativas não foram observadas em relação ao pH e teor de tioconazol; entretanto, uma queda no teor de 18 e 16 % foi observada para o HG-NE_{OC}-TIO e HG-TIO.

As alterações no aspecto, tamanho das partículas, índice de polidispersão, pH e teor de tioconazol observadas após o período de armazenamento para o hidrogel contendo a nanoemulsão com o OC (HG-NE_{OC}-TIO) podem estar relacionadas a uma provável degradação do óleo de café verde, ou de seus ácidos graxos, quando em contato com polímero formador de gel (Aristoflex[®] AVC). Esta instabilidade não foi observada para o hidrogel contendo as nanocápsulas (HG-NC_{OC}-TIO), provavelmente, devido à presença da parede polimérica entorno do óleo que impediu o contato direto do mesmo com os demais componentes da formulação, bem como o fármaco de sua degradação. Da mesma forma, o hidrogel contendo o fármaco livre (HG-TIO) também apresentou alterações nas características mencionadas anteriormente, indicando uma provável instabilidade do tioconazol neste veículo. Estas alterações não foram observadas nos hidrogéis preparados com as nanocápsulas

(contendo ambos os óleos) e com a nanoemulsão com TCM como núcleo oleoso, confirmando o potencial das nanoestruturas, especialmente das nanocápsulas, em manter a estabilidade do fármaco nas formulações em estudo.

4 CONCLUSÃO

Os hidrogéis contendo tioconazol associado à nanocápsulas e nanoemulsões apresentaram características físico-químicas satisfatórias: pH compatível com aplicação tópica, tamanho nanométrico, teor de tioconazol próximo ao teórico e comportamento plástico. O estudo de liberação *in vitro* demonstrou a importância dos sistemas coloidais em controlar a liberação do tioconazol. O maior controle da liberação foi verificado para os hidrogéis contendo as nanocápsulas, independente do tipo de óleo (TCM ou café verde) empregado. Além disso, estas formulações mantiveram-se estáveis por 30 dias à temperatura ambiente, demonstrando a importância da presença da parede polimérica nas nanocápsulas em preservar as características das formulações e manter o teor de fármaco.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, J.S.; BENVENÚ, D.M.; BOUFLEUR, N.; RECKZIEGEL, P.; BARCELOS, R.C; CORADINI, K.; DE CARVALHO, L.M.; BÜRGER, M.E.; BECK, R.C. Hydrogels containing rutin intended for cutaneous administration: efficacy in wound healing in rats. **Drug development and industrial pharmacy**, v. 38, n.7, p. 792-799, 2012.

ALVAREZ-ROMÁN, R.; NAIK, A.; KALIA, Y.N.; GUY, R.H.; FESSI, H. Enhancement of Topical Delivery from Biodegradable Nanoparticles. **Pharmaceutical Research**, v. 21, n. 10, p. 1818-1825, 2004.

ALVES, M. P.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Semisolid topical formulations containing nimesulide-loaded nanocapsules, nanospheres or nanoemulsion: development and rheological characterization. **Pharmazie**, n. 60, p. 900-904, 2005.

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

AULTON, M.E. Delineamento de formas farmacêuticas. 2º edição, Editora Artmed Porto Alegre, 2005.

BOOULMEDARAT, L.; GROSSIORD, J.L.; FATTAL, E.; BOCHOT, A. Influence of methyl- β -cyclodextrin and liposomes on rheological properties of Carbopol[®] 974 NF gels. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 254, p. 59-64, 2003.

BORGHETTI, G. S.; KNORST, M. T. Desenvolvimento e avaliação da estabilidade física de loções O/A contendo filtros solares. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêutica**, v. 42, p. 531–537, 2006.

BOUCHEMAL, K.; BRIANÇON, S.; PIERRER, E.; FESSI, H. Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimization. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 2080, p. 241-251, 2004.

BRASIL. Resolução – RE nº 899 de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 02 de junho de 2003.

CAMPANHA, A.M.; TASCA, R.S; SVIDZINSKI, T.I.E. Dermatomicoses: Frequência, Diagnóstico Laboratorial e Adesão de Pacientes ao Tratamento em um Sistema Público de Saúde, Maringá-PR, Brasil. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, n. 3, p. 442-448, 2007.

CONTRI, R.V. Incorporação de nanocápsulas contendo capsaicinóides em hidrogel de quitosana destinado ao uso tópico: caracterização das formulações e estudo de liberação *in vitro*. 2010. 97f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

DOOMS-GOOSSENS, A.; MATURA, M.; DRIEGH, J.; DEGREEF, H. Contact allergy to imidazoles used as antimycotic agents. **Contact Dermatitis**, v. 33, n. 2, p. 73-77, 1995.

FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J-Ph.; AMMOURY, N.; BENITA, S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutics**, v.55, n.1, p. R1-R4, 1989.

FONTANA, M. C.; CORADINI, K.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R.; BECK, R. C. R. Nanocapsules prepared from amorphous polyesters: Effect on the physicochemical characteristics, drug release and photostability. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 10, p. 3091–3099, 2010.

FONTANA, M.C.; REZER, J.F.P.; CORADINI, K.; LEAL, D.B.R.; BECK, R.C.R., Improved efficacy in the treatment of contact dermatitis in rats by a dermatological nanomedicine containing clobetasol propionate. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 79, p. 241-249, 2011.

GARG, A.; AGGARWAL, D.; GARG, S.; SINGLA, A. Spreading of semisolid formulations. **Pharmaceutical Technology**, v. 26, p. 84-105, 2002.

GUTERRES, S. S.; FESSI, H.; BARRATT, G.; DEVISSAGUET, J-PH.; PUISIEUX, F. Poly (DL-lactide) nanocapsules containing diclofenac: I. Formulation and stability study. **International Journal of Pharmaceutics**, v.113, p.57-63, 1995.

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

HAMIDI, M.; AZADI, A.; RAFIEL. Hydrogel nanoparticles in drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, p. 1638-1649, 2008.

Internacional Conference on Harmonization (ICH), Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, Q2 (R1), 2005.

JIMÉNEZ, M. M.; PELLETIER, J.; BOBIN, M. F.; MARTINI, M. C. Influence of encapsulation on the in vitro percutaneous absorption of octyl methoxycinnamate. **International Journal of Pharmaceutical**, v. 272, p. 45-55, 2004.

JONES, R. N.; BALE, M. J.; HOBAN, D.; ERWIM, M. E. In vitro antimicrobial activity of tioconazole and its concentrations in vaginal fluids following topical (vagistat-1 16.5%) application. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 17, n. 1, p. 45-51, 1993.

KIM, J.; SONG, J.; LEE, E.; PARK, S. Rheological properties and microstructures of Carbopol gel network system. **Colloid and Polymer Science**, v.281, p.614-623, 2003.

KIM, M. K.; CHOI, S. Y.; BYUN, H. J.; HUH, C. H.; PARK, K. C.; PATEL, R. A.; SHINN, A. H.; YOUN, S. W. Evaluation of gender difference in skin type and pH. **Journal of Dermatological Science**, v. 41, p. 153-156, 2006.

LACHMAN, L.; DeLUCA, P.; AKERS, M. J. Testes de estabilidade e fundamentos de cinética química. In: LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H. A.; KANIG, J. L. **Teoria e prática na indústria farmacêutica**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, v.2, 2001.

LADERMANN, J.; RICHTER, H.; TEICHMANN, A.; OTBERG, N.; BLUME-PEYTAVI, U.; LUENGO, J.; WEIß, B.; SCHAEFER, U. F.; LEHR, C. M.; WEPF, R.; STERRY, W. Nanoparticles – An efficient carrier for drug delivery into the hair follicles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, n. 66, p. 159-164, 2007.

MACHADO, A. Uso tópico de antimicrobianos. In: BARROS, E. et al. **Antimicrobianos: Consulta rápida**. 4. ed. Porto Alegre: Artemed, 2008. cap. 7, p. 106.

MAMBRO, V.M.D.; BORIN, M.F.; FONSECA, M.J.V. Topical formulations with superoxide dismutase: influence of formulation composition on physical stability and enzymatic activity. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 32, p. 97, 2003.

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

MARTINEZ-ROSSI, N.M.; PERES, N.T.A.; ROSSI, A. Antifungal Resistance Mechanisms in Dermatophytes. **Mycopathologia**, v. 166, p. 369-383, 2008.

MILAN, A. L. K.; MILÃO, D.; SOUTO, A. A. CORTE, T. W. F. Estudo da hidratação da pele por emulsões cosméticas para xerose e sua estabilidade por reologia. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, p. 649-657, 2007.

MILÃO, D.; KNORST, M.; RICHTER, W.; GUTERRES, S. S. Hydrophilic gel containing nanocapsules of diclofenac: development, stability study and physico-chemical characterization. **Pharmazie**, v. 58, p. 325-329, 2003.

MUÑOZ, A.J.C.; TUR-TUR, C.; MOLINA, J.M.H.; SANTOS, P.; CÁRDENES, D.; GIUSIANO, G. Antifúngicos disponibles para el tratamiento de lãs micosis ungueales. **Revista Iberoamericana Micología**, v. 27, n. 2, p. 49-56, 2010.

MURDAN, S. Drug delivery to the nail following topical application. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 236, p. 1- 26, 2002.

OLIVEIRA, Ângela Zélia Moreira de. Desenvolvimento de formulações cosméticas com ácido hialurônico. 2009. 100f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Farmacêutica) – Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, 2009.

OURIQUE, A. F. et al. Improved photostability and reduced skin permeation of tretinoin: development of a semisolid nanomedicine. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 79, n. 1, p. 95-101, 2011.

PAESE, K., JÄGER A., POLETTO F. S., FONSECA E. P., ROSSI-BERGMANN B., POHLMANN, A. R., GUTERRES S. S. Semisolid Formulation Containing a Nanoencapsulated Sunscreen: Effectiveness, In Vitro Photostability and Immune Response. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, 5, 240-246, 2009.

PAVELIC, Z.; SKALKO-BASNET, N.; SHUBERT, R. Liposomal gels for vaginal drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 219, p. 139-149, 2001.

REPKA, M., A.; MIDIDODDI, P.K.; STODGHILL, S., P. Influence of human nail etching for the assessment of topical onychomycosis therapies. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 282, p. 95-106, 2004.

SAVIAN, A.L. Desenvolvimento de nanocápsulas contendo ditranol e sua incorporação em formulação semissólida de base aquosa. 2012. 114f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2012.

SCHAFFAZICK, S. R.; POHLMANN, A. R.; FREITAS, L. L., GUTERRES, S. S. Caracterização e estudo de estabilidade de suspensões de nanocápsulas e de nanoesferas poliméricas contendo diclofenaco. **Acta Farmacêutica Bonaerense**, v. 21, n. 2, p. 99-106, 2002.

SCHAFFAZICK, S. R.; FREITAS, L. L.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 726-737, 2003.

SCHÄFER-KORTING, M.; MEHNERT, W.; KORTING, H. Lipid nanoparticles for improved topical application of drugs for skin diseases. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, p. 427–443, 2007.

SHAW, J.W; JOISH, V. N., COONS, S.J. Onychomycosis: health-related quality of life considerations. **Pharmacoeconomics**, v. 20, n. 1, p. 23-26, 2002.

SIDRIM, J.J.C; ROCHA, M.F.G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara & Koogan S.A., 2004.

SINKO, P. J. Chemical Kinetics and Stability. In: P. J. Sinko, Ed. Martín's. **Physical Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**. Lippincott William & Wilkins, Baltimore, p. 396-434, 2006.

SOUTO, E.B.; MÜLLER, R.H. The use of SLN and NLC as topical particulate carriers for imidazole antifungal agents. **Pharmazie**, v. 61, n. 5, p. 431-437, 2006.

SWEETMAN, S.C. **Martindale - Guia Completa de Consulta Fármaco-Terapêutica**. 2 Ed. Barcelona: Pharma Editores, S.L., 2006. p. 588.

TABORDA, M.L; WEBER, M.B.; TEIXEIRA, K.A.M.; LISBOA. A.P.; WELTER, E.Q. Avaliação da qualidade de vida e do sofrimento psíquico de pacientes com diferentes dermatoses em um centro de referência em dermatologia no sul do país. **Anais Brasileiros Dermatologia**, v. 85, n. 1, p. 52-56, 2010.

ZANIN, S. M. W.; MIGUEL, M. D.; CHIMELLI, M.; DALMAZ, A. C. Parâmetros físicos no estudo da estabilidade das emulsões. **Revista Visão Acadêmica**, v.2, n.2, p.47-58, 2001.

DISCUSSÃO GERAL

O tratamento de micoses superficiais, por vezes, pode ser um grande desafio, devido à ineficácia ou resistência dos medicamentos disponíveis, a necessidade de tratamentos prolongados, a manifestação de efeitos colaterais e ao alto custo dos medicamentos (ALMEIDA et al., 2009a). O tioconazol é um fármaco antifúngico pertencente à classe dos imidazóis, utilizado no tratamento tópico de infecções cutâneas e de unhas como dermatofitoses, candidíases mucocutâneas e pitiríase versicolor (SWEETMAN, 2006). Apesar de sua eficácia e seu amplo espectro de ação, alguns problemas são enfrentados na terapêutica com este fármaco, como o aparecimento de algumas reações adversas (coceira, descamação da pele, edema, irritação local, ardor e prurido) e, ainda, relacionados ao uso vaginal, dor durante o ato sexual, dor e queimação vaginal (SWEETMAN, 2006). Estes efeitos indesejados podem ser decorrentes da necessidade de altas concentrações do fármaco para obtenção da ação desejada, uma vez que a absorção do fármaco é limitada (MUÑOZ et al., 2010).

Com o intuito de contornar as dificuldades encontradas no tratamento com o tioconazol, este trabalho foi delineado com o propósito de incorporar este fármaco em nanoemulsões e nanocápsulas poliméricas. Devido ao tamanho reduzido de partícula ($< 1 \mu\text{m}$), estes sistemas atuam como carreadores de fármacos, distribuindo-se em locais específicos e, conseqüentemente, aumentando sua eficácia (RAWAT; SINGH; SARAF, 2006). Além disso, as nanoestruturas são capazes de controlar a liberação das substâncias ativas (KUMARI; YADAV; YADAV, 2010), reduzir efeitos adversos por diminuírem o contato direto do ativo com a região alvo (CASTRO et al., 2009), diminuir a frequência das aplicações por aumentarem o tempo de permanência no local de ação (NIMESH et al., 2006), bem como proteger o fármaco de degradações (FONTANA et al., 2009).

Diferentes técnicas são utilizadas para caracterizar e avaliar os sistemas nanoestruturados, sendo fundamental a determinação do teor de fármaco incorporado a eles. A partir disto, no Capítulo 1 foi relatada a validação de uma metodologia analítica utilizando a cromatografia líquida com detecção UV para quantificação do tioconazol nas nanoestruturas, uma vez que os métodos encontrados na literatura científica para quantificação deste derivado imidazólico, não são específicos para os sistemas nanoestruturados (BERRIDGE; LAST; PLATT, 1985; PIETRA et al., 1992; GAGLIARDI et al., 2003; Farmacopéia Britânica, 2010). Além disso, buscamos utilizar um sistema eluente menos complexo que os já relatados e que não empregasse solução tampão em sua

composição, a fim de prolongar a vida útil do equipamento e da coluna cromatográfica. Após alguns testes, a fase móvel escolhida foi uma solução de metanol:água (80:20) acrescida de 0,18% de hidróxido de amônia. O fluxo empregado foi de 1,0 mL/min e o fármaco foi detectado em 219 nm. O método demonstrou ser específico, ou seja, não foi observada interferência dos excipientes e/ou solventes na quantificação do tioconazol e os picos foram puros; linear na faixa de concentração de 5 a 50 µg/mL; preciso, exato e robusto.

Após o desenvolvimento da metodologia analítica, no Capítulo 2, foram preparadas e caracterizadas nanoemulsões e nanocápsulas de PCL contendo tioconazol (1,0 mg/mL), utilizando dois tipos de óleos como núcleo oleoso (triglicerídeos de cadeia média e óleo de café verde). Os triglicerídeos de cadeia média são amplamente utilizados no desenvolvimento de nanoestruturas, por solubilizarem diversos tipos de fármacos e por serem biocompatíveis (MORA-HUERTAS et al., 2010); no entanto, pela primeira vez o óleo de café verde é utilizado na preparação dos nanocarreadores estudados. Dentre as propriedades do óleo de café verde destacam-se: a capacidade de evitar a desidratação e restaurar a barreira cutânea, por auxiliar na regeneração dos lipídeos da camada córnea (PEREDA et al., 2006), o efeito fotoprotetor (PELLE; ANDERSON, 1999), a ação antioxidante (SAVIAN et al., 2011), ser renovador e possuir efeito emoliente superior a dos óleos comuns (ATHAR; NASIR, 2005). Cabe salientar que para a formação e estabilização das nanocápsulas poliméricas, é fundamental que o óleo não dissolva o polímero (GUTERRES et al., 2000); portanto, a viabilidade da preparação das nanocápsulas de PCL utilizando com núcleo oleoso o óleo de café verde, foi verificada através do teste de inchamento/dissolução do polímero. Filmes de PCL foram completamente imersos no óleo de café verde durante 30 dias, não sendo observadas mudanças na massa dos filmes poliméricos ($p < 0,05$). A partir deste resultado foi possível constatar que não houve interação entre os dois componentes, assegurando que a parede polimérica das nanocápsulas não será dissolvida ou desestruturada pelo óleo durante o armazenamento.

Após a preparação, as formulações foram caracterizadas em relação ao teor de tioconazol, eficiência de encapsulamento, pH, diâmetro médio das partículas, índice de polidispersão, potencial zeta e estabilidade. No estudo da estabilidade, as formulações foram avaliadas imediatamente após a preparação e após 30 dias de armazenamento à temperatura ambiente. Todas as formulações apresentaram características macroscópicas favoráveis, apresentando-se como um líquido leitoso, homogêneo e com reflexo azulado (efeito *Tyndall*), este devido ao movimento browniano das nanoestruturas (SCHAFFAZICK et al., 2003). Quanto à cor, as formulações com triglicerídeos de cadeia média apresentaram coloração

branca e as com óleo de café verde apresentaram coloração amarela clara, característica do óleo. As formulações apresentaram partículas com tamanho nanométrico (150 – 200 nm) e homogêneas (PDI abaixo de 0,15), pH ácido (5,5 a 6,3), potencial zeta negativo (-3,5 a -11,3 mV), teor de fármaco próximo ao teórico (1,0 mg/mL) e eficiência de encapsulamento próxima a 100%. Estes resultados corroboram com outros encontrados na literatura para estes sistemas, de acordo com as metodologias empregadas (OURIQUE et al., 2008; ALMEIDA et al., 2009b; FONTANA et al., 2009). O tamanho das partículas foi influenciado pela presença do polímero e pela adição do fármaco, uma vez que nanocápsulas apresentaram tamanho de partícula maior que as nanoemulsões e as nanoestruturas brancas (sem o fármaco) apresentaram diâmetro menor que as contendo o fármaco, assim como observado por Flores e colaboradores (2011) e Schaffazick e colaboradores (2002), respectivamente. Como citado anteriormente, as formulações apresentaram potencial zeta negativo o que pode ser justificado pela presença dos grupamentos carboxílicos terminais da estrutura da PCL e pelo efeito estérico causado pelo polissorbato 80 (CATTANI et al., 2010). Cabe salientar que uma redução no potencial zeta foi observada após a incorporação do tioconazol nos sistemas nanoestruturados, o que poderia indicar uma redução na estabilidade (LEGRAND et al., 1999). Quanto ao pH, as nanocápsulas apresentaram valores mais baixo devido a presença da PCL, que por possuir grupos ácidos carboxílicos terminais em sua estrutura leva a valores de pH mais baixos (SCHAFFAZICK et al., 2002) e a adição do fármaco promoveu um pequeno aumento no pH das nanoestruturas, provavelmente devido as características do tioconazol. Cabe ainda ressaltar que não foram observadas diferenças significativas nas características físico-químicas dos sistemas em relação aos óleos empregados.

Após 30 dias de armazenamento a temperatura ambiente e ao abrigo da luz, as formulações mantiveram suas características macroscópicas iniciais, sem precipitação e alterações de cor ou aspecto. Com exceção dos valores de pH, nenhuma alteração foi observada nas características físico-químicas das formulações após o período de armazenamento. Todas as amostras apresentaram redução nos valores de pH, que pode ser explicada pela hidrólise dos triglicerídeos presentes nos óleos utilizados ou, ainda, no caso das nanocápsulas, pela degradação do polímero (CALVO et al., 1996) ou pelo relaxamento das cadeias da PCL expondo seus grupamentos ácidos (SCHAFFAZICK et al., 2002). É importante ressaltar que esta diminuição já foi relatada em outros estudos encontrados na literatura (ALMEIDA et al., 2009; FONTANA et al., 2009; FLORES et al., 2011).

Além da caracterização físico-química, o estudo da proteção do tioconazol associado às nanoestruturas frente à luz UVC foi, também, realizado. Os resultados obtidos

evidenciaram o potencial dos sistemas nanoestruturados em proteger o fármaco da luz, uma vez que, um tempo de 15 e 22 horas foi necessário para degradar, aproximadamente, 50% do tioconazol quando associado às nanoestruturas com TCM e OC, respectivamente, enquanto que para a solução metanólica (fármaco livre) este percentual de degradação foi evidenciado em 4 horas de exposição. Vários estudos relatam a eficiência das nanoestruturas em proteger os fármacos da luz, como exemplo, pode-se citar o estudo realizado por Santos e colaboradores (2013), no qual o nanoencapsulamento do clotrimazol promoveu um aumento na estabilidade do fármaco frente à luz UVC. As nanocápsulas poliméricas apresentaram um maior tempo de meia vida que as nanoemulsões ($p < 0,05$), podendo ser atribuída esta maior proteção à presença da parede polimérica (PCL) que possui a capacidade de refletir e espalhar a radiação UV (JIMÉNEZ et al., 2004). O OC promoveu um aumento na fotoestabilidade do tioconazol, uma vez que, o $t_{1/2}$ para as nanocápsulas com o mesmo foi de 22 horas e para as nanocápsulas com TCM foi de 14 horas, o que pode ser justificado pela ação antioxidante e o efeito fotoprotetor do OC relatada em alguns estudos (ALVAREZ, RODRIGUES, 2000; SAVIAN et al., 2011).

A avaliação da atividade antifúngica foi realizada pelo método de difusão em ágar frente às leveduras de *C. albicans*; *C. glabrata*, e isolado clínico de *C. albicans*. As suspensões de nanocápsulas e nanoemulsões contendo tioconazol apresentaram ação frente a todas as leveduras testadas. Uma pequena diminuição dos halos de inibição foi verificada para as nanoemulsões e nanocápsulas em relação à solução do fármaco livre; no entanto, este decaimento foi inferior a 7%, podendo considerar este resultado satisfatório no que se refere à manutenção da atividade antifúngica do tioconazol. Este resultado pode ser um indicativo do controle da liberação do tioconazol promovido pelos sistemas nanoestruturados, onde provavelmente concentrações menores do fármaco estejam disponíveis para agir frente às leveduras. Comparando os sistemas nanoestruturados, foi possível observar que as nanocápsulas apresentaram halos de inibição um pouco menores que as nanoemulsões, o que pode estar relacionado com a presença da parede polimérica, que proporciona uma liberação gradual do ativo (FLORES et al., 2013).

Com o objetivo de obter uma forma farmacêutica final, as nanoemulsões e suspensões de nanocápsulas foram incorporadas em hidrogéis de Aristoflex[®] AVC (Capítulo 3). Para fins comparativos, hidrogéis contendo o fármaco livre também foram preparados. A incorporação do tioconazol em hidrogéis é inovadora, uma vez que devido às características lipofílicas do fármaco as formulações disponíveis no mercado são pomadas e cremes. Além disso, os hidrogéis são uma forma farmacêutica muito bem aceita pelo consumidor, pois ao contrário

das bases lipofílicas, não deixam resíduos na pele, são facilmente laváveis, não mancham as roupas, são refrescantes e de secagem rápida.

Os hidrogéis foram caracterizados quanto ao aspecto macroscópico, tamanho de partículas, índice de polidispersão, pH, teor, espalhabilidade, viscosidade e estabilidade. Todos os hidrogéis apresentaram características organolépticas satisfatórias, aspecto brilhante e homogêneo. Quanto à coloração, os hidrogéis contendo as nanoestruturas com TCM e OC apresentaram coloração branca e levemente amarelada (devido à cor do óleo de café verde), respectivamente, e os hidrogéis com o fármaco livre apresentaram-se incolores. O pH das formulações contendo os sistemas nanoestruturados foi compatível com a aplicação cutânea, apresentando valores na faixa de 6,30 a 6,48. Assim como nas dispersões coloidais, as formulações contendo as nanoemulsões apresentaram valores de pH mais elevados que o das formulações contendo as nanocápsulas e o tipo de óleo não interferiu nesse parâmetro. Devido as características básicas do tioconazol, os hidrogéis contendo o fármaco livre apresentaram pH mais elevado que os hidrogéis contendo os sistemas nanoestruturados. No que diz respeito ao teor, todas as formulações apresentaram valores próximos ao teórico (0,99 a 1,01 mg/g). As formulações contendo as nanoestruturas apresentaram tamanho nanométrico (196 – 203 nm) e índice de polidispersão menor que 0,25, indicando a uniformidade do sistema. Comparando os resultados obtidos para o tamanho das nanoemulsões e suspensões de nanocápsulas originais e o tamanho obtido para cada sistema após a incorporação aos hidrogéis, foi possível constatar que não houve diferença significativa entre os valores ($p > 0,05$), indicando a presença das nanoestruturas após sua incorporação nos hidrogéis.

Em relação às características reológicas, todos os hidrogéis apresentaram comportamento de fluxo não-newtoniano com propriedades plásticas, ajustado ao modelo de Casson, como também foi observado por Pavelic e colaboradores (2001) ao analisarem hidrogéis de Carbopol[®] 980 NF contendo lipossomas de calceína e por Savian (2012) ao analisar hidrogéis de Aristoflex[®] AVC contendo nanocápsulas de antralina. O modelo de Casson é caracterizado por apresentar uma tensão de cisalhamento inicial para iniciar o fluxo das camadas moleculares (LACHMAN et al., 2001). A incorporação dos sistemas nanoestruturados não alterou significativamente a viscosidade e os valores de cedência (96 a 190 Pa) das formulações, corroborando com os resultados obtidos por Almeida e colaboradores (2012). Os perfis de espalhabilidade das formulações foram semelhantes e diferenças significativas não foram observadas no fator de espalhabilidade dos hidrogéis, como também verificado por Alves e colaboradores (2005).

A estabilidade dos hidrogéis foi avaliada após 30 dias de armazenamento à temperatura ambiente, em relação ao aspecto, tamanho médio de partículas, índice de polidispersão, pH e teor de fármaco. Os hidrogéis contendo as nanoemulsões de OC e os hidrogéis contendo o fármaco livre apresentaram mudanças na coloração, passando de levemente amarelada para amarelo intenso e de incolor para amarelo, respectivamente (Figura 1); nos valores de pH ($6,45 \pm 0,03$ para $5,80 \pm 0,11$ e de $6,88 \pm 0,18$ para $5,65 \pm 0,12$, respectivamente) e no teor de tioconazol, verificando-se uma queda de 18 e 16%, respectivamente, em relação ao conteúdo inicial. Um aumento no tamanho (de $203,1 \pm 23,55$ nm para $286,17 \pm 4,22$ nm) e no índice de polidispersão ($0,23 \pm 0,03$ para $0,38 \pm 0,02$) dos hidrogéis contendo as nanoemulsões de OC foi, também, observado. Essas alterações indicam a instabilidade destas duas formulações frente ao armazenamento, provavelmente devido a uma possível degradação do óleo de café verde e do fármaco. No entanto, as demais formulações não apresentaram alterações quanto ao aspecto macroscópico (Figura 1), teor, tamanho de partículas, índice de polidispersão e pH, indicando a estabilidade dos hidrogéis após 30 dias de armazenamento à temperatura ambiente.

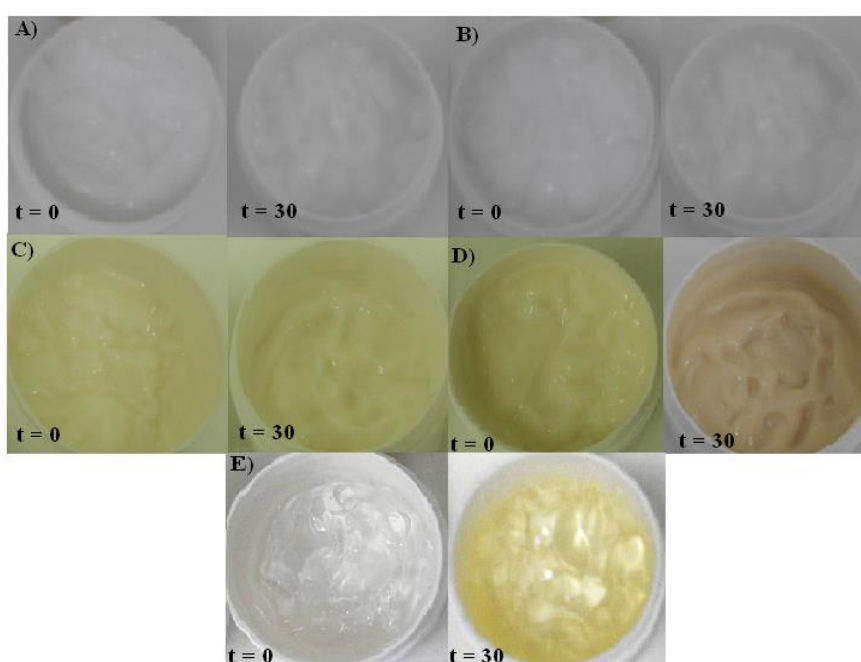


Figura 1: Fotografia dos hidrogéis contendo nanocápsulas e nanoemulsões de tioconazol com TCM (A e B, respectivamente), nanocápsulas e nanoemulsões de tioconazol com OC (C e D, respectivamente) e hidrogel contendo tioconazol livre (E), no tempo zero (após preparação) e após 30 dias de armazenamento à temperatura ambiente.

O perfil de liberação *in vitro* do fármaco a partir dos hidrogéis foi avaliado utilizando célula de difusão do tipo Franz. Os resultados obtidos demonstraram um controle na liberação

do tioconazol a partir dos hidrogéis contendo as nanoestruturas quando comparado ao hidrogel contendo o fármaco livre, uma vez que, ao final de oito horas de ensaio, menos de 19% do fármaco contido nas nanoestruturas havia sido liberado, enquanto que o hidrogel contendo o fármaco livre liberou 39% do fármaco. A modelagem matemática dos resultados seguiu modelo de Higuchi e os resultados obtidos para as constantes de velocidade (k) demonstraram que os hidrogéis contendo as nanocápsulas propiciaram uma liberação ainda mais lenta do fármaco ($p < 0,05$), o que pode ser atribuído a presença da parede polimérica. Estes resultados corroboram com outros descritos na literatura nos quais é relatada a eficiência dos sistemas nanoestruturados em controlar a liberação de fármacos (MARCHIORI et al., 2010; FONTANA et al., 2011). Cabe salientar que os tipos de óleos (TCM e OC) não influenciaram na liberação do fármaco, o que pode ser justificado por uma provável semelhança na viscosidade dos mesmos.

O conjunto de todos os resultados obtidos neste trabalho demonstra a possibilidade da preparação de nanoemulsões e nanocápsulas poliméricas contendo tioconazol e sua incorporação em hidrogéis. Os hidrogéis contendo as nanocápsulas poliméricas (com ambos os óleos) e as nanoemulsões com TCM apresentaram características satisfatórias, sendo, portanto, uma alternativa viável para o tratamento de doenças fúngicas superficiais. Como perspectivas para a continuidade deste trabalho pode-se citar a avaliação da permeação cutânea do tioconazol a partir dos sistemas desenvolvidos e o desenvolvimento de ensaios biológicos que comprovem a atividade farmacológica do fármaco após a incorporação nas nanoestruturas, bem como que avaliem o potencial dos sistemas nanoestruturados em reduzir a irritação dérmica provocada pelo fármaco.

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

- No presente trabalho, um método analítico por cromatografia líquida com detecção UV foi validado para a quantificação do tioconazol associado à nanoemulsões e nanocápsulas poliméricas, o qual permitiu a análise rápida, confiável e simples do fármaco, mostrando-se específico, linear, preciso, exato e robusto.
- Nanoemulsões e nanocápsulas de PCL contendo tioconazol foram preparadas empregando-se dois tipos de óleos: triglicerídeos de cadeia média e o óleo de café verde, as quais apresentaram características físico-químicas adequadas (partículas com tamanho nanométrico e homogeneidade adequada, potencial zeta negativo, pH ácido, teor de fármaco próximo ao teórico e eficiência de encapsulamento próxima a 100%) e foram estáveis por um período de 30 dias frente ao armazenamento à temperatura ambiente.
- O ensaio de fotoestabilidade demonstrou que as nanoestruturas promoveram uma menor degradação do tioconazol frente à luz UVC comparando com o fármaco não encapsulado, sendo que as nanocápsulas foram mais eficientes que as nanoemulsões. Além disso, as formulações com óleo de café verde apresentaram maior estabilidade frente à luz.
- As nanoestruturas contendo tioconazol apresentaram atividade antifúngica frente a *C. albicans*, *C. glabrata* e isolado clínico de *C. albicans*.
- Hidrogéis de Aristoflex[®] AVC contendo as nanoemulsões e suspensões de nanocápsulas poliméricas foram desenvolvidos e apresentaram características apropriadas e adequadas para administração tópica.
- Com exceção das formulações contendo as nanoemulsões preparadas com o óleo de café verde e o fármaco livre, os hidrogéis mantiveram-se estáveis durante 30 dias de armazenamento à temperatura ambiente.
- O estudo de liberação *in vitro* demonstrou que os sistemas nanoestruturados são capazes de controlar a liberação do tioconazol e um maior controle da liberação foi observado para os hidrogéis contendo as nanocápsulas, independente do tipo de óleo utilizado.
- As suspensões de nanocápsulas poliméricas e nanoemulsões contendo tioconazol e seus respectivos hidrogéis são formulações de base nanotecnológica apresentando-se como uma alternativa viável para o tratamento de micoses superficiais, por promoverem o encapsulamento do fármaco, evitando o contato direto do ativo com a pele e promovendo uma liberação controlada do mesmo, sem perder sua ação antifúngica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, Z.; PANDEY, R.; SHARMA, S.; KHULLER, G. K. Novel chemotherapy for tuberculosis: chemotherapeutic potential of econazole- and moxifloxacin-loaded PLG nanoparticles. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 31, p. 142–146, 2008.

ALBERT, S.F.; WEIS, Z.H. Management of onychomycosis with topical. **Clinics in Podiatric Medicine and Surgery**, v. 21, p. 605-615, 2004.

ALMEIDA, L.M.M.; SOUZA, E.A.F.; BIANCHIN, D.B.; SVIDZINSKI, T.I.E. Resposta *in vitro* de fungos agentes de micoses cutâneas frente aos antifúngicos sistêmicos mais utilizados na dermatologia. **Anais Brasileiros de Dermatologia**

ALMEIDA, J.S.; JEZUR, L.; FONTANA, M.C.; PEASE, K.; SILVA, C.B.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S.; BECK, R.C.R. Oil-based nanoparticles containing alternative vegetable oils (grape seed oil and almond kernel oil): preparation and characterization. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 28, p. 165-172, 2009b.

ALMEIDA, J.S.; BENVENÚ, D.M.; BOUFLEUR, N.; RECKZIEGEL, P.; BARCELOS, R.C.; CORADINI, K.; DE CARVALHO, L.M.; BÜRGER, M.E.; BECK, R.C. Hydrogels containing rutin intended for cutaneous administration: efficacy in wound healing in rats. **Drug development and industrial pharmacy**, v. 38, n.7, p. 792-799, 2012.

ALONSO, M. J. Nanomedicines for overcoming biological barriers. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 58, p. 168-172, 2004.

ALVAREZ, A.M.R. & RODRÍGUEZ, M.L.G. Lipids in pharmaceutical and cosmetic preparations. **Grasas y aceites**. v. 51, n.1-2, p.74-96, 2000.

ALVES, M. P.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Semisolid topical formulations containing nimesulide-loaded nanocapsules, nanospheres or nanoemulsion: development and rheological characterization. **Pharmazie**, n. 60, p. 900-904, 2005.

ALVES, M.P.; SCARRONE, A.L.; SANTOS, M.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S. Human skin penetration and distribution of nimesulide from hydrophilic gels containing nanocarriers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 341, n. 1-2, p. 215-220, 2007.

ANTON, N.; BENOIT, J. P.; SAULNIER, P. Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates – a review. **Journal of Controlled Release**, v. 128, p. 185-199, 2008.

AMARAL, A.C.; BOCCA, A.L.; RIBEIRO, A.M.; NUNES, J.; PEIXOTO, D.L.G.; SIMIONI, A.R.; PRIMO, F.L.; LACAVAL, Z.G.M.; BENTES, R.; TITZE-de-ALMEIDA, R.; TEDESCO, A.C.; MORAIS, P.C.; FELIPE, M.S.S. Amphotericin B in poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) and dimercaptosuccinic acid (DMSA) nanoparticles against paracoccidioidomycosis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 63, p. 526–533, 2009.

ARGAWAL, R.; KATARE, O. P. Preparation and in vitro evaluation of miconazole nitrate-loaded topical liposomes. **Pharmaceutical Technology**, p. 48-60, 2002.

ASSIS, D. N.; MOSQUEIRA, V. C. F.; VILELA, J. M. C.; ANDRADE, M. S.; CARDOSO, V. N. Release profiles and morphological characterization by atomic force microscopy and photon correlation spectroscopy of ^{99m}Techetium-fluconazole nanocapsules. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 349, p. 152–160, 2008.

ATHAR, M. & NASIR, S.M. Taxonomic perspective of plant species yielding vegetable oils used in cosmetics and skin care products. **Afr. J. Biotechnol.** v.4, n.1, p. 36-44, 2005.

ATTAMA, A. A.; AYOGU, I. J.; KENECHUKWU, F. C.; OGBONNA, J. D. N.; OKORE, V. C. A new lipid based drug delivery system (LBDDS) for oral delivery of tioconazole. **International Journal of Drug Delivery**, v. 3, p. 743-753, 2011.

BARAN, R.; KAOUKHOV, A. Topical antifungal drugs for the treatment of onychomycosis: an overview of current strategies for monotherapy and combination therapy. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 19, p. 21-29, 2005.

BECK, R. C. R.; HASS, S. E.; GUTERRES, S. S.; RÉ, M. I.; BENVENUTTI, E. V.; POHLMANN, A.R. Nanoparticle-coated organic-inorganic microparticles: Experimental design and gastrointestinal tolerance evaluation. **Química Nova**, v. 29, n. 5, p. 990-996, 2006.

BECK, R. C. R.; POHLMANN, A. R.; HOFFMEISTER, C.; GALLAS, M. R.; COLLNOT, E.; SCHAEFER, U. F.; GUTERRES, S. S.; LEHR, C. M. Dexamethasone-loaded nanoparticle-coated microparticles: correlation between *in vitro* drug release and drug transport across caco-2 cell monolayers. **European Journal of Pharmaceutics and Bioharmaceutics**, v. 67, p. 18-30, 2007.

BEGGS, W.H. Fungicidal activity of tioconazole in relation to growth phase of *Candida albicans* and *Candida parapsilosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 26, n. 5, p. 699-701, 1984.

BENNET, J.E. Fármacos Antimicrobianos. In: **Goodman e Gilman: As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. Rio de Janeiro: Editora p.873, 1996.

BERGOLD, A.M.; GEORGIADIS, S. Novidades em fármacos antifúngicos: Uma revisão. **Visão Acadêmica**, v. 5, n. 2, p. 159-172, 2004.

BERRIDGE, J.C.; LAST, P.E.; PLATT, R.V. High-performance liquid chromatographic determination of tioconazole in pharmaceutical formulations. **Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis**, v. 3, n. 4, p. 391-394, 1985.

BOUCHEMAL, K.; BRIANÇON, S.; PIERRER, E.; FESSI, H. Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimization. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 2080, p. 241-251, 2004.

BRITISH PHARMACOPOEIA. 2010: Her Majesty. Stationary Office, v.2, London, p. 2103-2104, 2010.

CALVO, P.; VILA-JATO, J. L.; ALONSO, M. J. Comparative in vitro evaluation of several colloidal systems, nanoparticles, nanocapsules, and nanoemulsions, as ocular drug carriers. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 85, n. 5, 530-536, 1996.

CALVO, P.; GOURITIN, B.; CHACUN, H.; DESMAËLE, D.; D'ANGELO, J.; NOEL, J. P.; GEORGIN, D.; FATAL, E.; ANDREUX, J. P.; COUVREUR, P. Long-circulating PEGylated polycyanocrylate nanoparticles as new drug carrier for brain delivery. **Pharmaceutical Research**, v. 18, n. 8, p. 1157-1166, 2001.

CASTRO, G. A.; COELHO, A. L. L. R.; OLIVEIRA, C. A.; MAHECHA, A. B.; ORÉFICE, R. L.; FERREIRA, L. A. M. Formation of ion pairing as an alternative to improve encapsulation and stability and to reduce skin irritation of retinoic acid loaded in solid lipid nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 381, p. 77-83, 2009.

CATTANI, V. B.; FIEL, L. A.; JAGER, A.; JAGER, E.; COLOME, L. M.; UCHOA, F.; STEFANI, V.; DALLA COSTA, T.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R. Lipid-core nanocapsules restrained the indomethacin ethyl ester hydrolysis in the gastrointestinal lumen and wall acting as mucoadhesive reservoirs. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 39, p. 116-124, 2010.

CEVC, G.; VIERL, U. Nanotechnology and the transdermal route. A state of the art review and critical appraisal. **Journal of Controlled Release**, V. 141, P. 277–299, 2010.

CHASTEINGER, S.; FESSI, H.; DEVISSAGUET, J.; PUISIEUX, F. Comparative study of the association of itraconazole with colloidal drug carriers. *Drug Development Research*, v. 38, n.2, p. 125-133, 1996.

COUVREUR, P.; BARRAT, G.; FATTAL, E.; LEGRAND, P.; VAUTHIER, C. Nanocapsule technology: a review. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier System**, v. 19, p. 99-134, 2002.

CRYER, J. R.; ROBINSON, C. J. In vitro study to establish the efficacy of 28% tioconazole solution (Trosyl) against *Trichophyton rubrum* and *Candida albicans*. **The International Journal of Foot Science**, v. 7, n. 1, p. 27-29, 1997.

DAS, S.; SURESH, P. K.; DESMUKH, R. Design of Eudragit RL 100 nanoparticles by nanoprecipitation method for ocular drug delivery. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 6, p. 318–323, 2010.

DEVALAPALLY, H.; CHAKILAM, A.; AMIJI, M. M. Role of nanotechnology in pharmaceutical product development. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 96, n.10, p.2547-2564, 2007.

DOOMS-GOOSSENS, A.; MATURA, M.; DRIEGH, J.; DEGREEF, H. Contact allergy to imidazoles used as antimycotic agents. **Contact Dermatitis**, v. 33, n. 2, p. 73-77, 1995.

DRAKE, L.A.; PATRICK, D.L.; FLECKMAN, P.; ANDRÉ, J.; BARAN, R.; HANEKE, E.; SAPÈDE, C.; TOSTI, A. The impact of onychomycosis on quality of life: Development of an international onychomycosis-specific questionnaire to measure patient quality of life. **Journal of American Academy of Dermatology**, V. 41, P. 189-96, 1999.

EDWARDS, K. A.; BAEUMNER, A. J. Analysis of liposomes. **Talanta**, v. 68, p. 1432-1441, 2006.

ENOGAKI, K. Percutaneous absorption, distribution and excretion of tioconazole cream in rats and swine. **Japanese only**, v. 16, p. 759-768, 1985, *apud*, SOBUE, S.; SEKIGUCHI, K. Difference in percutaneous absorption and intracutaneous distribution in guinea pigs among topical antifungal drugs (tioconazole solution, tioconazole cream, miconazole nitrate solution and bifonazole solution). **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v., 27, n. 9, p. 1428-1432, 2004.

ESPUELAS, M.S.; LEGRAND, B.; IRACHE, J.M.; GAMAZO, C.; ORECCHIONI, A.M.; DEVISSAGUET, J.-PH.; YGARTUA, P. Poly(ϵ -caprolactone) nanospheres as an alternative way to reduce amphotericin B toxicity. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 158, p. 19-27, 1997.

FERGUSON, P.D.; GOODALL, D.M.; LORAN, J.S. Systematic approach to the treatment of enantiomeric separations in capillary electrophoresis and liquid chromatography III. A binding constant-retention factor relationship and effects of acetonitrile on the chiral separation of tioconazole. **Journal of Chromatography A**, v. 745, p. 25-35, 1996.

FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J-Ph.; AMMOURY, N.; BENITA, S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutics**, v.55, n.1, p. R1-R4, 1989.

FLORES, F. C.; RIBEIRO, R. F.; OURIQUE, A. F.; ROLIM, C. M. B.; POHLMANN, A. R.; BECK, R. C. R.; GUTERRES, S. S.; SILVA, C. B. Nanostructured systems containing an essential oil: protection against volatilization. **Química Nova**, v. 34, n. 6, p. 968-972, 2011.

FLORES et al. Antifungal Activity of Nanocapsule Suspensions Containing Tea Tree Oil on the Growth of *Trichophyton rubrum*. **Mycopathologia**, v. 175, p. 281-286, 2013.

FONTANA, M. C.; CORADINI, K.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R.; BECK, R. C. R. Nanoencapsulation as a way to control the release and to increase the photostability of clobetasol propionate: influence of the nanostructured system. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 5, p. 254–263, 2009.

FONTANA, M.C.; REZER, J.F.P.; CORADINI, K.; LEAL, D.B.R.; BECK, R.C.R. Improved efficacy in the treatment of contact dermatitis in rats by a dermatological nanomedicine containing clobetasol propionate. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 79, p. 241-249, 2011.

FREDDO, R. J. Estudos para obtenção e caracterização de sistemas nanoparticulados contendo ácido valpróico e avaliação da penetração deste através da barreira hematoencefálica. 2009. 140 p. Tese apresentada (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

FROMTLING, R. A. Overview of medically important antifungal azole derivatives. **Clinical Microbiology Reviews**, v.1, p.187–217, 1988.

GAGLIARDI, L.; ORSI, D.; CHIMENTI, P.; PORRA, R.; TONELLI, D. HPLC determination of imidazole antimycotics in antidandruff cosmetic products. **Analytical Sciences**, v. 19, p. 1195-1197, 2003.

GARCÍA, S. M.; PILAR, L.M.; ERCHIGA, V.C. Tratamiento de las onicomicosis. **Terapéutica en APS**, v. 14, n. 4, p. 217-221, 2007.

GARG, J.; TILAK, R.; GARG, A.; PRAKASH, P.; GULATI, A.K.; NATH, G. Rapid detection of dermatophytes from skin and hair. **Bio Medical Center Research Notes**, V. 2, N. 60, P. 1-6, 2009.

GEORGOPAPADAKOU, N. H. , β -glucan synthase inhibitors. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v.10, p.269-80, 2001.

GUPTA, S. K.; VELPADIAN, T.; DHINGRA, N.; JAISWAL, J. Intravitreal pharmacokinetics of plain and liposome-entrapped fluconazole in rabbit eyes. **Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics**, v. 16, p. 511-518, 2000.

GUPTA, H.; AQIL, M.; KHAR, R.K.; ALI, A.; BHATNAGAR, A.; MITTAL, G. Sparfloxacin-loaded PLGA nanoparticles for sustained ocular drug delivery, **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**. v. 6, p. 324–333, 2010.

GUTERRES, S.S.; WEISS-ANGELI, V.; FREITAS, L. L.; POHLMANN, A. R. Influence of benzyl benzoate as oil core on the physicochemical properties of spray-dried powders from polymeric nanocapsules containing indomethacin. **Drug Delivery**, v.7, p. 195-199, 2000.

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

HAY, R.J.; CLAYTON, Y.M.; MOORE, M.K. Tioconazole nail solution—an open study of its efficacy in onychomycosis. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 10, n. 2, p. 111-115, 1985.

HAY, R.J.; CLAYTON, Y.M.; MOORE, M.K. A comparison of tioconazole 28% nail solution versus base as an adjunct to oral griseofulvin in patients with onychomycosis. **Clinical and Experimental Dermatology**, v.12, p. 175-177, 1987.

HAY, R.J.; BARAN, R. Onychomycosis: A proposed revision of the clinical classification. **Journal American Academy of Dermatology**, v. 65, n. 6, p. 1219-1227, 2011.

HEIKKILA, H; STUB, S; REITAMO, S. A study of 72 patients with contact allergy to tioconazole. **British Journal of Dermatology**, v. 134, p. 678-680, 1996.

HENDERSON, J. T.; NEILSON, W.; WILSON, A. B.; JEVONS, S. Tioconazole in the treatment of vaginal candidiasis. **Gynäkologisch-geburtshilfliche Rundschau**, v. 23, p. 42-60, 1983.

HOUANG, E. T.; LAWRENCE, A. G. Systemic absorption and persistence of tioconazole in vaginal fluid after insertion of a single 300-mg tioconazole ovule. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 27, n. 6, p. 964-965, 1985.

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

JEONG, Y. I.; JIN, S. G.; KIM, I. Y.; PEI, J.; WEN, M.; JUNG, T. Y.; MOON, K. S.; JUNG, S. Doxorubicin-incorporated nanoparticles composed of poly(ethylene glycol)-grafted carboxymethyl chitosan and antitumor activity against glioma cells in vitro. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 79, p. 149-145, 2010.

JEVONS, S.; GYMER, G.E.; BRAMMER, K.W.; COX, D.A.; LEEMING, M.R.G. Antifungal activity of tioconazole (uk-20,349), a new imidazole derivative. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 15, n. 4, p. 597-602, 1979.

JIMÉNEZ, M. M.; PELLETIER, J.; BOBIN, M. F.; MARTINI, M. C. Influence of encapsulation on the in vitro percutaneous absorption of octyl-methoxycinnamate. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 272, p. 45-55, 2004.

JONES, R.N.; BALE, M. J.; HOBAN, D.; ERWIM, M. E. In vitro antimicrobial activity of tioconazole and its concentrations in vaginal fluids following topical (vagistat-1 16.5%) application. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 17, n. 1, p. 45-51, 1993.

JOSHI, M.; MÜLLER, R. Lipid nanoparticles for parenteral delivery of actives. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 71, p. 161-172, 2008.

KALLINTERI, P.; HIGGINS, S.; HUTCHEON, G. A.; POURÇAIN, C. B.; GARNETT, M. C. Novel functionalized biodegradable polymers for nanoparticle drug delivery systems. **Biomacromolecules**, v. 6, p. 1885-1894, 2005.

KASHIN, P.; PHYFFEROEN, M.C.; GIBBS, D.L. A comparative study of once versus twice daily treatment of superficial dermatophyte and yeast infections with tioconazole (1%) cream. **The Journal of International Medical Research**, v. 15, n. 2, p. 88-95, 1985.

KUMARI, A.; YADAV, S. K.; YADAV, S. C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 75, p. 1-18, 2010.

LACHMAN, L.; DeLUCA, P.; AKERS, M. J. Testes de estabilidade e fundamentos de cinética química. In: LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H. A.; KANIG, J. L. **Teoria e prática na indústria farmacêutica**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, v.2, 2001.

LEGRAND, P.; BARRAT, G.; MOSQUEIRA, V.; FESSI, H.; DEVISSAGUET, J. P. Polymeric nanocapsules as drug delivery systems: a review. **STP Pharma Science**, v. 9, n. 5, p. 411-418, 1999.

LOPEZ-BERESTEIN, G.; MEHTA, R.; HOPFER, R. L.; MILLS, K.; KASI, L.; MEHTA, K.; FAINSTEIN, V.; LUNA, M.; HERSH, E. M.; JULIANO, R. Treatment and prophylaxis of disseminated infection due to *Candida albicans* in mice with liposome-encapsulated amphotericin B. **Journal of Infectious Diseases**, v.147, n. 5, p. 939-945, 1983.

MACHADO, A. Uso tópico de antimicrobianos. In: BARROS, E. et al. **Antimicrobianos: Consulta rápida**. 4. ed. Porto Alegre: Artemed, 2008. cap. 7, p. 106.

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

MARTINEZ-ROSSI, N.M.; PERES, N.T.A.; ROSSI, A. Antifungal resistance mechanisms in dermatophytes. **Mycopathologia**, v. 166, p. 369-383, 2008.

MARTINI, É.; LEO, F.; CARVALHO, E. L. S.; OLIVEIRA, M.; TEIXEIRA, H. F. Adsorção de oligonucleotídeos em nanoemulsões obtidas por emulsificação espontânea. **Química Nova**, v. 30, p. 930-934, 2007.

MEHTA, R. T.; HOPFER, R. L.; GUNNER, L. A.; JULIANO, R. L.; LOPEZ-BERESTEIN, G. Formulation, toxicity, and antifungal activity *in vitro* of liposome-encapsulated nystatin as therapeutic agent for systemic candidiasis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 31, n. 2, p. 1897-1900, 1987.

MISHRA, B; PATEL, B.B.; TIWARI, S. Colloidal nanocarriers: a review on formulation technology, types and application toward targeted drug delivery. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v.6, p. 9-24, 2010.

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

MÜLLER, R. H.; MÄDER, K; GOHLA, S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery – a review of the state of the art. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 50, p. 161-167, 2000.

MUÑOZ, A.J.C.; TUR-TUR, C.; MOLINA, J.M.H.; SANTOS, P.; CÁRDENES, D.; GIUSIANO, G. Antifúngicos disponibles para el tratamiento de las micosis ungueales. **Revista Iberoamericana Micología**, v. 27, n. 2, p. 49-56, 2010.

NAKASHIMA, T.; NOZAWA, A.; ITO, T.; MAJIMA, T. Experimental tinea unguium model to assess topical antifungal agents using the infected human nail with dermatophyte *in vitro*. **Journal of Infect Chemotherapy**, v. 8, p. 331-335, 2002.

NIMESH, S.; MACHANDA, R.; KUMAR, R.; SAXENA, A.; CHAUDARY P.; YADAV, V.; MOZUNDAR, S.; CHANDRA, R. Preparation, characterization and in vitro drug release studies of novel polymeric nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 323, p. 146-152, 2006.

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

OURIQUE, A. F.; LIMA, S. I.; FERREIRA, C. V.; SILVA, C. B.; MARCHIORI, M. C. L.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S.; BECK, R. C. R. Lipid-core nanocapsules as a nanomedicine for parenteral administration of tretinoin: development and in vitro antitumor activity on human myeloid leukaemia cells. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 6, p. 214-226, 2010.

PADMAVATHY, N; VIJAYARAGHAVAN, R. Enhanced bioactivity of ZnO nanoparticles-an antimicrobial study. **Science and Technology of Advanced Materials**, v. 9, n. 3, 2008.

PANDEY, R.; AHMAD, Z.; SHARMA, S.; KHULLER, G.K. Nano-encapsulation of azole antifungals: Potential applications to improve oral drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 301, p. 268-276, 2005.

PAPPAS, P.G.; REX, J. H.; SOBEL, J. D.; FILLER, S.G.; WILLIAM E. DISMUKES, W. E.; WALSH, T. J.; JOHN E. EDWARDS, J. E. Guidelines for treatment of candidiasis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, p. 161-189, 2004.

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

PATTEL, N. R.; LEONARDI, C.; SABLIOV, C. M. Itraconazole-loaded poly(lactic-co-glycolic) acid nanoparticles for improved antifungal activity. **Nanomedicine**, v. 5, n. 7, p. 1037-1050, 2010.

PAVELIC, Z.; SKALKO-BASNET, N.; SHUBERT, R. Liposomal gels for vaginal drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 219, p. 139-149, 2001.

PELLE, E.; ANDERSON, J. Topical composition and method for enhancing lipid barrier synthesis. United States Patent 6716437, 1999.

PENG et al. Voriconazole into PLGA nanoparticles: Improving agglomeration and antifungal efficacy. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 352, p. 29–35, 2008.

PEREDA, M.D.C.V.; POLEZEL, M.A.; NOGUEIRA, C. et al. 2006. Uso do óleo de café Verde (*Coffea arábica*) em formulações cosméticas e farmacêuticas para a manutenção das propriedades da pele. PI0602842-0. Disponível em: <<http://www.patentesonline.com.br/uso-do-leo-de-caf-verde-coffea-arabica-em-formula-es-cosm-ticas-e-farmac-uticas-para-74028.html>>. Acesso 30 mai. 2013.

PIETRA, A.M.; CAVRINI, V.; ANDRISANO, V.; GATTI, R. HPLC analysis of imidazole antimycotic drugs in pharmaceutical formulations. **Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis**, v. 10, n. 10-12, p. 873-879, 1992.

PONS JR., F. R. Suspensões e formulações tópicas contendo nanocápsulas e micropartículas de cetoconazol: avaliação da estabilidade e atividade antimicrobiana. 2011. p. 100. Dissertação apresentada (mestrado) – Curso de mestrado em nanociências, Centro Universitário Franciscano de Santa Maria, Santa Maria, 2011.

RAFFIN, R. P.; OBACH, E. S.; MEZZALIRA, G., POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Nanocápsulas poliméricas secas contendo indometacina: estudo de formulação e de tolerância gastrointestinal em ratos. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 22, n. 2, p. 163-72, 2003.

RAWAT, M.; SINGH, D.; SARAF, S. Nanocarriers: promising vehicle for bioactive drugs. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, p. 1790-1798, 2006.

REPKA, M. A.; O'HAVER, J.; SEE, C. H.; GUTTA, K.; MUNJAL, M. Nail morphology studies as assessments for onychomycosis treatment modalities. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 25, p. 245, 2002.

REYNOLDS, J.E.F. Martindale the extra pharmacopoeia. London, 31 ed, 1996.

RUIZ, L.R.B.; CHIACCHIO, N.D. Manual de conduta nas onicomicoses: diagnóstico e tratamento. **Sociedade Brasileira de Dermatologia**, p.191-201, 2005.

SANTOS, S. S.; LORENZONI, A.; FERREIRA, L. M.; MATTIAZZI, J.; ADAMS, A. I. H.; DENARDI, L. B.; ALVES, S. H.; SCHAFFAZICK, S. R.; CRUZ, L. Clotrimazole-loaded Eudragit® RS100 nanocapsules: Preparation, characterization and in vitro evaluation of antifungal activity against Candida species. **Materials Science and Engineering: C**, v. 33, p. 1389-1394, 2013.

SAVIAN, A.L.; VARELLA, F.T.; ATHAYDE, M.L.; SILVA, C.B. Desenvolvimento e avaliação preliminar da estabilidade de emulsão não-iônica O/A contendo óleo de café verde como potencializador de fator de proteção solar. **Revista Brasileira de Farmácia**, 91(2), p., 82-88, 2011.

SAVIAN, A.L. Desenvolvimento de nanocápsulas contendo ditranol e sua incorporação em formulação semissólida de base aquosa. 2012. 114p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2012.

SCHAFFAZICK, S. R.; POHLMANN, A. R.; FREITAS, L. L.; GUTERRES, S. S. Caracterização e estudo da estabilidade de suspensões de nanocápsulas e de nanoesferas poliméricas contendo diclofenaco. **Acta Farmacêutica Bonaerense**, v. 21, n. 2, p. 99-106, 2002.

SCHAFFAZICK, S. R.; FREITAS, L. L.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 726-737, 2003.

SCHAFFAZICK, S. R.; POHLMANN, A. R.; CORDOVA, C. A. S.; CRECZYNSKI-PASA, T. B.; GUTERRES, S. S. Protective properties of melatonin-loaded nanoparticles against lipid peroxidation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 289, p. 209-213, 2005.

SCHAFFAZICK, S. R.; SIQUEIRA, I. R.; BADEJO, A. S.; JORNADA, D. S.; POHLMANN, A. R.; NETTO, C. A.; GUTERRES, S. S. Incorporation in polymeric nanocapsules improves the antioxidant effect of melatonin against lipid peroxidation in mice brain and liver. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 69, p. 64–71, 2008.

SHAH, K. A.; DATE, A. A.; JOSHI, M. D.; PATRAVALE, V. B. Solid lipid nanoparticles (SLN) of tretinoin: Potential in topical delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 345, p. 163-171, 2007.

SIDRIM, J.J.C; ROCHA, M.F.G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara & Koogan S.A., 2004.

SILVA, P. **Farmacologia**. 4. Ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara & Koogan S.A., 1994. p. 1178-1179.

SILVA, C.; MARTINI, É.; TAVARES, G.; SILVEIRA, T.; OLIVEIRA, M.; TEIXEIRA, H. F. Caracterização físico-química de nanoemulsões catiônicas como sistemas de liberação de oligonucleotídeos. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 25, n.1, p. 17-21, 2006.

SIMONETTI, G.; SIMONETTI, N.; VILLA, A. Increase of activity of tioconazole against resistant microorganisms by the addition of butylated hydroxyanisole. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 22 p. 439-443, 2003.

SOBUE, S.; SEKIGUCHI, K. Difference in percutaneous absorption and intracutaneous distribution in guinea pigs among topical antifungal drugs (tioconazole solution, tioconazole cream, miconazole nitrate solution and bifonazole solution). **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v., 27, n. 9, p. 1428-1432, 2004.

SONAJE, K.; LIN, K. J.; WEY, S. P.; LIN, C. K.; YEH, T. H.; NGUYEN, H. N.; HSU, C. W.; YEN, T. C.; JUANG, J. H.; SUNG, H. W. Biodistribution, pharmacodynamics and pharmacokinetics of insulin analogues in a rat model: Oral delivery using pH-Responsive nanoparticles vs. subcutaneous injection. **Biomaterials**, v. 31, p. 6849-6858, 2010.

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

STEVENS, D.A. The new generation of antifungal drugs. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 7, n. 6, p. 732-735, 1988.

SWEETMAN, S.C. **Martindale - Guia Completa de Consulta Fármaco-Terapêutica**. 2 Ed. Barcelona: Pharma Editores, S.L., 2006. p. 588.

TABORDA, M.L.; WEBER, M.B.; TEIXEIRA, K.A.M.; LISBOA, A.P.; WELTER, E.Q. Avaliação da qualidade de vida e do sofrimento psíquico de pacientes com diferentes dermatoses em um centro de referência em dermatologia no sul do país. **Anais Brasileiros Dermatologia**, v. 85, n. 1, p. 52-56, 2010.

THOMAS, A.M.; KAPANEN, A.I.; HARE, J.I.; RAMSAY, E.; EDWARDS, K.; KARLSSON, G.; BALLY, M.B. Development of a liposomal nanoparticle formulation of 5-Fluorouracil for parenteral administration: Formulation design, pharmacokinetics and efficacy. **Journal of Controlled Release**, v. 150, p. 212–219, 2011.

USP 35. The United States Pharmacopeia. 35th. ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2012.

VELPANDIAN, T.; NARAYANAN, K.; NAG, T.C.; RAVI, A.K.; GUPTA, K.S. Retinal toxicity of intravitreally injected plain and liposome formulation of fluconazole in rabbit eye. **Indian Journal of Ophthalmology**, v. 54, n. 4, p. 237-240, 2006.

VRAKAS, D.; GIAGINIS, C.; TSANTILI-KAKOULIDOU, A. Different retention behavior of structurally diverse basic and neutral drugs in immobilized artificial membrane and reversed-phase high performance liquid chromatography: Comparison with octanol-water partitioning. **Journal of Chromatography A**, v. 1116, p.158-164, 2006.

WEISS-ANGELI, V.; POLETTO, F. S.; ZANCAN, L. R.; BALDASSO, F.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Nanocapsules of octyl methoxycinnamate containing quercetin delayed the photodegradation of both components under ultraviolet A radiation. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 4, p. 80-89, 2008.

WELSH, O.; CABRERA, L.V.; WELSH, E. Onychomycosis. **Clinics in Dermatology**, v. 28, p.151–159, 2010.

WYATT, E. L.; SUTTER, S. H.; DRAKE, L. A. Farmacologia dermatológica. In: **Goodman & Gilman: As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 10. Ed. Rio de Janeiro: Editora p. 1349 - 1365.

YONEYAMA, E. Allergic contact dermatitis due to topical imidazole antimycotics. The sensitizing ability of active ingredients and cross-sensitivity. **Nihon Ika Daigaku Zasshi**, v. 63, n. 5, p. 356-364, 1996.

ZILI, Z.; SFAR, S.; FESSI, H. Preparation and characterization of poly- ϵ -caprolactone nanoparticles containing griseofulvin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 294, p. 261–267, 2005.

APÊNDICES

Apêndice A – Cromatogramas demonstrando a especificidade do método para análise do tioconazol nos hidrogéis.

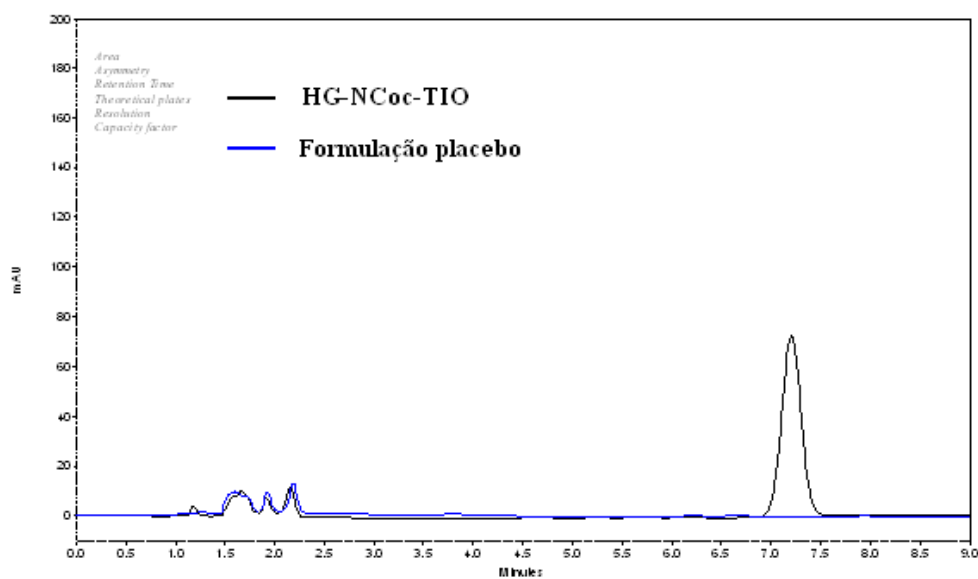


Figura 1- Cromatogramas obtidos por CL. Hidrogel contendo nanocápsulas de tioconazol e OC (20 µg/mL) e formulação placebo (sem a presença do fármaco).

Apêndice B – Cromatogramas demonstrando a especificidade do método para o ensaio de liberação *in vitro*.

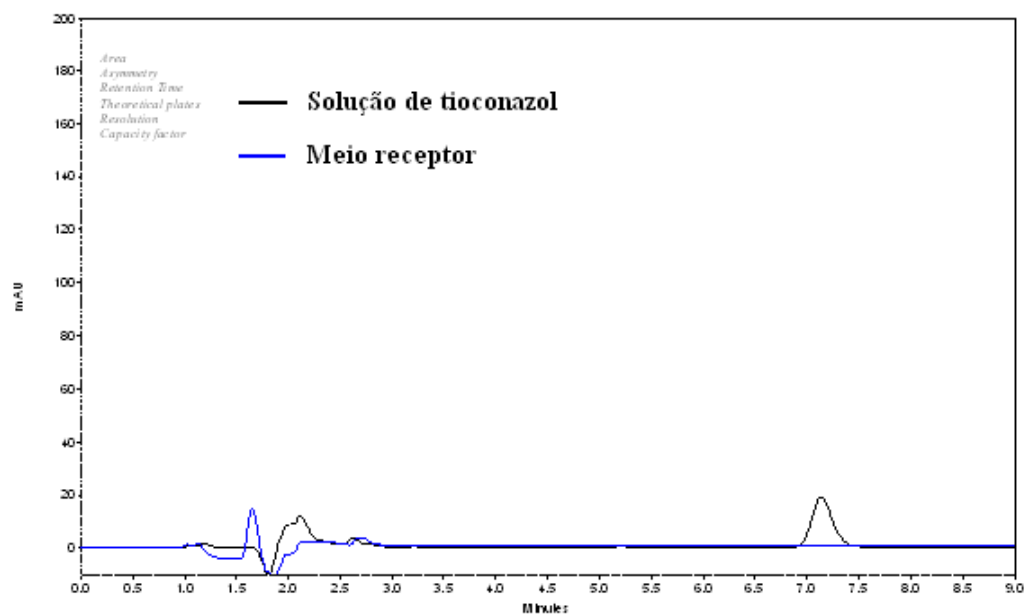


Figura 2- Cromatogramas obtidos por CL. Solução de tioconazol (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e meio receptor (etanol:água 40:60).